



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Preferencia de recolección de hormigas *Acromyrmex ambiguus* del Delta del Paraná por plantas nativas de la región: bases físico-químicas y sensoriales

Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área

Ciencias Biológicas

Lic. Maria Ayelen Nally

Director de Tesis: Dr. Fernando Locatelli

Directora adjunta de Tesis: Dra. Patricia Fernández

Consejero de estudios: Dr. Daniel Tomsic

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología y Plasticidad Sensorial, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, Universidad de Buenos Aires. Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFByNE), CONICET.

Buenos Aires, 1 de abril del 2025

Preferencia de recolección de hormigas *Acromyrmex ambiguus* del Delta del Paraná por plantas nativas de la región: Bases físico-químicas y sensoriales

Resumen

Identificar señales sensoriales que permitan a los insectos encontrar plantas hospedantes y comprender las bases neurobiológicas detrás de su elección proporciona información básica para el diseño de estrategias de convivencia con especies consideradas plagas. Este proyecto tiene como objetivo encontrar las principales claves que generan atracción en las hormigas cortadoras de hojas *Acromyrmex ambiguus* a plantas alternativas que puedan recolectar en plantaciones comerciales de sauces en la región del Bajo Delta del río Paraná, en Argentina. Dada la relevancia de la recuperación de estos ecosistemas nativos, utilizamos especies de plantas nativas. Para ello identificamos especies de plantas nativas que podrían ser utilizadas para estudiar la ecología sensorial de *A. ambiguus* en relación a ellas. Centrando el interés en recuperar ecosistemas nativos, primero identificamos especies vegetales nativas y evaluadas como palatables. Seleccionamos ocho especies de plantas y estudiamos su grado de aceptación en condiciones de campo y laboratorio. Establecimos una jerarquía de preferencias basada en el comportamiento individual y grupal, siendo "Sen del Campo" (*Senna corymbosa*) la más y "Anacahuita" (*Blepharocalyx salicifolius*) la especie menos preferida. Luego, mediante análisis de vídeo de hormigas alimentándose en colonias artificiales controladas, identificamos pasos secuenciales que conducen a la recolección de una especie. Una decisión inicial de acercamiento, que dependería de señales olfativas, y un segundo paso que dependería de señales gustativas y que afecta el corte de hojas y el traslado del material vegetal al nido. Se identificaron los compuestos volátiles y cuticulares de las hojas involucrados en la preferencia de las plantas. Adicionalmente, para estudiar el valor nutricional de las plantas se realizó un análisis físicoquímico entre estas dos especies de plantas. Se analizaron azúcares totales, proporción de materia orgánica, polifenoles *Sunscreen*, polifenoles totales, dureza de la hoja, proteínas totales y lignina. Los resultados obtenidos respaldan las diferencias de polifenoles entre estas dos especies de plantas nativas. Esta información podría utilizarse en una estrategia de "manejo" de hormigas reintroduciendo plantas nativas como oferta de recolección alternativa dentro de las plantaciones de sauces que conduzca a una reducción de pesticidas para una mayor sostenibilidad ambiental en este ecosistema.

Palabras clave:

Hormigas cortadoras de hojas; Nativas; Sensorial; Olores; Preferencia

Foraging preference of Delta del Paraná ants *Acromyrmex ambiguus* for native plants of this region: physico-chemical and sensory bases.

Abstract

Identifying sensory cues that enable insects to find host plants, and understanding the neurobiology behind their selection, provides basic information for the design of new pest management. This project aims at finding the main cues attracting leaf cutting ants, *Acromyrmex ambiguus* to alternative host plant in commercial willow plantations at the Delta of the Paraná river region in Argentina. Given the interest in recovering native ecosystems, native plant species were used. We identified native plant species that might be used to study sensory ecology among *A. ambiguus* and host plants. Focused on the interest of recovering native ecosystems, first, native plant species were identified and evaluated as host plants. We selected eight plant species and studied acceptance or rejection under field and laboratory conditions. We established a hierarchy of preference based on individual and group behavior, being "Sen del Campo" (*Senna corymbosa*) the most and "Anacahuita" (*Blepharocalyx salicifolius*) the least preferred species. Then, by video analysis of ant foraging in controlled indoor nests, we identified sequential steps leading to plant selection. An initial decision to approach, that depended on olfactory cues, and a second step that depended on gustatory cues and affected leaf-cutting and withdrawal -to-the-nest. Volatiles and leaf cuticular compounds possibly involved in plant selection and preference were identified. In addition, in order to study plant nutritional value, a physicochemical analysis was performed between these two plant species. Total sugar, proportion of organic matter, Sunscreen polyphenols, total polyphenols, leaf hardness, total proteins and lignin were analyzed and support polyphenols differences between these two native plant species. This information might be used in an ant management strategy by reintroducing native plants as alternative hosts within willow plantations leading to a reduction of pesticides for a major environmental sustainability in this ecosystem.

Keywords:

Leaf cutter ants; Native; Sensory; Odors; Preference

Índice

Capítulo 1: Introducción general.....	5
1.1. Humedales del Bajo Delta del Paraná.....	6
1.1.1. Ecorregión Delta del Paraná.....	11
1.1.2. Historización de la producción local.....	16
1.1.3. Sitio de estudio.....	24
1.2. Efecto de las hormigas cortadoras de hojas en producciones de álamo (<i>Populus</i> spp.) y sauce (<i>Salix</i> spp.).....	25
1.2.1 Problemática.....	25
1.2.2 Estrategias de manejo contra las hormigas cortadoras de hojas.....	28
1.2.3 Biología de las hormigas cortadoras de hojas.....	32
1.2.3.1 Evolución y diversidad: Origen, distribución y organización social	
1.2.3.2 Dispersión y Mutualismo en <i>Acromyrmex</i> : Estrategias de reproducción y construcción de nidos.....	34
1.2.3.3 Hormigas Cortadoras de Hojas: Transformadoras del ecosistema y catalizadoras de cambios ambientales.....	39
1.3. Objetivo e hipótesis generales.....	40
1.3.1. Objetivo general.....	40
1.3.2. Hipótesis general.....	41
Capítulo 2: Materiales y métodos generales.....	41
2.1 Recolección de colonias de <i>Acromyrmex ambiguus</i>	41
2.2 Mantenimiento de colonias de <i>Acromyrmex ambiguus</i>	42
2.3 Análisis estadístico.....	43
Capítulo 3: Preferencia de recolección sobre especies vegetales nativas del Bajo Delta del Paraná: Del campo al laboratorio.....	43
3.1 Introducción.....	43
3.1.1 Defensas de las plantas.....	45
3.1.2 Preferencias de recolección en hormigas cortadoras.....	46
3.2 Objetivos e hipótesis.....	46
3.3 Materiales y métodos.....	47

3.3.1 Preferencia en el campo: Herbivoría.....	47
3.3.2 Jerarquía de consumo en el laboratorio: Ensayos duales.....	51
3.3.3 Ensayos de preferencia colectiva entre Anacahuita y Sen del campo..	54
3.3.3.1 Hojas frescas.....	55
3.3.3.2 Extractos foliares en diclorometano.....	56
3.3.4. Ensayos de preferencia individual entre Anacahuita y Sen del campo...	57
3.3.4.1 Claves de contacto: Plataforma de recolección.....	57
3.3.4.2 Claves volátiles: Olfatómetro de ambiente estacionario.....	58
3.4 Resultados.....	60
3.4.1 Preferencia en el campo: Herbivoría.....	60
3.4.2 Jerarquía de consumo en el laboratorio: Ensayos duales.....	61
3.4.3 Ensayos de preferencia colectiva de Anacahuita y Sen del campo.....	64
3.4.3.1 Hojas frescas.....	64
3.4.3.2 Extractos foliares en diclorometano.....	67
3.4.4 Ensayos de preferencia individual entre Anacahuita y Sen del campo...	75
3.4.4.1 Claves de contacto: Plataforma de recolección individual.....	75
3.4.4.2 Claves volátiles: Olfatómetro de ambiente estacionario.....	77
3.5 Discusión.....	78

Capítulo 4: Plasticidad en la preferencia de recolección en función de la

experiencia.....	85
4.1 Introducción.....	85
4.2. Objetivos e hipótesis.....	87
4.3 Materiales y métodos.....	88
4.3.1 Diseño experimental y manejo de las colonias.....	88
4.3.2 Ensayos de preferencia.....	89
4.4 Resultados.....	90
4.4.1 Innato o adquirido: ¿La preferencia depende de la experiencia?.....	90
4.5 Discusión.....	96

Capítulo 5: Características foliares que afectan la recolección.....	97
5.1 Introducción.....	97
5.2 Objetivos e hipótesis.....	102
5.2.1 Objetivo general.....	102
5.2.2 Objetivos específicos.....	102
5.2.3 Hipótesis.....	102
5.3 Materiales y métodos.....	102
5.3.1 Dureza de las hojas.....	102
5.3.1.1 Mediciones físicas.....	102
5.3.2 Metabolitos especializados y nutrientes.....	103
5.3.2.1 Compuestos volátiles: Recolección y análisis de compuestos orgánicos volátiles.....	104
5.3.2.2 Compuestos fenólicos.....	107
5.3.2.3 Nutrientes.....	107
5.4 Resultados.....	108
5.4.1 Dureza de las hojas.....	108
5.4.2 Claves volátiles: Análisis de compuestos.....	110
5.4.3 Metabolitos especializados.....	113
5.4.4 Nutrientes.....	114
5.5 Discusión.....	115
Capítulo 6: Discusión, conclusiones y perspectivas.....	118
6.1 Discusión y conclusiones.....	118
6.2 Consideraciones finales.....	118
Capítulo 7. Bibliografía.....	118
Anexo.....	119

Agradecimientos

A los hormigueros: **A**madeus Mozart, **B**eethoven, **C**harlie Parker, **D**anjo Rainhard, **E**dith Piaf, **F**ela Kuti, **G**abriela Epumer, **H**iatu Kayote -**F**resnoterror para JuanFi-, **I**nti Illimani y **J**anis Joplin.

A Fer y Pato, mis directores, por su acompañamiento y guía a lo largo de esta tesis. Por darme libertad en la investigación y por mantener los árboles y los hormigueros por 5 meses al inicio de la pandemia. Especialmente a Fer por esta década siendo mi mentor.

A lxs juradxs por tomarse el tiempo y el trabajo de leer esta tesis y evaluarla.

A Norma Gorosito y Pablo Schilman por su buena predisposición, acompañamiento, consejo y discusiones en las reuniones de la comisión de seguimiento del Departamento de fisiología, biología molecular y celular.

A Daiana Perri por regalarnos 2 hormigueros, compartirnos sus saberes respecto a sus cuidados, por ayudarme a sacar las fotos de campo y por la compañía en todas esas extensas (y calurosas) jornadas.

A Camila Dávila por compartir su sabiduría respecto a los volátiles, darme una mano en su recolección, además de en el procesamiento de los datos. Por pasar por el GC una tanda de muestras durante la pandemia y la compañía en las extensas y calurosas jornadas de campo.

A Soledad Méndez por guardar cuidadosamente mis muestras durante la pandemia, por las discusiones compartidas en congresos y pasillos que derivaron en parte del capítulo 5, en amistad y nuevos proyectos juntas.

A Nadia Lis Jiménez y Alejandro Sosa por amablemente prestarnos el penetrómetro.

A Amy Austin por amablemente brindarnos materiales para mediciones de Lignina.

A Hugo Chludil por brindarnos aceite esencial de naranja con el cual realizamos experimentos comportamentales.

A Santiago Locatelli y Esteban Beckwith por ayudarnos con los prototipos en impresora 3D del olfatómetro de ambiente estacionario.

A Natalia Fracassi por brindarnos espacio, tiempo y material para el trabajo de campo en la Estación Experimental INTA Delta.

A Edgardo Casaubón y Guillermo Madoz por recibirnos de la mejor manera y compartir sus conocimientos de campo en la EE INTA Delta.

A Hugo Rossi, Djoney Gómez y Agustín Álvarez Costa por ayudarme a fotografiar los especímenes de árboles nativos.

A Edgardo Casaubón, Vivero Comunitario Ciudad Universitaria (VICCU) y Vivero Chicos Naturalistas por brindarnos plantines de nativas.

A Marcelo Canevari por amablemente brindar una imagen de la pintura sobre la biodiversidad representativa de la Ecorregión del Delta del Paraná (Óleo sobre tela). Autoría de Marcelo Canevari y Marcelo Canevari (padre).

A todo el (ex) Laboratorio de neurobiología de la memoria por, inicialmente, hacerle espacio a las hormigas en el cangrejario.

Al laboratorio de Plasticidad y Fisiología Sensorial, por alimentar las hormigas en mi ausencia pero también por lo más importante: ser un increíble grupo humano cuyo acompañamiento, debates y colaboración han sin duda contribuido a mejorar esta tesis. Muy especialmente al 337, Fede, Agus, Lau y Ana por las risas y los mates, ambas fuentes sustanciales de energía.

A mi familia por su apoyo incondicional, sin el cual esta tesis no hubiera sido posible. Especialmente por alojarnos a los árboles, las hormigas y a mi durante la pandemia.

A mis amigxs y compañerxs del IFIBYNE por sostenernos ante las dificultades y reír juntxs ante la desgracia, por organizarnos para resolver o apoyarnos, por los mates y los brindis.

A AGD-UBA, Becarixs-UBA y JCP.

A Alexandra Elbakyan por bregar por el derecho universal al acceso libre del conocimiento científico, esencial para acceder a material fundamental para desarrollar investigaciones.

A mis amigxs por su amor, ternura, contención, diversión y compañía, que hacen que toda situación mejore irremediabilmente.

Al Comité de Inclusión y Diversidad de la Sociedad Internacional de Neuroetología (Ana Silva, Angeles Salles, Amir Ayali, Claire Rusch, Heather Einstein, Josh Martin, Lauren O'Connell, Lukas Weiss, Saumya Gupta y Vivek Nityananda) y, a la Secretaría de Género y Diversidad del Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular de Exactas-UBA (Canela Pedreira, Eugenia Segretín, Francisco Velazquez-Duarte, Natalia Rubinstein, Paula Perissinotti, Verónica de la Fuente y Verónica Perez Schuster), porque ser parte de estos espacios ha sido formativo en estos años. Además, por todo lo logrado a través de la construcción colectiva. Agradecimiento especial a la Chair del Comité, la motivadora, inspiradora y entusiasta, Ana Silva.

A los organismos que me han becado cursos, estadías y congresos durante mi formación doctoral: The Company of Biologist (JEB), International Society for Neuroethology (ISN), Asociación Latinoamericana de Ecología Química (ALAEQ), Congreso Latinoamericano de Entomología, Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur (COMPORTA), International Brain Research Organization (IBRO), European Molecular Biology Organization (EMBO) y Congreso Latinoamericano de Agroecología.

Esta tesis también fue posible gracias a la obtención de Beca UBA y Beca CONICET de finalización.

Capítulo 1: Introducción general

En primera instancia, destacaremos que el presente trabajo se centra en la biología de las hormigas cortadoras de hojas *Acromyrmex ambiguus*, específicamente, en las estrategias de recolección y el comportamiento colectivo e individual de recolección, con el objetivo de generar conocimiento en pos de aportar al diseño de estrategias de mitigación del daño que las hormigas cortadoras producen en especies vegetales de uso comercial en la zona del Núcleo Forestal del Bajo Delta del Paraná. No obstante, no es posible independizar este proyecto de su contexto ecológico, histórico y socio-político. Conocerlos habilita una mirada que aborde la complejidad de la problemática al contemplar sus múltiples dimensiones, aunque no necesariamente todas ellas sean abordadas en esta tesis. Según Schoonhoven, van Loon y Dicke (2005) la necesidad de comprender los vínculos entre plantas e insectos de manera tal de generar estrategias de control de las especies consideradas “pestes” es no sólo indiscutible sino también central en la entomología agrícola. Toda práctica humana que pretenda ser compatible y respetuosa del medio ambiente debe partir de un conocimiento concreto y situado en la biología de los organismos en cuestión para poder luego desarrollarse eficazmente. En la cultura occidental desde el siglo XVI las hormigas del *Abya yala* -denominación de pueblos originarios al continente americano (Maldonado y Ruiz Romero, 2014)- han sido consideradas “plagas” por los colonizadores (Wheeler, 1926 y Wetterer, 2006) hasta la actualidad. Sin embargo, la representación que las poblaciones originarias del continente históricamente han tenido para con estos insectos es diametralmente opuesta. Incluso, desde el punto de vista biológico y agroecológico, las hormigas en general y las hormigas cortadoras de hojas en particular representan un rol ecológico fundamental en el ecosistema. Bajo esta perspectiva no se asociará en este trabajo el concepto de peste o plaga a las hormigas y de ser utilizado será entre comillas, haciendo alusión a concepciones del tipo occidentales, antropocéntricas, extractivistas, tecnócratas, productivistas y capitalistas; concepciones que no contemplan los procesos ecológicos asociados a la presencia de estos organismos y sobre los cuales se ampliará próximamente. Teniendo estos elementos en consideración se desarrolla a continuación el marco teórico que, entendemos, aporta a la concepción del momento socio-histórico y ecológico actual de la región de interés y del sistema que pretendemos conocer

para poder aportar a su protección, recuperación y entramado desde un punto de vista del medio ambiente desde una concepción integral (Ley 27.621).

1.1. Humedales del Bajo Delta del Paraná

Para caracterizar la región de interés, el Bajo Delta del Paraná, se abordará su descripción. Sin embargo, para hacerlo es necesario previamente determinar las definiciones que se tomarán en consideración a lo largo de este trabajo para referirse a la *Ecorregión* Delta del Paraná donde se encuentra el *Humedal* (Shaw y Fredine, 1956) más importante de Sudamérica debido a su tamaño y alta biodiversidad (Aquino et al., 2024 y Nanni et al. 2022).

Ecorregión: Territorio geográficamente definido en el que dominan determinadas condiciones geomorfológicas y climáticas relativamente uniformes o recurrentes, caracterizado por una fisonomía vegetal de comunidades naturales y seminatural que comparten un grupo considerable de especies dominantes, una dinámica y condiciones ecológicas generales y cuyas interacciones son indispensables para su persistencia a largo plazo (Burkardt et al., 1999).

Humedal: Área de turbera, pantano o agua, ya sea natural o artificial, permanente o temporario, con agua estática o en flujo, dulce, salobre o salada incluyendo agua marina, de profundidades que no superen los 6 metros en marea baja (Mitsch y Gosselink, 2007). Consensuado por la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza y Recursos Naturales (IUCN, por sus siglas en inglés). Convención de Ramsar (Irán, 1971).

Lo que hoy en día llamamos humedales son aquellos ecosistemas que antaño eran denominados como “pantano”, “lodazal”, “ciénaga” o “terrenos yermos”, generalmente con connotaciones negativas y causalmente también drenados, destruidos y modificados para usos agrícolas o urbanizaciones. Éstas fueron prácticas realizadas a escala global e incluso fomentadas por múltiples estados (Mitsch y Gosselink, 2007). En el ámbito científico, el término humedal (Shaw y Fredine, 1956) pasó de considerarse una transición entre ecosistemas acuáticos y

terrestres a considerarse como un diverso grupo de ecosistemas. Tanto la estructura como el funcionamiento de los humedales está determinada por el régimen hidrológico aunque también influyen la temperatura, las lluvias, la estacionalidad y las fases interanuales de inundaciones y sequías (Aquino et al. 2024). En líneas generales se caracterizan, por un lado, por estabilizar los reservorios acuíferos actuando como amortiguadores de inundaciones y sequías, en ocasiones purificando aguas, protegiendo las costas y recargando acuíferos subterráneos, entre otras funciones ecosistémicas (*Tabla 1.1*). Adicionalmente, la dinámica de la vegetación puede modificar su periodicidad en el tiempo en contextos de usos y modificaciones de la tierra (Aquino et al. 2024).

Tabla 1.1: Generalidad de los beneficios que los ecosistemas sanos de humedales pueden proveer a la sociedad (Tomado de Kandus et al., 2010)

Funciones ecosistémicas		Bienes y servicios (ejemplos)
Genéricas	Específicas	
Regulación Hidrológica	Desaceleración de los flujos y disminución de turbulencia del agua	<i>Estabilización de la línea de costa. Disminución del poder erosivo.</i>
	Regulación de Inundaciones	<i>Disminución de la intensidad de los efectos de las inundaciones sobre áreas vecinas</i>
	Retención de agua Almacenaje a largo y corto plazo	<i>Presencia de reservorios de agua para consumo y producción.</i>
	Recarga de acuíferos	<i>Reservas de agua dulce para el hombre, para consumo directo y para utilización en sus actividades productivas</i>
	Retención y estabilización de sedimentos	<i>Mejoramiento de la calidad del agua</i>
	Regulación de procesos de evapotranspiración	<i>Atemperación de condiciones climáticas extremas</i>
Regulación Biogeoquímica	Ciclado de nutrientes (Nitrógeno, Carbono, Fósforo, etc.)	<i>Retención de contaminantes Mejoramiento de la calidad del agua</i>
	Almacenaje / retención de nutrientes (ej. Fijación/ acumulación CO ₂ , liberación de NH ₄)	<i>Acumulación de Carbono Orgánico (ie.turba). Regulación climática</i>
	Transformación y degradación de nutrientes y contaminantes	<i>Mejoramiento de la calidad del agua. Regulación climática</i>
	Exportación de nutrientes y compuestos.	<i>Vía agua: Sostén de cadenas tróficas vecinas Regulación Climática: Emisiones CH₄ a la atmósfera</i>
	Regulación de salinidad	<i>Provisión de agua dulce - Protección de suelos - Producción de sal</i>

Ecológicas	Producción primaria	<i>Secuestro de carbono en suelo y en biomasa</i> <i>Producción agrícola</i> <i>Producción de forraje para ganado doméstico y especies de fauna silvestre de interés.</i> <i>Producción apícola</i> <i>Producción de combustible vegetal y sustrato para cultivos florales y de hortalizas (turba)</i>
	Producción secundaria	<i>Producción de proteínas para consumo humano o como base para alimento del ganado doméstico (fauna silvestre , peces e invertebrados acuáticos)</i> <i>Producción de especies de interés cinegético</i> <i>Producción de especies de peces para pesca deportiva y comercial.</i> <i>Producción de especies de interés turístico-recreacional (aves, mamíferos, reptiles, anfibios)</i>
	Provisión de hábitat	<i>Ambientes de interés paisajístico</i> <i>Oferta hábitat de especies de interés comercial, cinegético, cultural, etc.</i> <i>Provisión de hábitats críticos para especies migradoras (ej. aves)</i> <i>Provisión de hábitats críticos para la reproducción de especies animales (ej. aves, tortugas acuáticas, peces e invertebrados acuáticos)</i>
	Mantenimiento de interacciones biológicas	<i>Mantenimiento de cadenas tróficas locales y de ecosistemas vecinos</i> <i>Exclusión de especies invasoras.</i>
	Mantenimiento de la diversidad tanto específica como genética	<i>Provisión de productos animales y vegetales alimenticios, y construcción.</i> <i>Provisión de productos animales y vegetales no alimenticios (cueros, pieles, plumas, plantas y peces ornamentales, mascotas, etc.)</i> <i>Provisión de productos farmacológicos y etnobiológicos (para etnomedicina, con fines religiosos, rituales, etc.)</i> <i>Producción agrícola</i>

En los años 80's en Estados Unidos de Norteamérica, a raíz de que científicxs veían una falta de (pre)ocupación en la población general por la degradación de los ecosistemas y su uso indiscriminado, más de 30 especialistas en ecología, ciencias sociales y economía trabajaron en la resignificación de los humedales desde la perspectiva del valor económico que aportan en pos de demostrar que los ecosistemas son invaluable en la economía mundial y que proveen a la sociedad sus necesidades básicas. De este modo, se popularizó el término “servicios ecosistémicos” (Daily, 1997). Su utilización apuntó a incorporar los principios de sostenibilidad en política pública para dar cuenta de la explotación insostenible de la naturaleza (Peixoto Batista et al., 2019). Sin embargo, esta categoría hoy en día resulta controversial ya que se inscribe en una lógica moderna donde se refuerza la separación entre naturaleza y sociedad mientras que, a su vez, se homogeniza a lxs humanxs como sociedad y da cuenta de la habilitación a la apropiación e incidencia sobre esa naturaleza (Straccia y Pizarro, 2017). Por este motivo, a lo largo de esta tesis se evitará hacer uso de este concepto y cuando se utilice será entre comillas a modo de dar cuenta de la controversia que acarrea.

Por otro lado, otros autores consideran que la biodiversidad de los humedales además de valores económicos también representa valores éticos y estéticos (Fracassi et al., 2014). Bajo estas consideraciones, los beneficios ecosistémicos se enmarcan como emergentes de un sistema siempre que éste pueda tolerar las modificaciones antrópicas a las que es expuesto. Por ejemplo, no serán perjudicados en la medida en que las modificaciones antrópicas, como las agrícolas y urbanas, se ejerzan en un grado tal que no alteren de manera visible tales beneficios (*Figura 1.1*), motivo por el cual se fomenta la distribución espacial de las intervenciones humanas a gran escala (Convención Ramsar, 2018).

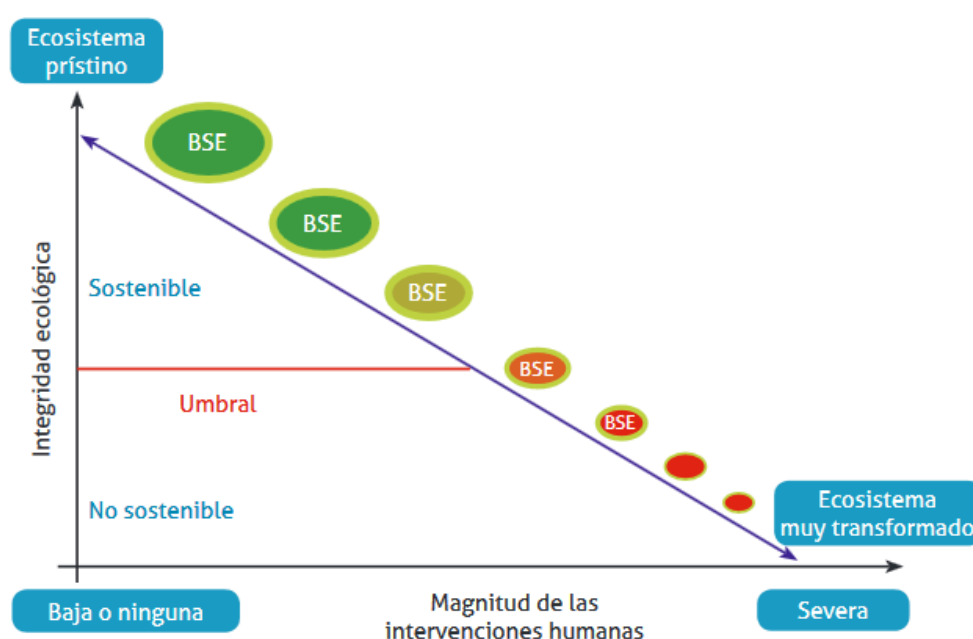


Figura 1.1: Relación entre la integridad ecológica e intervenciones humanas, consideradas como generación de “bienes y servicios” ecosistémicos (BSE) -Tomado de Quintana et al. 2014, modificado de Karr 2000-.

Por estas razones, los humedales pasaron a ser descritos como estabilizadores climáticos a escala global y como sumideros de carbono, es decir, que disminuyen el dióxido de carbono presente en la atmósfera y por estos motivos, entre otros de los mencionados previamente, se promueve su conservación, protección y regulación. La Convención de Ramsar (Irán, 1971), realizó el primer acuerdo mundial sobre conservación y el uso racional de los recursos naturales con motivo de la Convención de Humedales de Importancia Internacional. Hoy en día, 172 países adhieren a ella. En particular, Argentina entró en vigor el 4 de septiembre de 1992 y actualmente posee 23 Sitios Ramsar o “Humedales de Importancia

Internacional" (Figura 1.2 y Tabla A.1 -Anexo-), con un aumento progresivo en su número.

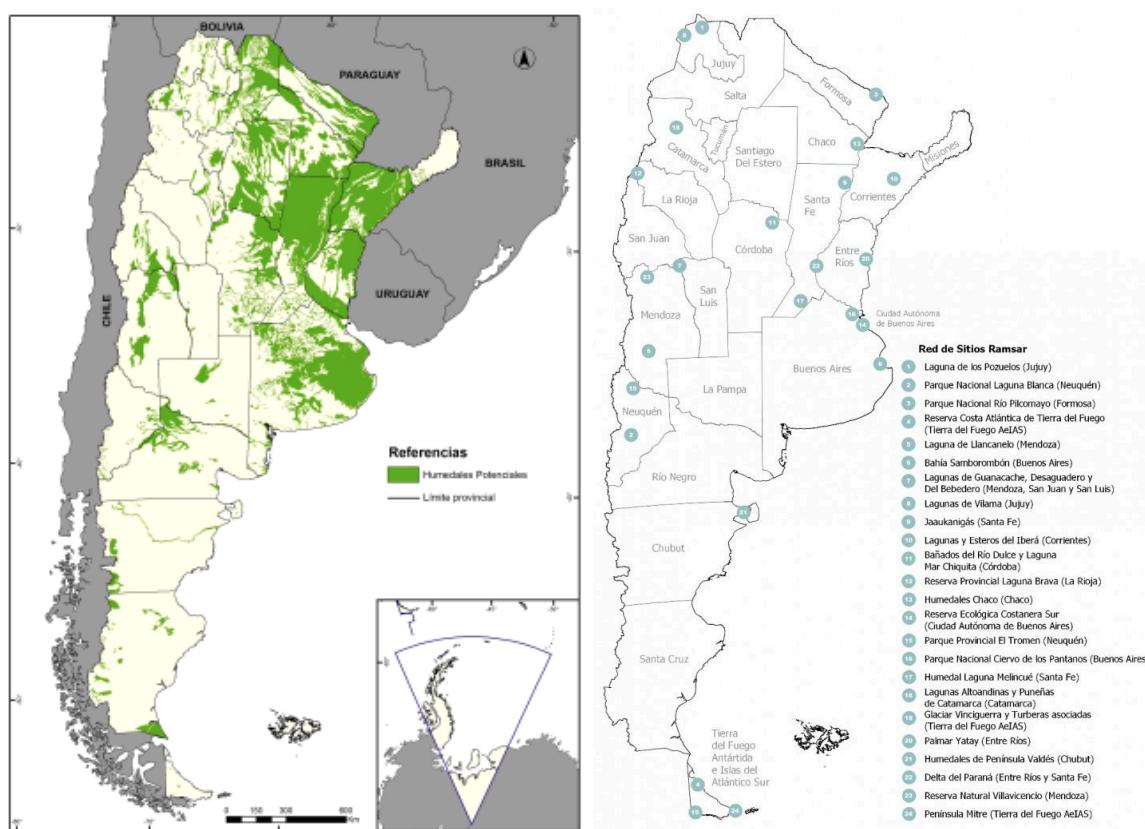


Figura 1.2: Mapa de humedales a escala regional según criterio basado en la cartografía de suelos. Tomado de Kandus et al., 2008 (izquierda). Mapa indicando los 23 sitios Ramsar a los que la República Argentina adhiere (Ramsar) (derecha).

La república Argentina, además de adherir a la Convención sobre los Humedales (Ley 23.919 con enmiendas en Ley 25.335) y de designar los sitios Ramsar, tiene contemplados estos sitios como áreas naturales protegidas (Ley 22.351). También ha adherido en 1922 a la Convención de la Diversidad Biológica (CBD) (Río de Janeiro, 1992) y posee diversas leyes que protegen estos ambientes, por citar algunas: El ex-Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación (al menos hasta 2023) llevó a cabo un Inventario Nacional de Humedales, junto a científicos y técnicos en el marco de lo establecido por la Ley General del Ambiente (Ley 25.675) y la Convención sobre los Humedales (Ley 23.919 y modif.). El objetivo es establecer una herramienta informativa para el ordenamiento ambiental del territorio y la gestión de estos ecosistemas (Marco del Inventario Nacional de Humedales, 2020). Adicionalmente, se ha sancionado la Ley Nacional

Nº 26.331 de Presupuestos Mínimos de Protección Ambiental de los Bosques Nativos, que regula tanto el “enriquecimiento” como la restauración, conservación, aprovechamiento y manejo sostenible de los bosques nativos y de los “servicios” ambientales que brindan a la sociedad. Así como también el Plan Integral Estratégico para la Conservación y el Aprovechamiento Sostenible de la Región Delta del Paraná (PIECAS – DP) (la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, 2008). Adicionalmente, en los años 2013, 2015, 2018 y 2020 se han presentado diversos proyectos de “Ley de Humedales” con el objetivo de proteger y preservar los humedales a través de un inventario nacional, un fondo nacional, un programa nacional de conservación y un consejo constitutivo. Estos proyectos, especialmente los más recientes, han sido acompañados fuertemente por la población (*Figura 1.3*). La pérdida de estado parlamentario de esta ley, a pesar del acompañamiento popular que tuvo, da cuenta de la necesidad de regulaciones nacionales e internacionales en pos de la conservación de los humedales, especialmente considerando que según relevamientos Ramsar (2018) desde el 1700 d.C. se han perdido al menos el 87% de los “recursos” mundiales de humedales con un descenso progresivo continuo, con particular foco en América Latina y una tasa media anual de pérdida de humedales 25% (mayor que su equivalente para bosques naturales entre 1990 y 2015), mientras que los humedales artificiales se han duplicado desde 1970. Por lo tanto, desde diversos sectores se promueve y propone el trabajo interdisciplinario de profesionales y participativo de las comunidades locales en los proyectos de planificación y gestión, así como en los instrumentos jurídicos (Convención Ramsar 2017). También la aplicación de incentivos económicos y financieros, prácticas de producción y consumo sostenibles en sectores influyentes de manera directa o indirecta en los humedales, el uso racional y la participación del público en la planificación del desarrollo a escalas más amplias, la integración de perspectivas diversas en el manejo de los humedales, etc. (Convención Ramsar, 2018).



Figura 1.3: Organizaciones socioambientales y vecinxs autoconvocados reclaman en el puente Victoria-Rosario por la Ley de Humedales y contra el ecocidio producto de incendios en la zona del Delta (Análisis digital, 2022).

1.1.1. Ecorregión Delta del Paraná

El Delta del Río Paraná es un humedal ubicado en la ecorregión del Delta e islas del Paraná (*Figura 1.4*). Está constituido por 5.625.406 ha que corresponden al 0,14% del territorio nacional de las cuales 11.904 ha se encuentran bajo protección Nacional: Parque Nacional Ciervo de los Pantanos (Pcia. Buenos Aires), Parque Nacional Pre-Delta (Pcia. Entre Ríos), Parque Nacional Islas de Santa Fe (Pcia. Santa Fe) y Parque Nacional Laguna el Palmar (Pcia. Chaco) -Tabla A.2, Anexo-. Cabe destacar que esta ecorregión es atravesada por el Río Paraná, principal vía fluvial comercial y estratégica para Argentina así como para países limítrofes (Ministerio del Interior de la República Argentina).

Esta región posee alta heterogeneidad ambiental producto de las geoformas de sus mosaicos así como por el régimen hidrológico que atraviesa -Figura 1.6- (Quintana y Bó, 2011), el cual se encuentra dominado por las inundaciones de los ríos Paraná, Gualeguay y Uruguay, así como por las mareas y tormentas provenientes del estuario del Río de la Plata y las precipitaciones locales (Baigun et al., 2009). Los picos principales de su inundación se dan en marzo (producto de las precipitaciones en la cuenca superior) y en junio-julio (producto de las precipitaciones en el alto río Paraguay, mientras que los niveles más bajos se registran en septiembre, con excepción del efecto del fenómeno climático El Niño, que genera inundaciones en la región (Kandus et al., 2019). El promedio de caudal del Paraná varía entre 16.000m³/s y 60.000m³/s convirtiéndolo en el segundo río más grande y largo de Sudamérica (Neiff et al., 1994; Latrubesse et al., 2005). Tal es así que el río Paraná transporta hacia su desembocadura 160 millones de toneladas anuales de sedimento (limos (56%), arcillas (28%) y arenas (16%)-Kandus et al., 2019-. Esto implica que las islas del Delta pueden llegar a crecer a razón de 60 metros anuales (Benencia y Pizarro, 2018).



Figura 1.6: Perspectiva desde vista aérea del Delta del Río Paraná (Fotografía del Ministerio del Interior de la República Argentina).

A pesar de las leyes y sitios protegidos con los que cuenta la República Argentina, en la actualidad se enfrentan importantes procesos de pérdida y degradación de humedales. Las tres presiones principales que afectan a la Ecorregión del Delta del Paraná son las plantaciones, la ganadería comercial y la urbanización. Estas últimas se asocian a los altos valores de la superficie transformada (Sica et al., 2016; Nanni et al., 2020). Por ejemplo, en el Bajo Delta del Río Paraná -porción terminal- (Bonfils, 1962), en Argentina, en solo 14 años (1999-2013) se perdieron 88.500 ha de humedales, lo que representa una disminución del 41,85% del territorio. Esto resulta preocupante, especialmente considerando la diversidad de unidades de paisaje (*Figura 1.7*) en el sector, entendidas como componentes de un sistema de paisajes que se caracterizan por compartir su configuración espacial y funcionamiento y, además, ser diferenciables de otras (Kandus et al., 2019).

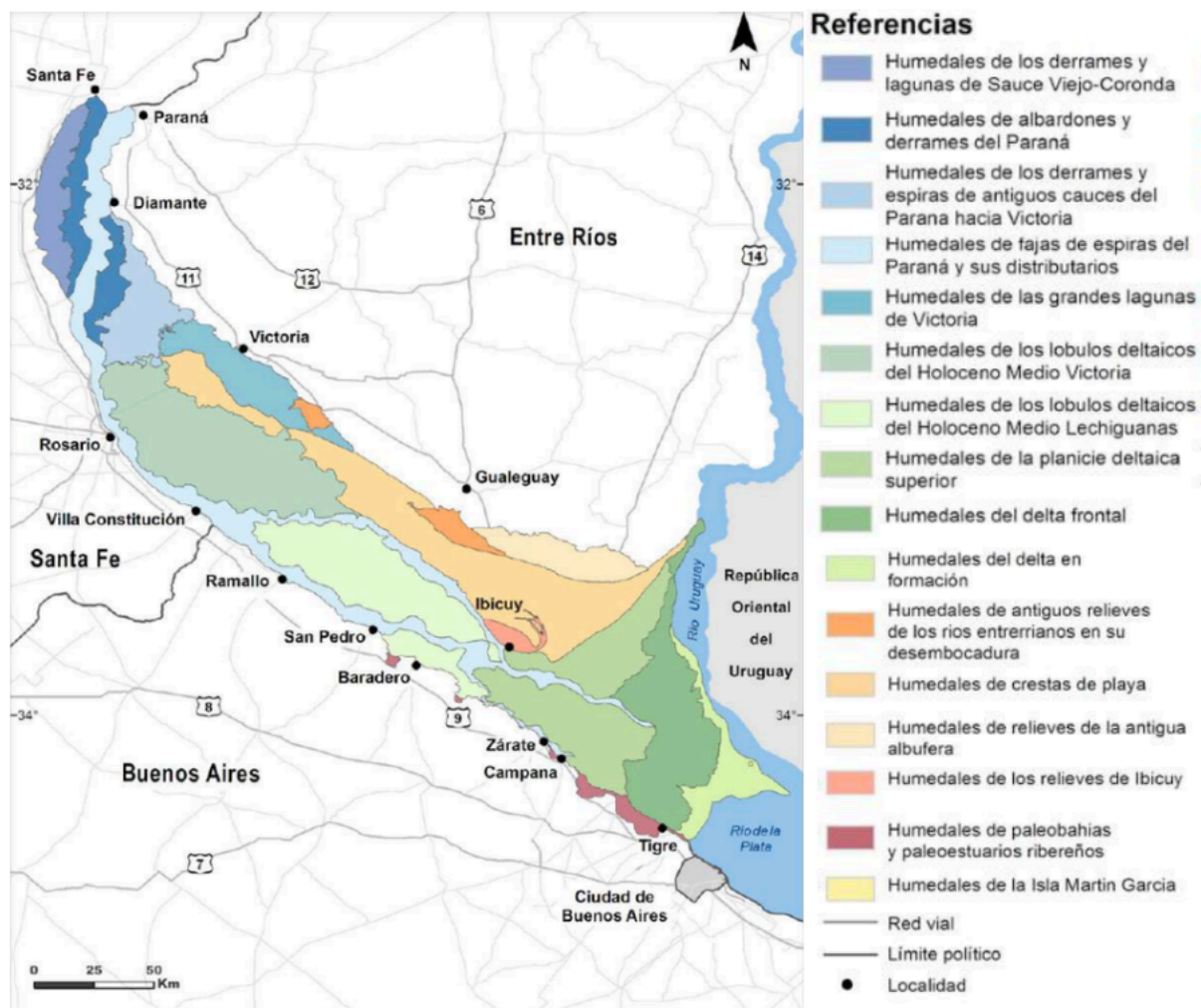


Figura 1.7: Unidades de Paisaje de Humedales del complejo fluvio-litoral del Bajo Paraná, extendido desde las ciudades de Santa Fe (Pcia. de Santa Fe) y Paraná

(Pcia. de Entre Ríos) aguas arriba hasta el Río de la Plata frente a la Ciudad de Buenos Aires (Extraído de Kandus et al., 2019).

Bajo Delta del Paraná

La porción terminal, de más reciente formación, de la ecorregión del Delta del Paraná es denominada Bajo Delta, se ubica en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos por debajo del río Ibicuy y hasta la desembocadura del Delta del Paraná (*Figura 1.7*) -Benencia y Pizarro, 2018-. Originalmente fue habitada por comunidades de las etnias Guaraní y Goya-Malabrigo (genéricamente: chaná-timbú) hasta fines del siglo XVII, cuando fueron erradicadas y asesinadas durante el proceso de colonización (Lothrop, 1946, Bonomo et al., 2019, Loponte et al., 2013 - *Figura A.1 Anexo*). Las islas del Bajo Delta se ven principalmente afectadas por las mareas lunares del estuario del Río de la Plata (1m de amplitud) así como por los vientos del noroeste y sudeste. Los primeros generan bajas en el nivel hídrico de la cuenca mientras que aquellos del sudeste generan elevaciones en los niveles hídricos (hasta 2,5m encima de la media) por horas o incluso días (Kandus, 1997). Además de la interacción de las crecidas por la influencia de los diferentes ríos que lo atraviesan (Pereyra et al., 2019).

Esta región se compone por un mosaico de humedales cuyas islas originalmente presentaban albardones (elevaciones en el territorio sobre sus costas sinuosas) con un bosque ribereño, selva marginal o Monte blanco (Burkart, 1957) y en su interior bajos de pajonales y juncuales, inundados permanentemente (Fracassi et al., 2013) -*Figura 1.8*-.



Figura 1.8: Esquema con perspectiva lateral del Bajo Delta del Río Paraná (Fracassi et al., 2013).

Actualmente el paisaje se encuentra sujeto a continuas modificaciones antrópicas, producto de las cuales, por ejemplo, sólo quedan relictos del Monte blanco ya que éste ha sido utilizado como combustible, para edificaciones y luego, sustituido por plantaciones forestales comerciales (Fracassi et al., 2013 y Kalesnik et al. 2008). Esto resulta contradictorio con el hecho de que la biodiversidad sea un “recurso” relevante para el funcionamiento de los agroecosistemas (Altieri et al., 1999 y Swift et al., 2004). El bosque nativo del Delta ocupa el 4% de la vegetación y se ubica en los sectores menos inundados, tales como albardones y espiras de meandro (Kandus, 2019) mientras que más del 80% de la superficie es cubierta por plantas herbáceas (Salvia et al. 2010, Morandeira 2017). Además cuenta con gran diversidad animal: se han relevado 50 especies de mamíferos, más de 260 especies de aves no paseriformes, 37 reptiles, 27 especies de anfibios (Bó y Quintana, 2013, Quintana y Bó, 2013, Plan integral estratégico para la conservación y aprovechamiento sostenible en el Delta del Paraná, 2008) y 200 especies de peces (Sverlij et al. 2013). Si bien los estudios correspondientes a la biodiversidad de invertebrados se encuentran subrepresentados, se reportaron 22 especies gasterópodos terrestres y 31 especies de bivalvos (Darrigran et al., 2014). En cuanto a artrópodos, se reportaron entre 300 y 302 especies de Heteroptera en el Bajo Delta del Paraná (Carpintero et al., 2014) y 105 especies de Lepidoptera (Núñez Bustos, 2014). Cabe destacar que para muchas de estas especies la región se corresponde al límite sur de su distribución, lo cual resalta la importancia de la conservación de la zona, especialmente para aquellas amenazadas (Kandus 2019). Otro elemento a tener en cuenta es que existen en esta región 48 especies de interés para la conservación, ya sea por su función ecosistémica o bien por su interés económico y social (en pastizales y pajonales: 13 especies, bosques y selvas: 8 especies, ambientes acuáticos: 27 especies. De las cuales son, aves: 19 especies, mamíferos: 9 especies, peces: 9 especies, reptiles: 7 especies, anfibios: 3 especies y plantas: 1 especie) -Reggio, Manzione y Sagrista, 2021-.

En particular, el bosque más característico de la región del Bajo Delta es el Monte blanco. Posee mayor complejidad estructural y riqueza que el bosque situado en la porción media y superior. Dentro de esta región biodiversa (151 especies), se destacan la gran cantidad de enredaderas (26 especies), epífitas (15 especies) como la orquídea flor de pajarito (*Oncidium bifolium*), herbáceas (67 especies) y formas de vida arbóreas y arbustivas de origen paranaense (43 especies) -“Plan integral estratégico para la conservación y aprovechamiento sostenible en el Delta

del Paraná”, 2008-. En cuanto a los usos de estas especies por parte de humanxs, resulta relevante su conservación ya que pueden utilizarse especies herbáceas para pastoreo del ganado o como alimento de especies silvestres de interés, por sus usos medicinales, culinarios, de apicultura, indumentaria o como atractivo turístico mientras que especies de animales silvestres son utilizadas como alimento, consumo o fines turísticos (Kandus et al. 2010, Kandus et al., 2019).

1.1.2. Historización de la producción local

Antiguamente las comunidades de pueblos originarios utilizaban la región para la caza, pesca, recolección, horticultura a pequeña escala sobre montículos de tierra y también para entierros funerarios (Bonomo et al., 2019). A partir del siglo XIX el Bajo Delta del Paraná ha sufrido las mayores modificaciones antrópicas, producto de la colonización de este territorio considerado inhóspito en ese entonces (Benencia y Pizarro, 2018 y Ortiz, 2020). En un principio, el Monte blanco fue deforestado para ser utilizado como combustible. Posteriormente, con oleadas inmigratorias principalmente provenientes de Europa -en particular del país Vasco y Portugal (Ortiz, 2020), se consolidaron producciones frutihortícolas en la región -Figura 1.9- (Fracassi, 2017). El tipo de producciones agrícolas se caracterizaron por ser de tipo occidental, es decir, se basan en la simplificación de la biodiversidad -o su ausencia en monocultivos- y, por ende, la disminución de enemigos naturales de las especies consideradas problemáticas por agricultores; además requieren de intervención humana constante (Schoonhoven et al., 2005). A mediados del siglo XIX se introdujo, con fines de producción forestal, el “sauce americano” (*Salix babylonica* var. *Sacramenta*), que paulatinamente sustituyó al “sauce criollo” (*Salix humboldtiana*) en su uso comercial maderero. La introducción se debió a múltiples características que hacían a la especie una gran candidata para su cultivo a gran escala en la región, tales como el hecho de que el largo de su fibra resulta óptimo para pasta de papel, la propagación por vía agámica, resistencia al anegamiento, rápido crecimiento, capacidad de rebrote, etc. En esta línea, luego se introdujo el “álamo criollo” (*Populus nigra*) con fines comerciales. Paralelamente, en la década del '50 el Estado Nacional impulsó la actividad forestal (mono-producción de álamo y sauce) a gran escala con el objetivo de reemplazar la actividad frutícola (diversificada). El objetivo de estos

productos era que las “principales” ciudades (Buenos Aires y Rosario) contaran con papel y madera como materia prima, a la par que se impulsó la transformación de la pequeña producción familiar a un tipo de agricultura capitalista moderna (Camarero et al. 2018). Luego, en los años ‘60 la producción frutihortícola entró en crisis como modelo productivo dominante y en los ‘80 esta crisis se profundizó por una serie de inundaciones, heladas, el elevado costo del transporte, el desarrollo de otras regiones productoras con más competitividad y la promoción estatal de la producción forestal (Benencia y Pizarro, 2018). Por lo tanto, ésta última se convirtió en la matriz productiva dominante. Con el tiempo, luego de los 90’s, la producción pasa del tipo familiar, con pequeñxs y medianxs productores y pequeños aserraderos, a grandes productores como Papel Prensa S.A. en San Pedro y Falpac S.A. en Zárate (Signorelli y Battistella, 2013). Este cambio en la escala productiva se basa en la pérdida de competitividad y la brecha tecnológica (Fracassi, 2013). Cabe destacar que esta industria se fortaleció con leyes nacionales que impulsaron la producción a gran escala (Ley Nacional N° 25.080 de Inversiones para Bosques Cultivados - 1999). Sin embargo, esta actividad no es percibida como el mero producto de una imposición externa de parte de las instituciones estatales, pues es considerada por lxs habitantes de la zona como parte estructurante de su identidad socio-cultural (Pizarro y Straccia, 2018). De este modo, el esquema productivo de la plantación familiar, que se caracterizaba por utilizar aproximadamente el 30% de la superficie del terreno sobre albardones (donde se deforestó el monte blanco para plantar álamos) y pajonales (donde se plantaron sauces), que ocupaban los límites exteriores de la isla aproximadamente hasta unos 1000 mts hacia adentro, se cambió por un sistema de “mayor alcance” a raíz del avance hacia el interior de las islas. Como resultado de estas modificaciones en la escala productiva la unidad económica forestal pasó de tener 150 ha hacia fines de los ‘80 a 300 ha a mediados del 2000, se implementaron endicamientos que incluían el cierre de ciertos predios, llamados “sistemas cerrados” que permitieron la incorporación de maquinarias dado el control sobre las inundaciones y también medianos productores incorporaron la ganadería como complemento. Como resultado, el paisaje preponderante pasó a ser el monocultivo de clones comerciales de Salicáceas -sauces, *Salix spp.* y álamos, *Populus spp.*- (Fracassi, 2013). Y la región se consolidó como el sector productivo más importante para estos cultivos en el país (Benencia y Pizarro, 2018).

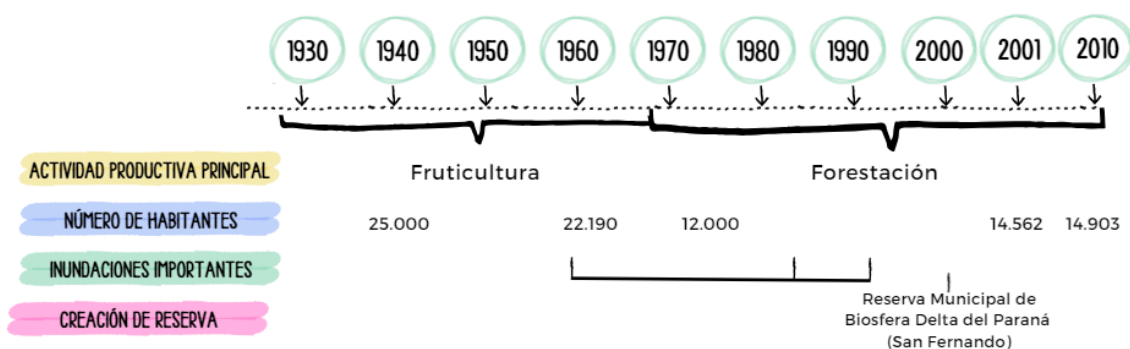


Figura 1.9: Trayectoria temporal de la población del Bajo Delta del Río Paraná y los principales elementos que modelaron su dinámica (tamaño poblacional, actividad principal e inundaciones más relevantes) según Cerrillo et al, 2015.

En las últimas décadas, la cuenca forestal se ha concentrado y ocupa 20% menos territorio que en los años 60' y 70'. Sin embargo, ello se debe no sólo a la modificación de la escala sino también a la concentración de la producción en grandes empresas productoras que utilizan prácticamente la totalidad del territorio disponible para la producción (Fracassi et al., 2013), que a su vez, continúa centrándose en producciones forestales y sistemas silvopastoriles (Figura 1.10) -Quintana et al., 2014-. En los últimos años las empresas forestales de la zona se han nucleado en la Regional Delta de la Asociación Forestal Argentina (AFoA) donde en conjunto poseen 55.000 ha de las cuales 32.000ha (58,2%) se encuentran forestadas con Salicáceas (Fracassi et al., 2013). Este núcleo empresarial mostró interés por normas de certificación forestal y en procedimientos documentados de gestión forestal en conjunto con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en donde dichas certificaciones requieren cumplir con ciertas prácticas de cultivo y compromiso con la protección del medio ambiente, de acuerdo al tipo de certificación en cuestión. La propuesta del INTA radica en la fusión del conocimiento científico-tecnológico y la experiencia acumuladas de gestión forestal en la zona.

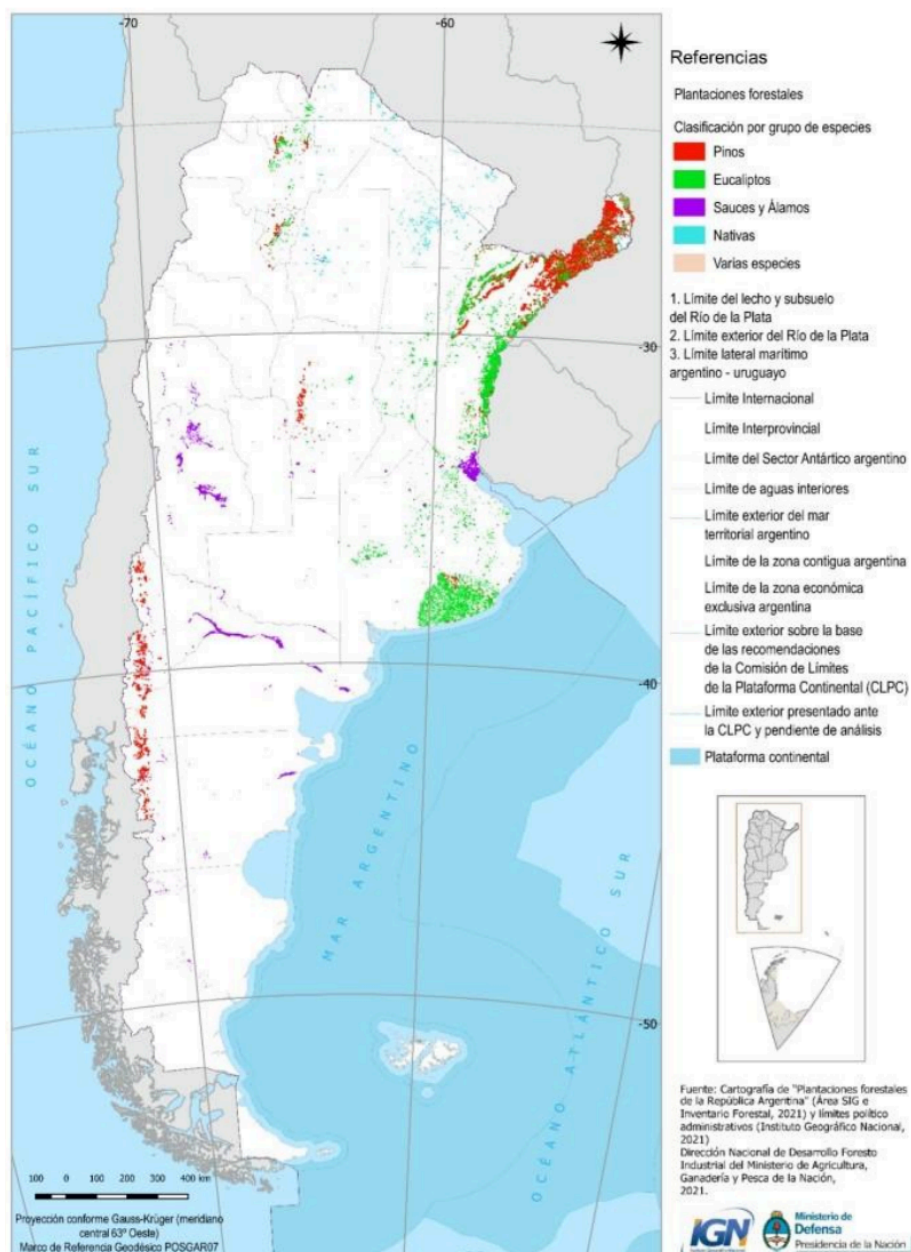


Figura 1.10: Mapa de la producción forestal 2023 en la República Argentina según grupos de especies tomado del Informe de plantaciones forestales del sistema de monitoreo, inventario y acceso a la información de la república de la nación (2023).

Tal es así que la provincia de Buenos Aires en 2023 se ubicó tercera a nivel nacional en cuanto a superficie con plantaciones forestales comerciales con 81.654ha, que corresponden al 6,3%, de los cuales álamos y sauces (*Populus spp.* y *Salix spp.*, respectivamente) representan 46.575ha, 57,04% según el informe de plantaciones forestales -Sistema de monitoreo, inventario y acceso a la información 2023-. En el Bajo Delta del Paraná se ha reportado que el 92,40% de la superficie de plantaciones forestales se dedica a álamos y sauces, de las cuales el

6,57% se corresponde a árboles jóvenes que luego de su total crecimiento se utilizan con fines de laminado, aserrado o bien como pasta de celulosa (Figura 1.11). La superficie restante (6,7%) se compone de plantaciones de eucaliptos, pinos, especies varias y sectores no identificados -Tomado del Tablero de plantaciones forestales. Ministerio de Economía. Secretaría de Agricultura, ganadería y pesca, 2024-.

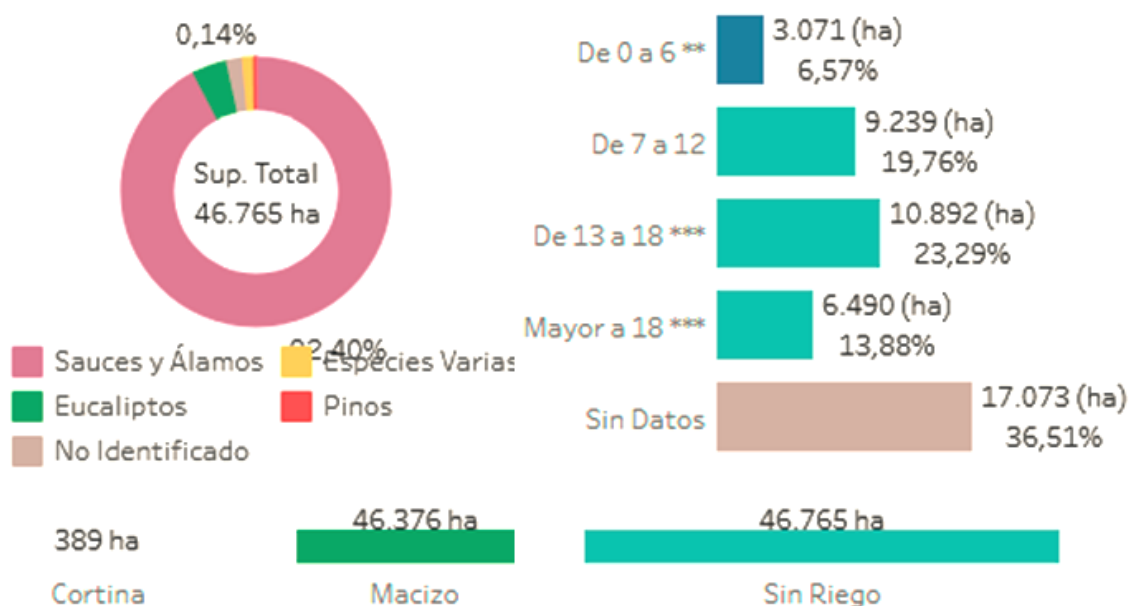


Figura 1.11: Caracterización de la producción forestal en Delta del Paraná, Pcia. de Buenos Aires en 2023. Proporción de especies cultivadas en las hectáreas de macizo forestal (izquierda). Cantidad de hectáreas de árboles del macizo forestal según su edad (derecha). (Tomado del Tablero de plantaciones forestales. Ministerio de Economía. Secretaría de Agricultura, ganadería y pesca, 2024).

Éstos últimos datos (Figura 1.11) se corresponden a plantaciones conjuntas de álamos (*Populus spp.*) y sauces (*Salix spp.*), asociados a la ganadería a cielo abierto en pastizales generados por endicamientos, donde el ingreso de los animales se da una vez que los árboles son adultos, es decir, que no son vulnerables al ganado. Cabe destacar que este tipo de actividad, denominada *silvicultura*, afecta tanto la estructura como el funcionamiento del ecosistema en tanto que la exclusión de la misma permite el restablecimiento de la integridad ecológica del territorio, lo cual a su vez tiene consecuencias positivas para esta actividad ya que mejora la calidad del suelo y el follaje (Quintana et al., 2014). La intensificación en estas actividades

asociadas a una infraestructura del manejo hídrico (canales, terraplenes, endicamientos y terrenos ganados al humedal por medio de sequías artificiales) -Figura 1.12- y también asociadas a la falta de regulación legal, generó como consecuencia pérdidas en los componentes estructurales y funcionales de la vegetación del humedal, alteración de las comunidades vegetales, heterogeneidad espacial en relación al régimen hídrico y, disminución de la diversidad funcional del ecosistema (Aquino et al., 2024). Así como el hecho de que como resultado de la homogeneización y la modificación del paisaje se pone en riesgo no sólo la supervivencia de diversas especies sino también la capacidad de adaptación a estos cambios drásticos del entorno. Adicionalmente, la intensificación agrícola y la simplificación del sistema (monocultivos) es posible por el uso de insumos químicos y/o mecánicos (Fracassi et al., 2014). Como consecuencia, se ha evidenciado contaminación química y microbiológica tanto en el agua como en animales (ej. pesticidas) asociados a este tipo de actividades. Incluso, se reveló un riesgo elevado en la calidad del agua y se proyecta su incremento para 2050 (Convención Ramsar, 2018). Adicionalmente, al terrestrializar y pampeanizar el ecosistema (Blanco y Méndez, 2010) se presentaron diversas dificultades tecnológico-productivas asociadas a los cultivos de salicáceas, como falta de conocimiento sobre el impacto del cultivo, falta de infraestructura y mano de obra, problemas fitosanitarios como el taladro de los forestales, avispa sierra y roya, que son paliados mediante el uso de insecticidas (Benencia y Pizarro, 2018).

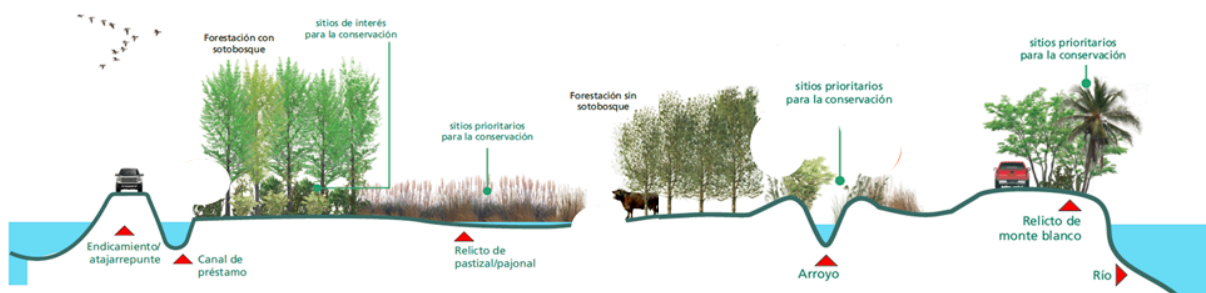


Figura 1.12: Corte transversal esquemático de los ambientes más frecuentes del sector productivo del Bajo Delta (modificado de Fracassi, 2017).

Por otro lado, además de las actividades silvopastoriles, son comunes las actividades con fines turísticos o recreativos tales como caza deportiva menor,

ecoturismo, deportes náuticos, pesca deportiva, playas y balnearios. Una de las principales actividades de la población local (*Figura 1.13*) es la apicultura, tanto a escala familiar como comercial, con colmenas transitorias (trashumantes) o fijas (en altura), con al menos 45 especies vegetales utilizadas con estos fines, de las cuales 62,2% son especies nativas; dentro de las especies exóticas visitadas por las abejas se destacan sauces y álamos. Por otra parte, en la caza local diversas especies son utilizadas por sus usos comerciales, de subsistencia o deportivos (porcentaje de especies utilizadas respecto a las especies totales: mamíferos: 27,6%, aves no passeriformes: 27,3%, reptiles: 27,0% y anfibios: 25,9%) de las cuales dentro de las especies más utilizadas el 100% es utilizado con fines de subsistencia (Kandus et al., 2010). En este contexto cabe destacar que lxs pobladores perciben un deterioro en el estado del ambiente físico, evidenciado por decremento en la calidad del agua, aumento en cantidad de basura que arrastran ríos y arroyos y, en el tránsito de embarcaciones; mientras que en cuanto a la calidad del agua observan deterioros en la misma e incluso en su salud, en algunos casos. Por otro lado, lxs pobladores realizan actividades de caza y pesca en la zona. En éstas las especies reportadas en la pesca son menores a las registradas en la región mientras que en el caso de la caza se reportan eventos oportunistas con aquellas especies que encuentran. Sin embargo, dado que la caza es una actividad ilegal lxs investigadores creen que las respuestas subestiman la actividad. De este modo, puede concluirse que la caza y la pesca se concentran en pocas especies. y constituyen ingresos fundamentales para lxs pobladores (Cassini y Túnez, 2019).

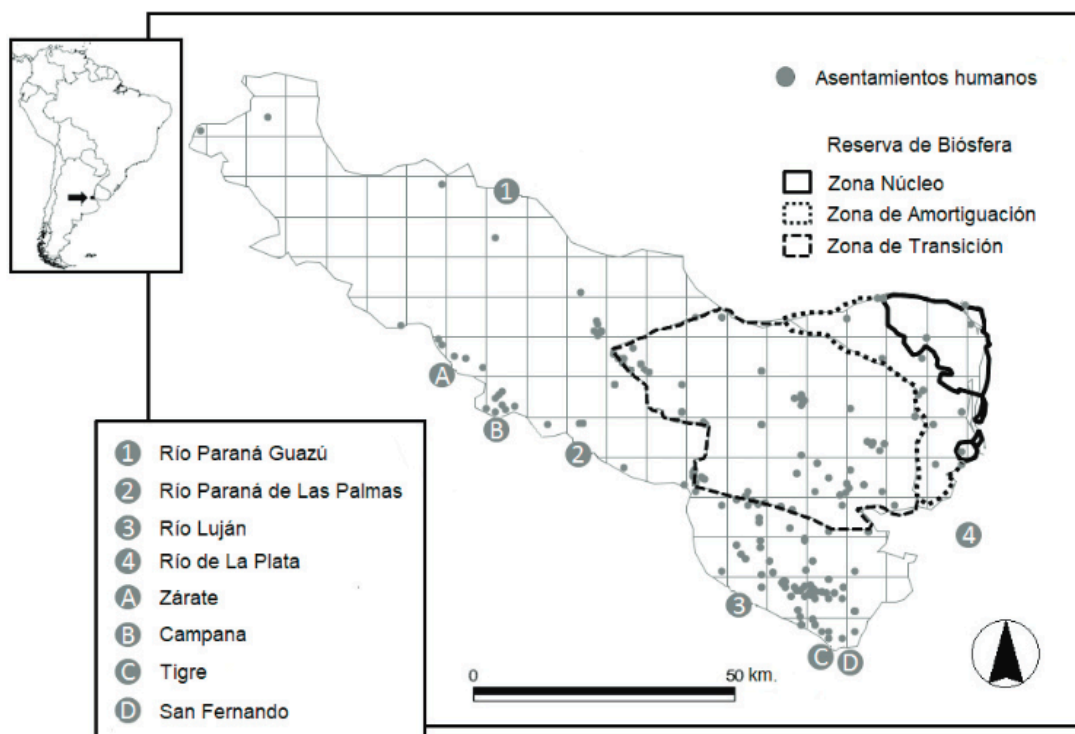


Figura 1.13: Mapa de asentamientos humanos en la zona del Bajo Delta del Paraná. Se destacan: Reserva de biosfera, zona núcleo, zona de amortiguación y zona de transición, así como ciudades cercanas (Cassini y Túnez, 2019).

En el marco de diversas regulaciones previamente mencionadas y en pos de las funciones ecosistémicas del ambiente así como de la integridad ecológica, se han propuesto diversas prácticas para el uso antrópico sostenible en la región (Astrada, 2023; Baigún, 2013; Casaubón y Tassano Viaña, 2012; Cerrillo et al., 2015; Fracassi et al., 2013; Fracassi, 2017; Gurini et al., 2020; Quintana et al., 2014). Sin embargo, el estado (desde INTA y/o la Subsecretaría de Desarrollo Foresto Industrial-Ministerio de Agroindustria) ha apostado al mejoramiento de las condiciones de producción y rindes, desde un enfoque en superficies relativamente extensas (Camarero et al., 2018), es decir, en detrimento de la diversificación y la heterogeneidad del ambiente. En este sentido se realizó en 2019 el Plan Estratégico Forestal y Foresto-Industrial Argentina 2030 (*Figura 1.14*), liderado por la Secretaría de ambiente y desarrollo sustentable, el Ministerio de agricultura, ganadería y pesca y, los Ministerios de Producción y Trabajo, Salud y Desarrollo Social, Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología, la Presidencia de la Nación; con la colaboración de The Nature Conservancy Argentina (TNC), organizaciones privadas y no gubernamentales y, la mesa de competitividad

Foresto Industrial. Según su informe, esto implica la articulación entre el sector público, la sociedad civil y el sector privado que apunta a la conservación y ampliación del patrimonio forestal argentino y la activación de una economía forestal que impulsa el desarrollo social, económico y ambiental. El objetivo será el uso *sustentable* de los “recursos” generando oportunidades para economías regionales mientras que se valoran los bosques, sus “servicios” ecosistémicos y su rol ante el cambio climático (incluyendo manejo y prevención del fuego). Se priorizan bosques nativos, plantaciones forestales, celulosa y papel, madera y muebles, construcción con madera y bioenergía e innovación. Con ejes en la protección, administración y restauración de los bosques nativos y cultivados así como en la industria y energía; en los productos tanto para el mercado interno como para la exportación, aumentando la proyección de la escala de ésta. No obstante, esta sustentabilidad es problematizada, ya que pretende no sólo asegurarla en términos ambientales, económicos y sociales sino que aporta la dimensión temporal de hacerlo para las generaciones presentes y futuras contemplando que todxs lxs lugareñxs puedan permanecer en su territorio (Benencia y Pizarro, 2018).

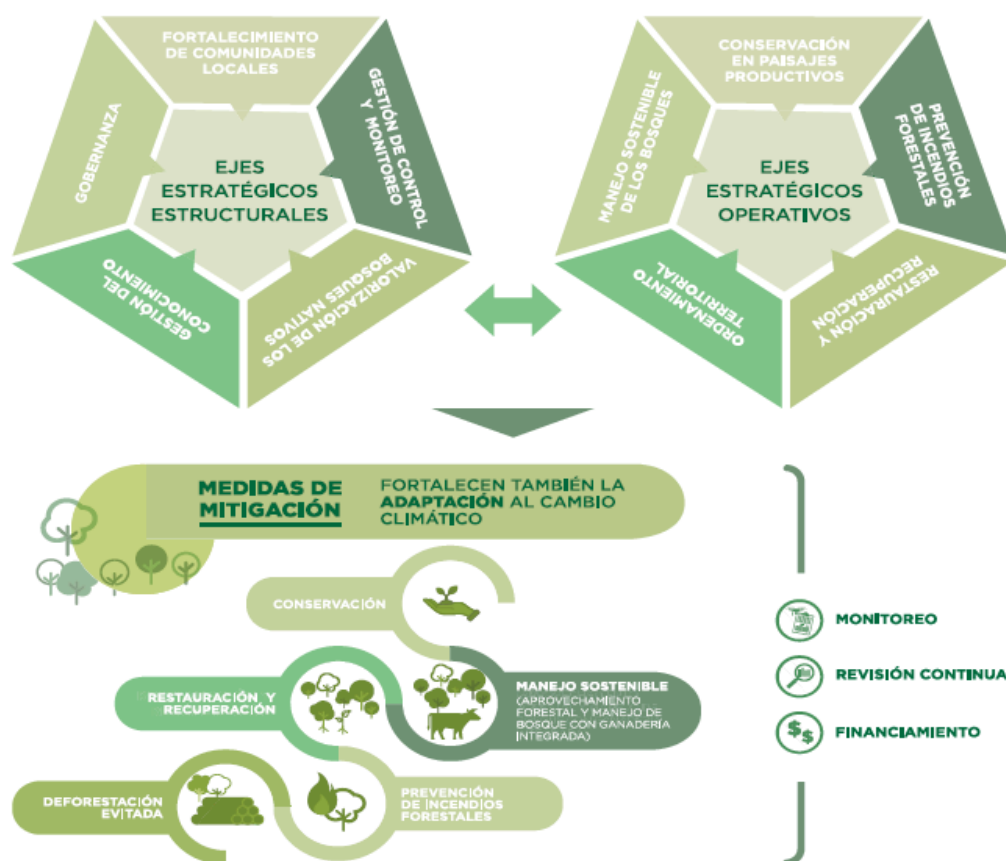


Figura 1.14: Esquema de los ejes estratégicos estructurales y operativos y las medidas de mitigación del plan estratégico forestal y foresto industrial de la nación para 2030. Gráfico tomado del Plan Estratégico Forestal y Foresto-Industrial Argentina 2030 (2019).

En la actualidad la región del Bajo Delta del Paraná contiene como las predadoras de plantaciones forestales jóvenes más importantes a las hormigas cortadoras *A. ambiguus* y *A. lundii*, (Sanchez-Restrepo et al., 2019). Estas plantaciones son parte de producciones a gran escala (monocultivo) de Salicáceas pertenecientes a grandes empresas que concentran la producción con impactos significativos en la ecorregión. Además, cabe destacar que la emigración rural, y particularmente de mujeres jóvenes, continúa en aumento mientras que, cada vez más ONGs (nacionales e internacionales), alineadas a la convención Ramsar, se interesan por este territorio. La Zona Núcleo Forestal, entonces, resulta en un territorio en disputa, entre los diferentes agentes involucrados pero también de cara a la sociedad, lo que presenta múltiples tensiones, particularmente en lo que refiere a

marcos normativos de protección ambiental y ordenamiento territorial (Camarero et al., 2018).

1.1.3. Sitio de estudio

El sitio de estudio de campo se ubica en la Estación Experimental Agropecuaria Delta del INTA, ubicado en el Río Paraná de las Palmas y Canal Laurentino Comas - 4ta. Sección de Islas CC14 (2804), Campana, Buenos Aires (*Figura 1.15*). Este sector se encuentra dentro de la denominada Zona Núcleo Forestal (entre área circundante a ríos Carabelas, Canal Alem y Arroyo Las Piedras, limita al sur con Paraná de las Palmas y al norte con el Paraná Guazú. Partidos de Campana y San Fernando, Provincia de Buenos Aires), término acuñado por la propia institución (INTA) para nombrar al sector con mayor producción y productividad forestal y silvopastoril de la región (Camarero et al., 2018).

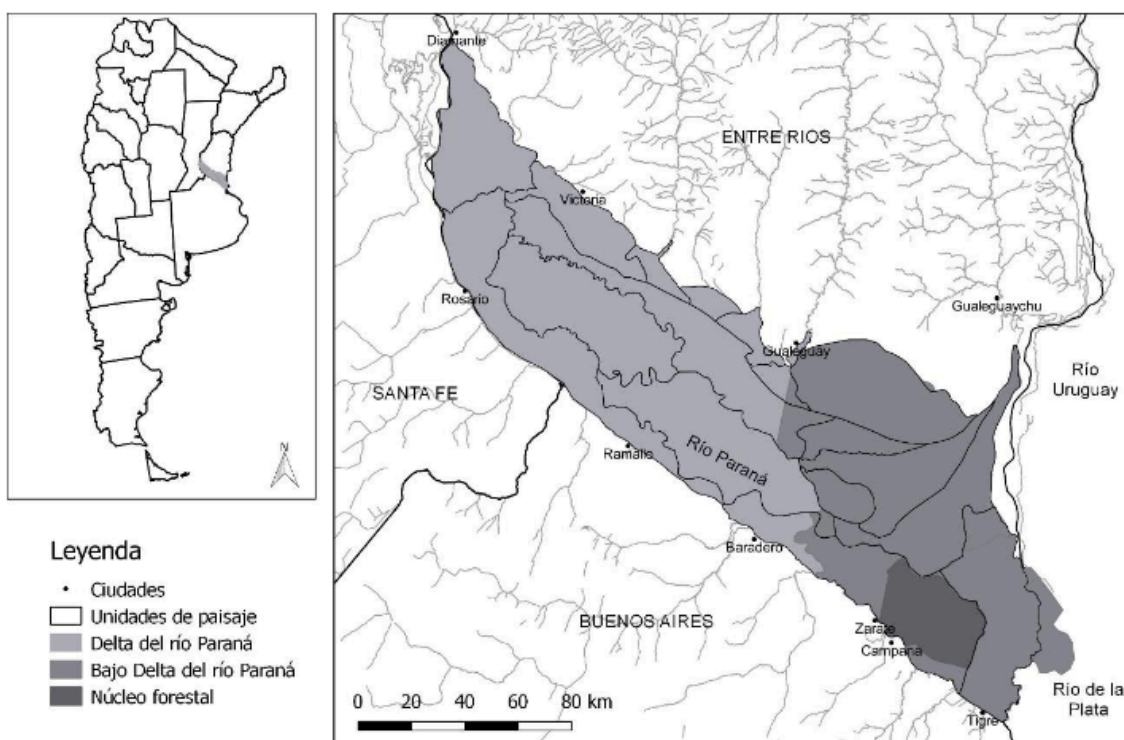


Figura 1.15: Mapa de la ubicación del Delta del río Paraná con detalle del Bajo Delta del río Paraná. Se destaca en gris oscuro el núcleo forestal (tomado de tesis doctoral Krug 2018).

1.2. Efecto de las hormigas cortadoras de hojas en producciones de álamo (*Populus spp.*) y sauce (*Salix spp.*)

1.2.1 Problemática

Las hormigas cortadoras de hojas (Orden: Hymenoptera, Familia: Formicidae, Subfamilia: Myrmicinae, Tribu: Attini) se encuentran dentro de los invertebrados que generan mayor daño a las plantaciones en el Neotrópico (Fowler, 1978), entendiendo como tal el efecto de la herbivoría. Ésta se produce a raíz de la recolección de fragmentos vegetales provenientes de dicotiledóneas: hojas, flores, tallos, etc., que son transportados a un nido subterráneo donde el material vegetal es utilizado para cultivar un hongo (Holldobler y Wilson, 1990, Fowler y Robinson, 1979 y Forti et al., 2006). Este hongo simbiote es utilizado como única fuente de alimento de la hembra reproductora, machos, ninfas y, especialmente, las larvas (Littledyke y Cherrett 1976). Dado que recolectan grandes cantidades de material vegetal, las producciones forestales y agrícolas pueden verse perjudicadas por la herbivoría y por sus efectos secundarios (*Figura 1.16*). Es decir, aquellos producidos por otros organismos, oportunistas, que atacan las especies vegetales con daño en sus tejidos aprovechando las bajas defensas de las plantas en estos momentos (Stroud et al., 2022). Incluso se ha cuantificado que nidos de la tribu *Attini* pueden consumir cientos de kilogramos de hojas por año (Mikheyev, 2008). El efecto de la defoliación se manifiesta en distintos aspectos tales como: menor superficie fotosintética, con una consecuente deficiencia en la tasa energética dedicada al crecimiento; menor resistencia a enfermedades dada la disminución en su tasa energética y el tejido dañado y, crecimiento foliar desfasado con potencial susceptibilidad a otros herbívoros que se alimenten de hojas nuevas (Rockwood, 1973). Además este daño es más perjudicial para las especies vegetales en los primeros 3 años de vida (dos Santos et al., 2013). Estos efectos operan a tal nivel que pueden generar pérdidas económicas estimadas en millones de dólares estadounidenses por año (Bacci et al., 2009). Por estos motivos se considera que esta tribu contempla a los mayores herbívoros del Neotrópico, la mayor "plaga" de la agricultura en América (Cherrett 1986; Fowler, 1978) e incluso en Sudamérica es considerada la "plaga" más importante (Mikheyev 2008; Erthal et al. 2004). En particular, las hormigas cortadoras de hojas *Acromyrmex spp.* reducen la producción de madera y afectan el establecimiento de árboles (Montoya-Lerma et

al., 2012). Mientras que no es menor el hecho de que la tendencia a la homogeneización del paisaje, como sucede con producciones de monocultivo, promueven las poblaciones de especies generalistas como éstas (Fracassi et al., 2014 y Sánchez-Restrepo et al., 2019). Incluso, los extensos monocultivos resultan en condiciones favorables para insectos que pueden convertirse en “plagas” (Vasconcelos y Cherrett, 1997; Nickle et al. 2012). Además los monocultivos forestales de especies exóticas comerciales impactan sobre la diversidad de hormigas cortadoras de hojas de manera tal que favorecen a aquellas especies ecológicamente dominantes (Moutinho et al, 2003; Sánchez-Restrepo et al, 2019). En este sentido, también se propone que ocasionan pérdidas económicas de gran magnitud cuando se realiza un manejo incorrecto a causa de un plan de monitoreo equivocado (Sabattini, 2017). Otro elemento a tener en cuenta es que las hormigas cortadoras de hojas prefieren material vegetal con menor cantidad de defensas fisicoquímicas, generalmente asociado a hojas jóvenes (Vasconcelos & Cherrett 1995; Farji-Brener, 2001), pero también a las especies o variedades cultivadas en plantaciones forestales donde se prioriza la alta tasa de crecimiento en detrimento de las defensas vegetales (Jiménez, 2019). Por otro lado, las especies comerciales exóticas no han coevolucionado con las hormigas cortadoras de hojas, lo que presupone una falta en defensas específicas ante éstas por parte de las plantas.



Figura 1.16: Esquema y fotografía del efecto de la herbivoría producto de hormigas cortadoras de hojas en árboles jóvenes de salicáceas en plantaciones forestales (Fotografía: Dra. Patricia Carina Fernández).

En el Bajo Delta del Paraná se encuentran sólo dos especies simpátricas de hormigas cortadoras: *Acromyrmex ambiguus* (Emery, 1888) y *Acromyrmex lundii*

(Guérin, 1838) (Farji-Brener & Ruggiero, 1994). Además, la distribución de ambas correlaciona con territorios de plantaciones forestales en el norte de Argentina donde se las identifica como “plagas” importantes en la zona de Buenos Aires y Entre Ríos (Sánchez-Restrepo et al., 2019). Ambas especies presentan un comportamiento de recolección del material vegetal similar en el campo, que consiste en recolección en las horas más cálidas durante el invierno y por la noche durante el verano; mientras que en primavera se encuentran diferencias: *A. lundii* recolecta el triple de material seco a lo largo del día y en otoño; *A. lundii* colecta material durante el día y *A. ambiguus* sólo durante las horas más cálidas. Como consecuencia, el impacto anual de estas especies en material seco es de 26 kg/ha para *A. ambiguus* y de 83 kg/ha para *A. lundii* (Jimenez, 2019). Incluso en árboles jóvenes (menores a 6 meses de edad) puede producirse una reducción de hasta el 32% de altura, 25% de circunferencia y 60% de producción de madera (Della Lucía, 1993). Dado que este tipo de recolección de material vegetal se asocia a diferentes daños en las estructuras de las plantas así como a potenciales enfermedades asociadas producto del ingreso de patógenos, se vincula a las hormigas cortadoras con la mortalidad de los especímenes y el gasto económico asociado a estas problemáticas (Jimenez, 2019). De hecho, el control de las poblaciones de hormigas cortadoras de hojas es especialmente intenso en los primeros meses de vida, cuando los árboles son más vulnerables, y los primeros dos años de iniciada una plantación (Lewis y Norton 1973; Vasconcelos y Cherrett, 1997; Nickele et al., 2012) y puede llegar a representar hasta el 75% del presupuesto para el “manejo” de “plagas” (Cantarelli et al., 2008). En la zona Núcleo Forestal del Bajo Delta del Paraná la estrategia de control de hormigas cortadoras de hojas se realiza principalmente a través de cebos granulados, cuyos principios activos típicamente son la sulfluramida, el fipronil y los organofosforados. Éstos son afectados por la humedad del terreno y diluidos por el agua, que lleva al cauce del río los compuestos tóxicos (Bonmatin et al., 2015; Löfstedt et al., 2016; Perri et al. 2020). Este elemento de “mitigación” o “combate de la plaga” implica no sólo la liberación de compuestos tóxicos al ambiente sino también la dispersión del mismo, producto del transporte por las propias hormigas así como por el agua, generando efectos aún incalculables de los cuales no hay responsabilidad jurídica (entre otras) aún. Mientras tanto, las hormigas evitan los cebos tóxicos una vez que detectan que son nocivos para el hongo simbiote que ellas cultivan en el interior de sus nidos (Saverschek, 2010), tema que se abordará a continuación.

En relación a este tipo de químicos nocivos para el ambiente en las últimas décadas ha resurgido el interés general por la generación y utilización de productos que permitan controlar insectos que causan daño en las producciones vegetales sin los efectos negativos al ambiente y la salud humana que presentan los pesticidas industriales y sintéticos. Algunas propuestas para reemplazar a éstos últimos fueron pesticidas basados en nicotina, rotenona y piretrinas ya que son efectivos, se degradan rápido y por este motivo no se acumulan en las cadenas tróficas (Schoonhoven et al., 2005). Sin embargo, en los últimos años los sectores productores agronómicos están cada vez más supeditados a normas internacionales de “manejo responsable” a través de certificaciones de estándares internacionales que abogan por el buen uso de productos fitosanitarios y prácticas de mínimo impacto ambiental. El sector forestal no es una excepción y algunos ejemplos de estas normas son “Forest Stewardship Council” (FSC, por sus siglas en inglés) e ISO 14001 de Sistemas de Gestión Ambiental. De este modo, resulta inevitable la sustitución de agroquímicos (Lecuona et al., 2015) y, para ello, es imprescindible el estudio de los sistemas biológicos en que estas producciones están inmersas. No obstante, no hay información adecuada sobre las especies que son parte de los agroecosistemas, lo cual obstaculiza el diseño de estrategias efectivas y poco invasivas con el entorno (Della-Lucia, 2003). Por lo tanto, estrategias sustentables como las de *push-pull*, que será abordada a continuación, y el estudio de las hormigas cortadoras de hojas resultan irremediablemente relevantes para resolver esta problemática, ya que se sostienen en la diversificación de la producción y la continuidad de las colonias de hormigas en la región. Por otro lado, más allá de certificaciones, la agroecología, sobre la cual se profundizará más adelante, propone un cambio de paradigma especialmente en los modos de producción. En la medida en que el consumo vira hacia este tipo de productos y que los Estados se alineen con estas prácticas y cosmovisiones, resulta imprescindible encontrar formas de coexistencia entre las especies nativas y las producciones locales humanas en un ecosistema dado. En este sentido, repensar los modos de producción y de reproducción de la vida humana en la zona del bajo Delta del Paraná resulta vital a la vez que es necesario tener un conocimiento acabado de la biología del sistema, así como del entorno específico en donde se sitúa la problemática. Incluso especialistas en el tema han propuesto que dada la complejidad de la problemática y su naturaleza multidimensional es necesario un enfoque interdisciplinario desde áreas tan

diversas como la ecología, microbiología, entomología, agronomía, sociología y economía (Montoya Lerma, 2012).

1.2.2 Estrategias de manejo contra las hormigas cortadoras de hojas

Distintos tipos de pesticidas de origen sintético-químico han sido utilizados desde 1940 para controlar poblaciones de insectos (*Figura 1.17*). Sin embargo, éstos han generado distinto tipo de resistencia a gran parte de ellos. Incluso, en la actualidad el desafío de esta industria es el de encontrar nuevos compuestos insecticidas eficaces (Schoonhoven et al., 2005).

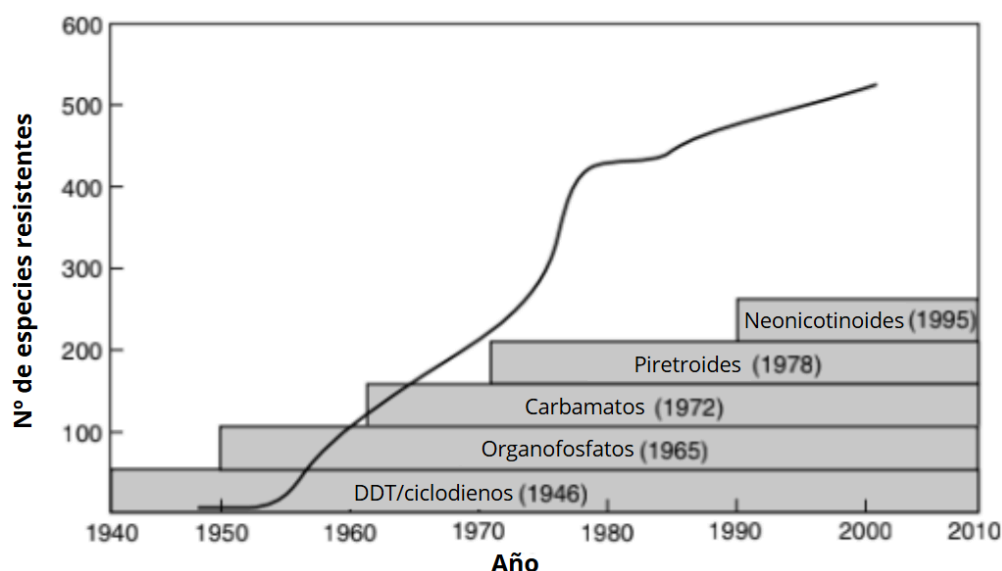


Figura 1.17: Número de especies resistentes a insecticidas en función del año (línea continúa negra). Se describen insecticidas sintéticos producidos a partir de 1939 (barras grises) en las cuales entre paréntesis se aclara el año en el cual se detectó la resistencia al mismo. Modificado de Schoonhoven et al. (2005).

En el caso de las estrategias de manejo de las hormigas cortadoras de hojas, hasta ahora, se han centrado en el uso de insecticidas de amplio espectro (Della Lucia et al., 2014) o fungicidas que contienen como principios activos sulfonamidas (sulfonamida fluoroalifática) y fipronil (phenylpyrazole) -Perri et al., 2020-. Éstos son utilizados en dosis altas dirigidos a las hormigas obreras o en dosis subletales en forma de cebos que son transportados al nido donde son acumulados

dañando a la cría (Antunes et al., 2000). Estos insecticidas afectan también a insectos benéficos para las plantaciones o el ecosistema, en menor medida son tóxicos para vertebrados, se acumulan en el suelo, tienen alto costo económico y ambiental en su producción y aplicación además de contaminar cursos de agua (Tingle et al., 2003; Peden-Adams et al., 2007; Bonmatin et al. 2015; Löfstedt Gilljam et al., 2016; Al-Badran et al., 2018 y Paredes et al., 2019). Por estos motivos, la agricultura sustentable se compromete a reducir el uso de insecticidas como estrategia cotidiana de control de plagas y además tener en cuenta que las hormigas brindan “servicios” para el mantenimiento de la productividad de los suelos.

Una estrategia alternativa y promisorio para el control de hormigas e insectos herbívoros en general, es el uso de semioquímicos (sustancia química emitida por un organismo que afecta el comportamiento de otros individuos, intra y/o interespecíficamente) repelentes para proteger cultivos de alto valor o durante las fases de las plantas en las que son más vulnerables, como el álamo, pino o sauces jóvenes que pueden morir por defoliación causada por hormigas (Della Lucia et al., 2014). Estos repelentes pueden ser utilizados en combinación con atrayentes en lo que se denomina estrategias *push-pull* (Figura 1.18). Este efecto consiste en repeler a las plagas de los cultivos de interés (*push*) y atraerlos a otras áreas de cultivos trampa (*pull*) (Cook et al., 2007). Al utilizar dos estímulos de manera simultánea y antagónica se pretende un efecto sinérgico. Esta estrategia puede lograrse en base al uso de plantas que ya poseen cualidades de aceptación y rechazo, se procura que los cultivos de interés se alternen con áreas de vegetación natural o de cultivos trampa con alta disponibilidad de plantas palatables que funcionen como fuentes alternativas de recolección reduciendo el daño de los cultivos de interés. Las estrategias para manipular el comportamiento de insectos basadas en atrayentes y repelentes implican esencialmente claves olfativas y requieren de un conocimiento muy detallado de la biología de los animales y las plantas en cuestión, así como de las interacciones químicas entre ellos. Tal es así, que el diseño de estrategias de control y manejo sustentable efectivas es específico para cada situación, por lo que debe tenerse conocimiento de la disponibilidad y variedad de especies vegetales existentes en el lugar, de las preferencias de alimentación de los insectos y de los mecanismos que controlan su comportamiento y decisiones de recolección. No resulta trivial determinar qué

olores son atractivos o repelentes para los insectos. Existen olores que tienen un significado innato para ciertos animales y el opuesto para otros. El significado de los olores se debe a que suelen ser predictores de cualidades buscadas o evitadas en las plantas, como ser un alto valor nutricional o la presencia de toxinas. Existen también evidencias de que el significado y valor predictivo de un olor puede ser aprendido y los animales pueden cambiar sus preferencias de recolección en base a la experiencia. Tal es el caso de hormigas cortadoras que buscan y recolectan una planta en base a la información olfativa aportada por una exploradora del mismo nido (Roces et al., 1990) o de hormigas que dejan de recolectar una fuente de alimento con determinado olor luego de que la misma tuvo un efecto nocivo sobre el hongo (Hertz et al., 2008, Falibene et al., 2015).

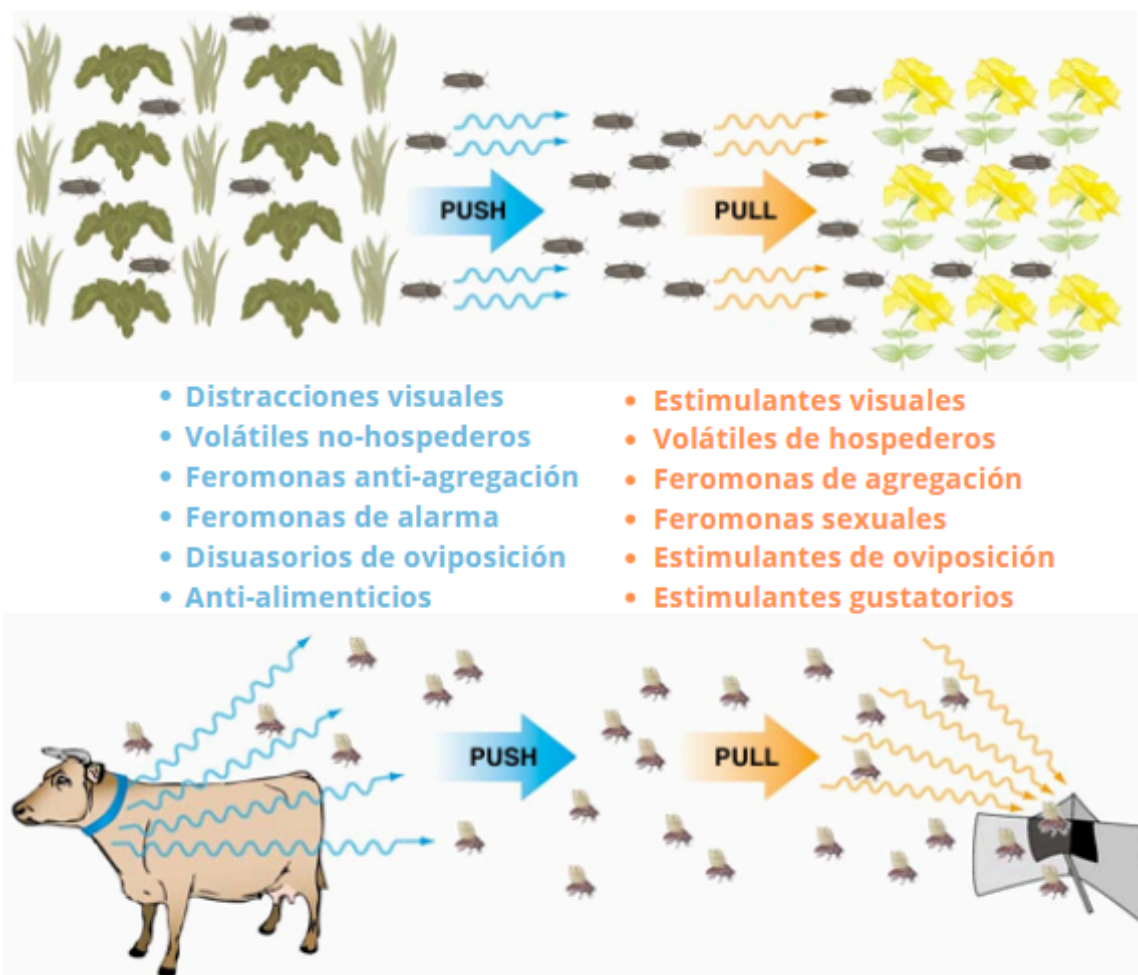


Figura 1.18: Esquema representativo estrategias de *push-pull*. Modificado de Cook et al., 2007.

En trabajos previos se observó que las hormigas cortadoras no presentan una preferencia particular por el sauce frente a la vegetación de crecimiento espontáneo que se encuentra a campo. Por el contrario, al haber otras opciones además del sauce la presión por herbivoría sobre el cultivo de interés disminuye (Perri, 2020). Además, se puso a prueba una estrategia de *push-pull* con el repelente farnesol y compuestos volátiles de pulpa de naranja, como atractantes. Este trabajo fue realizado a distintas escalas (laboratorio y campo) y, adicionalmente, con una barrera mecánica demostrando ser efectivo para ambos casos en la protección del cultivo de interés (Perri et al., 2017 y Perri et al., 2020). Teniendo en cuenta estos resultados y considerando la relevancia en términos de biodiversidad y conservación de las especies vegetales nativas de la región del Bajo Delta del Paraná además del hecho de que han co-evolucionado con las hormigas cortadoras de hojas resulta interesante su incorporación como candidatas en futuros estudios de *push-pull*.

1.2.3 Biología de las hormigas cortadoras de hojas

1.2.3.1 Evolución y diversidad: Origen, distribución y organización social

Se estima que las hormigas se originaron en el Cretácico temprano, hace 100 millones de años y obtuvieron su dominancia actual hace 50 Ma. (LaPolla et al., 2013). En tanto que la tribu *Attini* surgió en el Mioceno temprano, hace 15–24 Ma. (LaPolla et al., 2013 y Sánchez-Restrepo et al., 2023). Actualmente se distribuyen en el Abya Yala, especialmente en la región sur de Sudamérica (Farji-Brener y Ruggiero, 1994; Kusnezov, 1963). Dentro de la tribu *Attini* existen 12 géneros de hormigas cortadoras de hojas (*Figura 1.19*), cuyo nombre vernáculo varía entre saúva (*Atta* sp.), quenquéns (*Acromyrmex*), hormigas cabezudas, hormiga podadora, akeke, bachaco, bibijagua, hormiga arriera, sonteta, cuschi, hormiga minera, hormiga cortadora de hojas, bachaco, hormiga isau, hormiga cultivadora de hongos, codaUCA y hormigas parasol, entre otros (Della Lucía, 2003).



Figura 1.19: Fotografía de hormigas cortadoras de hojas (*Atta cephalotes*). Fotografía de archivo: Estación biológica La Selva en Sarapiquí, 129 km al norte de San José, Costa Rica.

Dentro de la tribu *Attini* se destacan los géneros *Atta* (Fabricius, 1804) y *Acromyrmex* (Mayr, 1865) (*Figura 1.20*), ambos divergen de una especie ancestral común hace aproximadamente 8 a 12 Ma. (Holldobler y Wilson, 2011) y coinciden en la categorización antrópica de “plagas” agrícolas y forestales. Dentro del género *Acromyrmex* se encuentran 63 especies, entre ellas *Acromyrmex ambiguus*, especie en estudio, presenta una distribución que incluye Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (Della Lucía, 2003).

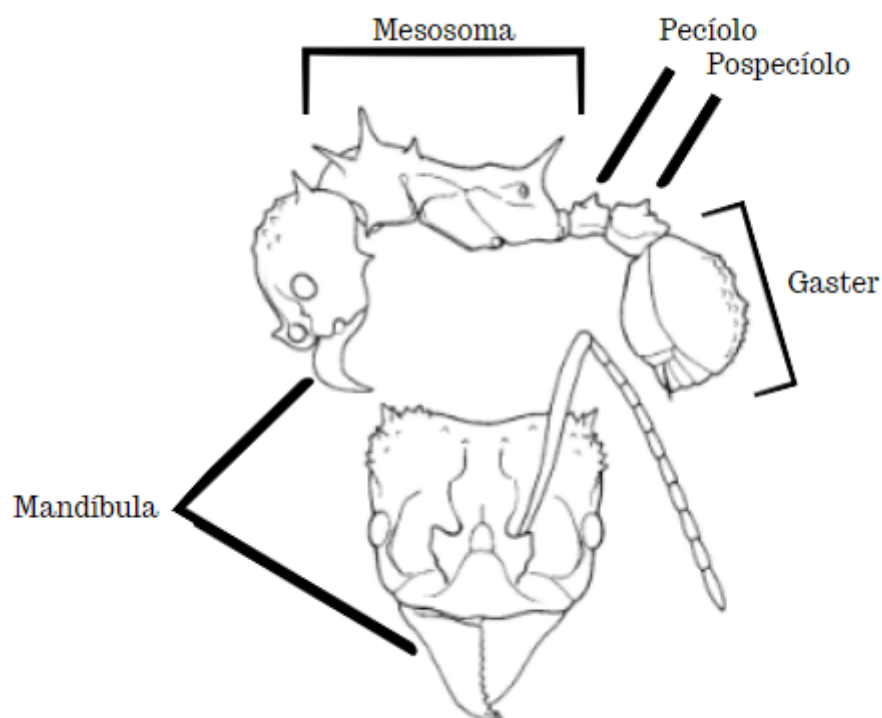


Figura 1.20: Esquema de la estructura corporal (vista lateral) y de la cabeza (vista frontal) de *Acromyrmex* (Mayr, 1888). Las características de este género son la presencia de más de tres pares de espinas en el mesosoma y en el pecíolo, pospecíolo y primer segmento del gaster la presencia de tubérculos pequeños. Modificado de Fernandez, 2003.

Acromyrmex spp. presenta polimorfismo, monoginia (caracterizado por tener sólo una hembra reproductora) y son polifacéticas, es decir, que realizan distintas tareas dentro de su organización social. Desde los 90' s se utilizaron categorías para distinguir las hormigas dentro de la colonia en base a características comportamentales (Holldobler y Wilson 1990, Bourke y Franks 1995). Sin embargo, según revisiones más actuales (Fernandez, 2003) pueden tenerse en cuenta otras categorías que no generen preconceptos sobre el comportamiento de estos individuos por la asociación conceptual que tenemos a categorías como reina, soldado, etc. En este trabajo se evitarán éstas últimas y se propone nombrar las categorías de hormigas por su comportamiento o características generales como: hembra reproductora (antes denominada reina), macho (antes denominados zánganos, son fértiles) y hembra generalmente infértil o inhabilitada para reproducirse (antes denominada obrera). Además, existen “castas”, entendidas como un conjunto de individuos de cierta morfología y/o edad con actividades especializadas en la colonia (entiéndase por colonia al conjunto de hormigas cortadoras de hojas, el hongo simbionte y la estructura física del hormiguero). Mientras tanto, las “obreras” pueden diferenciarse por su tamaño entre “mayores” (realizan actividades por fuera del nido como corte y recolección del material vegetal) y “menores” (realizan actividades subterráneas tales como cuidado del hongo y las crías) -Della Lucia, 2003-. Además, las distintas especies de *Acromyrmex* presentan diferentes tipos de morfología mandibular (Camargo et al., 2015 y 2016) y, consecuentemente, realizan cortes distintos sobre las especies vegetales. Sin embargo, generalmente las diferencias en los cortes se deben a que ante mayor actividad de cortes habrá mayor desgaste en las mandíbulas, lo cual se asocia a la lignificación de las hojas cortadas (Camargo et al., 2015).

Por otro lado, como insectos sociales, las hormigas utilizan modos de reconocimiento entre congéneres. De modo que ello les provee la identidad de colonia, que sustenta su funcionamiento y éxito ecológico. Esto implica que aquellos especímenes que no sean identificados como congéneres en general -en

mayor o menor medida- recibirán comportamientos agresivos, que incluso pueden desembocar en la muerte (Lenoir et al., 1999). Este reconocimiento es complejo, se da a través de componentes químicos cuticulares y olores de la propia hormiga y la colonia, los cuales son característicos de cada una de estas últimas (Crozier y Dix, 1979; Lenoir et al., 1999; Marinho et al., 2005; Marsaro et al., 2004). Incluso, existen algunos compuestos que pueden interferir o alterar el reconocimiento de congéneres, como β -eudesmol y elemol en *Atta* (Marsaro et al., 2004), derivando en mutilación y muerte de las obreras cuando son expuestas a altas concentraciones del disruptor β -eudesmol -proveniente de *Eucalyptus sp* (Myrtaceae)- (Marino et al., 2005).

1.2.3.2 Dispersión y Mutualismo en *Acromyrmex*: Estrategias de reproducción y construcción de nidos

Una nueva colonia de *Acromyrmex* se gesta a partir de la dispersión de una hembra reproductora con la coocurrencia de la transmisión vertical del hongo simbionte en el bolsillo infrabucal de ésta (Hölldobler and Wilson, 2011). La poliandria del grupo *Attini* se manifiesta a través del vuelo nupcial donde la hembra reproductora es fecundada por entre 1 y 10 machos (Boomsma et al., 1999). Este evento es considerado como una forma de mejorar la resistencia a enfermedades por la diversidad genética asociada al evento reproductivo (Hughes et al., 2008) y también es considerado como la forma de dispersión del hongo (Scott et al., 2010). Posteriormente, la hembra áptera (*Figura 1.21*) nidifica, proceso que puede llegar a durar hasta 10 hs (Vergara Castrillón, 2005) y ovipone. Los huevos eclosionan luego de aproximadamente 25 días, pasan por un período de larva (25 a 52 días) y ninfas (aproximadamente 14 días) luego de los cuales se convierten en adultas (entre 64 y 91 días) -las fechas dependen de la especie- (Vergara Castrillón, 2005).



Figura 1.21: Hembra reproductora -áptera- de *Acromyrmex ambiguus* de al menos siete años de edad. Colonia recolectada en EEA INTA Delta.

El tipo de nido y el tamaño de la colonia son especie-específicos. En el caso del género *Acromyrmex*, se han reportado tres tipos de estructuras generales de nido: poco profundos (*shallow*), cubiertos (*thatched*) o en serie (*serial*) (Figura 1.22). Los primeros se encuentran al ras del suelo, presentan múltiples conexiones al exterior y una o más cámaras fúngicas, mientras que los segundos presentan una cámara fúngica por encima del nivel del suelo cubierta por tierra suelta y materia orgánica. Los últimos se ubican al ras del suelo y presentan una o más cámaras fúngicas ubicadas en serie y conectadas entre sí por un túnel vertical con una única conexión al exterior (Bollazzi et al., 2021, Forti et al., 2006). En los nidos cubiertos, como los de *A. Ambiguus*, se deposita material vegetal y partículas de suelo desde la base hacia arriba y de acuerdo al tiempo de maduración de la estructura. Estas características facilitan la identificación en el campo de este tipo de nidos cubiertos (Figura 1.22). Además, el material es seleccionado activamente y de manera independiente a su disponibilidad (Cosarinsky et al., 2020).

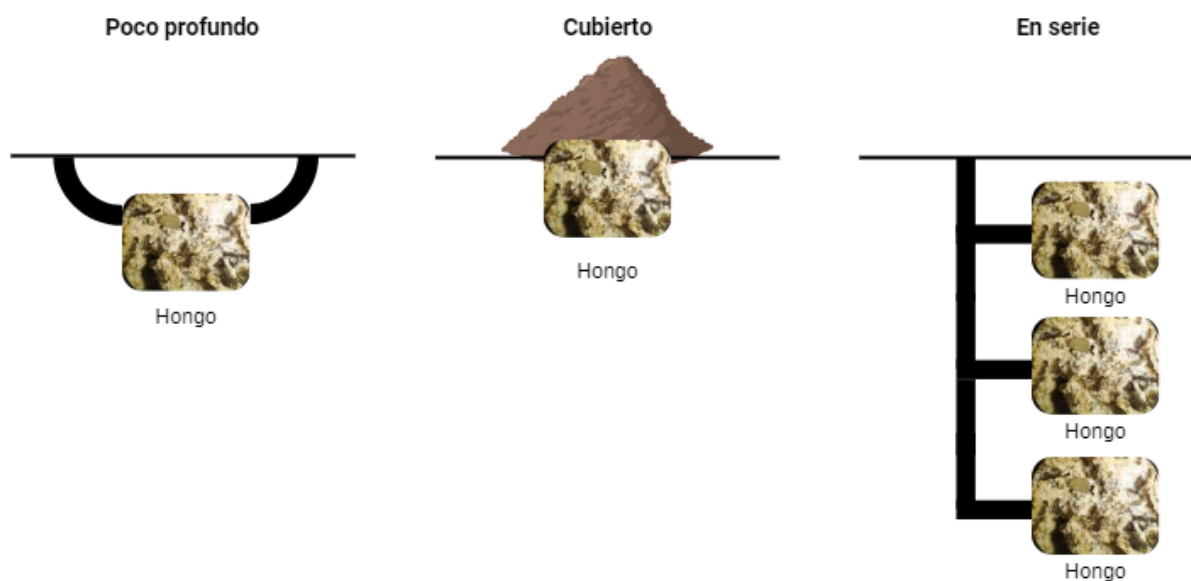


Figura 1.22: Esquema de tipos de nidos del género *Acromyrmex* según su estructura (modificado de Bollazzi et al., 2021).

En la región en estudio, las especies simpátricas *A. ambiguus* y *A. lundii* presentan nidos con estructuras del tipo cubierto y poco profundo, respectivamente. Por lo tanto, la saliencia de los nidos cubiertos de *A. ambiguus* permite identificarlos con facilidad en el campo. Sin embargo, en otras regiones se han descrito nidos tanto cubiertos como poco profundos para ambas especies (Bollazzi et al., 2021, Forti et al., 2006, Fowler y Robinson, 1979). Incluso Bollazzi y colaboradores proponen que *Acromyrmex* es el único género de hormigas de Sudamérica en el cual los nidos cubiertos tienen ocurrencia en diversas especies a lo largo del continente, interpretándose como un signo de plasticidad (Bollazzi et al., 2021 y Bollazzi et al., 2008). Además, el nido no sólo representa un refugio sino que también funciona como un *buffer* térmico, lo cual resulta especialmente importante para que el hongo se mantenga en una ventana térmica que no resulte desfavorable a su mantenimiento y crecimiento (Farji-Brener 2000). Por otro lado, los nidos se constituyen como estructuras de mayor complejidad: presentan corrientes de aire inducidas por estructuras de ventilación con convección térmica, a través de la cual el aire caliente (de menor densidad) emerge a la superficie. Sumado a ello, existen mecanismos activos (por ej. relocalización de larvas, pupas y hongo) por parte de la colonia para mantener los niveles de dióxido de carbono, temperatura y humedad en valores que no sean

dañinos para el hongo ni para las hormigas. Bollazzi y colaboradores (2021) proponen que el control de humedad y temperatura no sólo conducen a hábitos cercanos al ras del suelo sino que además a la evolución de estructuras más eficientes en términos del intercambio gaseoso. El comportamiento de termorregulación mencionado implica que a mayor temperatura en la superficie, el hongo se localiza a mayor profundidad y el comportamiento de excavación se maximiza entre los 20 y 30,6°C y ante flujos de aire con baja humedad (Bollazzi et al., 2007, Bollazzi, 2008). Teniendo en cuenta todos los factores expuestos, la particularidad del nido cubierto es que la humedad, la temperatura del suelo, así como la cobertura generada por el follaje de las plantaciones de árboles, generan un microhábitat que maximiza la tasa de crecimiento de las colonias (Roces y Kleineidam, 2000; Bollazzi et al., 2008). Estos elementos pueden influir en la extensión y el rango de su distribución (Sánchez-Restrepo et al., 2019) así como su tolerancia térmica individual -*A. ambiguus* (4,50- 45,03 °C) (Jimenez, 2019). En relación a este rango de distribución, cabe destacar la capacidad de estos organismos para adaptarse a distintas condiciones de vida, y para entender esta capacidad es clave su comportamiento generalista: hasta un 50% de las especies vegetales disponibles en una comunidad de plantas puede ser utilizada como substrato para el cultivo del hongo (Wirth et al., 2003); aunque suelen mostrar un altísimo grado de aceptación por algunas plantas y un completo rechazo por otras (Roces, 1990, Meyer et al. 2006, Saverschek et al. 2010 y Arenas y Rocés, 2017). Si bien estas preferencias varían según la calidad de los nutrientes y agua presentes en la hoja, la edad de la misma, su grosor, la estacionalidad, presencia de metabolitos tóxicos, defensas físicas, etc. (Farji-Brener, 2001; Della Lucía, 2003) se estima por experimentos de condicionamiento y reclutamiento que las claves para la búsqueda y aceptación de un determinado recurso son esencialmente olfativas (Roces, 1994; dos Santos et al., 2013). Para este trabajo la definición de **preferencia** que utilizaremos es la de la elección de un ítem ante la oferta de dos o más ítems. Éstos estarán equidistantes a la/s hormiga/s pero pueden estar ubicados físicamente a distintas distancias entre sí.

Una vez que el material vegetal fresco es recolectado y transportado al nido, el mismo es procesado por hormigas de menor tamaño para luego ser incorporado al cultivo del hongo ubicado en una o más cámaras, el cual constituye el principal alimento de la colonia (Bass y Cherrett 1995). Se propone que la tribu *Attini* podría

tener una única especie de hongo simbiote *Leucocoprinus gongylophorus*, *Lepiotaceae*, *Basidiomycota* (Stahel, 1943), basándose en estudios de ADN y observaciones en colonias de *Acromyrmex* y *Atta* (Silva-Pinhati et al. 2004; Silva-Pinhati et al. 2005, Nygaard et al., 2016) -Figura 1.23-. Además, las hormigas habrían coevolucionado con el hongo simbiote desde hace 55-60 Ma. y de manera irreversible presumiblemente hace 30 Ma., luego de perder la capacidad biológica de biosíntesis de arginina, suplida por el hongo simbiote (Nygaard et al., 2016). Ésta es la única fuente de alimento, rico en carbohidratos y lípidos (Littledyke y Cherrett 1976), para la hembra reproductora, los machos y las ninfas pero especialmente para las larvas, mientras que para las obreras adultas constituye un suplemento de la savia vegetal -9% de sus requerimientos energéticos- (Littledyke y Cherrett 1976; Howard, 1988; Bass y Cherrett, 1995; Silva et al. 2006).

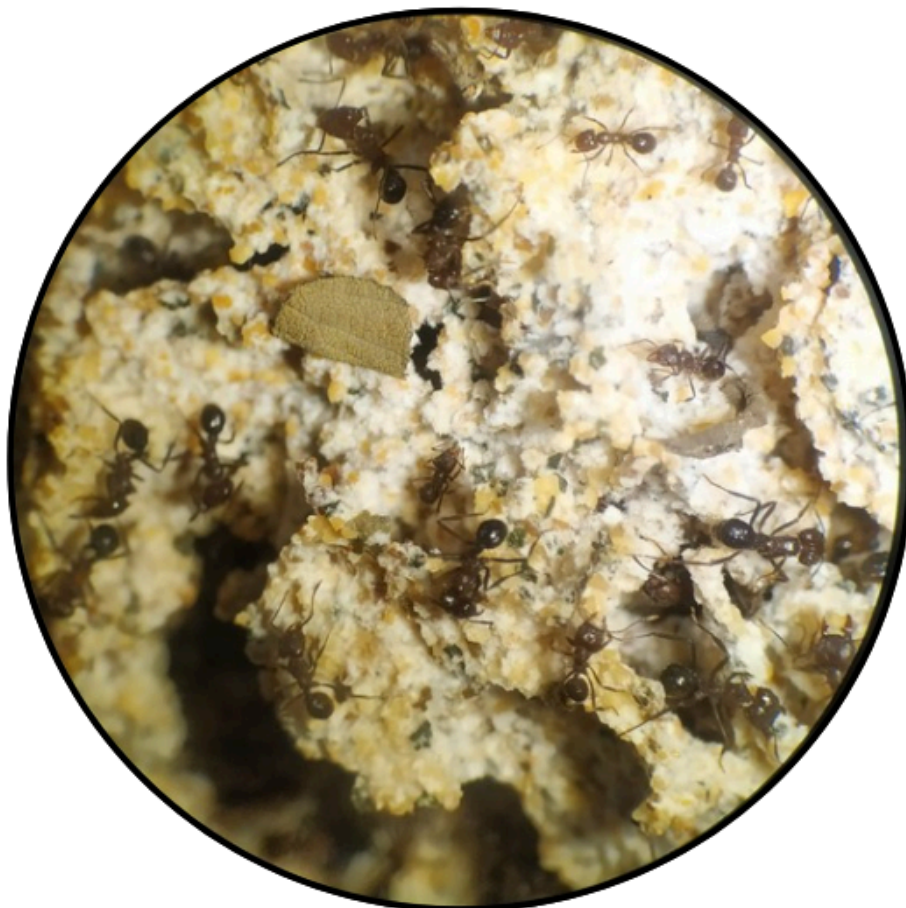


Figura 1.23: Hongo (*Leucocoprinus gongylophorus*) simbiote en colonia de *Acromyrmex ambiguus* bajo mantenimiento artificial en el laboratorio.

Se trata de un mutualismo (*Figura 1.24*) obligado donde el material vegetal macerado por las hormigas en forma de pulpa funciona como sustrato para el crecimiento del hongo, el cual a su vez metaboliza polisacáridos (principalmente pectina pero también xilano, almidón y celulosa) y otros compuestos no palatables (como la detoxificación de compuestos fenólicos) que, luego de este proceso, son asimilables por las hormigas; luego ellas retornan al hongo las enzimas que se concentraron en su intestino mediante líquido fecal que facilitan la digestión de otros tejidos vegetales (Cherrett, 1980, Nygaard et al., 2016, Hölldobler y Wilson, 2011; Littledyke y Cherrett, 1976; Bass y Cherrett 1995; Silva et al., 2003; Ronhede et al., 2004; Boulogne et al., 2012). Sin embargo, el hongo simbionte tiene menor cantidad de genes que derivan en la degradación de la lignina, en comparación a hongos emparentados, lo que refuerza la idea del hongo como un modulador de la preferencia de la colonia (Nygaard et al., 2016). En cuanto a las hormigas recolectoras, se sugiere que ingieren nutrientes directamente del material vegetal cuando éste es palatable y los menos palatables son facilitados a través del hongo (Littledyke y Cherrett, 1976). Por otro lado, las hormigas le brindan al hongo protección ante parásitos y potenciales competidores a través de su comportamiento y de la presencia de la bacteria *Pseudonocardia* sp. en la cutícula de las hormigas. El mutualismo es tan robusto que cada colonia depende de la sanidad de sus hongueras, en especial la calidad sanitaria del hongo simbionte es crítica para el desarrollo de las larvas, ya que constituyen su alimento exclusivo (Quinlan y Cherrett, 1979). Luego, tanto el material orgánico colectado y no consumido, como desechos procedentes del hongo u hormigas muertas son acumulados en un sector externo (como es el caso de *A. ambiguus*) o interno. Este sector resulta en un punto de intercambio de información para hormigas que realizan distintas tareas, especialmente para recolectoras que en este punto toman información sobre material orgánico perjudicial para el hongo (Arenas y Rocas, 2016a). Por lo tanto, distintas claves ambientales y sociales regulan el material que ingresa al nido (Arenas y Rocas, 2016a, 2016b, 2017, 2018). Este robusto mutualismo entre las hormigas cortadoras y el hongo que cultivan resulta en una dificultad no menor a la hora de controlar el tamaño poblacional de las colonias, o incluso al tratar de destruirlos.

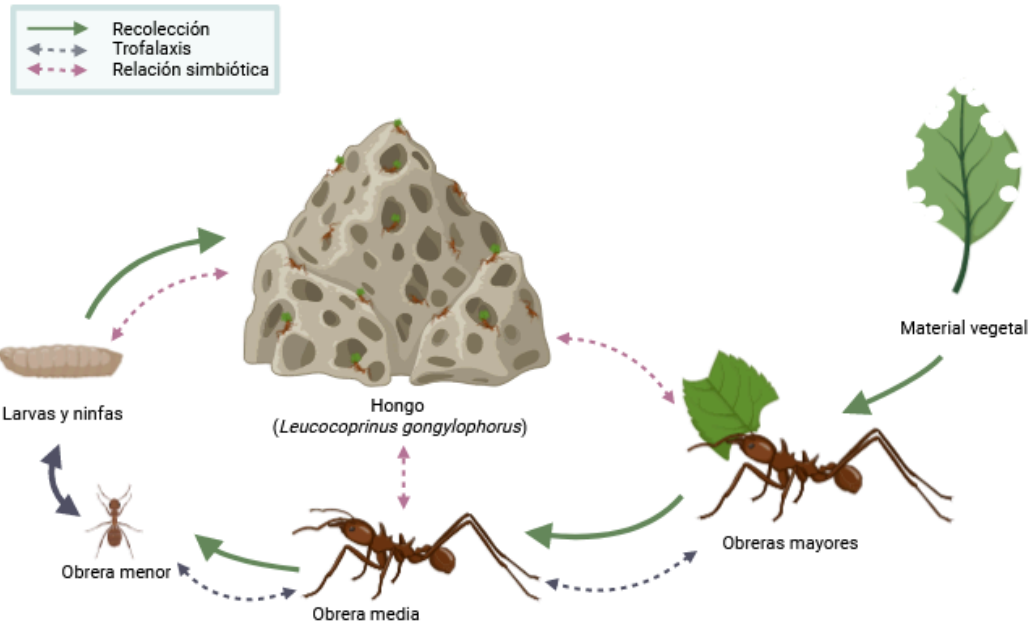


Figura 1.24: Esquema de relaciones entre hormigas cortadoras de hojas (*Acromyrmex* y *Atta*) con su hongo simbiote (*Leucocoprinus gongylophorus*) basado en (Boulogne y Petit, 2012).

1.2.3.3 Hormigas Cortadoras de Hojas: Transformadoras del ecosistema y catalizadoras de cambios ambientales

Dada la complejidad de la biología de las colonias de hormigas cortadoras de hojas, éstas se han convertido en organismos de importancia ecológica tan relevantes que incluso han sido consideradas como “ingenieras” de los ecosistemas (Jones et al. 1994). Éste es un término que ha sido definido para organismos que de manera directa o indirecta modulan los recursos disponibles para otras especies de tal forma que los cambios físicos en la materia biótica o abiótica se dan a través de procesos que modifican el ambiente, mantienen y/o crean hábitats (Jones et al. 1994, 1997). Estas modificaciones pueden ser: 1) aumento de la fertilidad del suelo por acumulación de materia orgánica y nutrientes, respecto a suelos sin nidificación, de manera tal que modifican la fisonomía del ambiente y el ciclo de nutrientes se ve favorecido en las zonas cercanas al nido (Alvarado et al., 1981, Farji-Brener y Silva, 1995, Montoya-Lerma et al., 2012; Moutinho et al., 2003), 2) aumento en la densidad y porosidad del suelo, con la consecuente aireación e infiltración y fijación del nitrógeno por parte de las bacterias simbiotes del hongo, de manera tal que resultan de gran importancia

en el desarrollo del suelo (Alvarado et al., 1981 y Pinto-Tomás et al., 2009) y disminución de la resistencia a la penetración de las raíces (Moutinho et al., 2003). También modifican los patrones de herbáceas y leñosas, su recambio y afectan la dispersión de semillas aumentando el fitness de estas especies (Montoya-Lerma et al., 2012). De este modo, el rol biológico de agentes multidimensionales de cambio en un ecosistema contrasta con la concepción antropocéntrica, occidental y productivista de “plagas”, que se mencionó al principio de esta introducción.

1.3. Objetivo e hipótesis generales

1.3.1. Objetivo general

La agricultura sustentable exige métodos que se ajusten al cuidado de los ecosistemas, minimizando el uso de insecticidas. En este sentido, la investigación sobre control de “plagas” en base a semioquímicos atrayentes y repelentes para el cuidado de cultivos ha aumentado su popularidad entre productores y consumidores conscientes sobre el cuidado del medio ambiente. Sin embargo, el desarrollo de estas estrategias requiere de un profundo conocimiento de la biología de las especies involucradas, de las preferencias de recolección de la especie plaga y de las estrategias de defensa de las plantas. La generación de este conocimiento surge de la estrecha vinculación entre determinaciones de campo específicas del lugar y de las especies en cuestión, y del trabajo de laboratorio que incorpora como dato las relaciones ecosistémicas y las adaptaciones puntuales de los animales y las plantas del caso de estudio.

En este marco, el objetivo general de esta tesis fue generar conocimiento sobre aspectos fitoquímicos y del comportamiento de recolección de hormigas cortadoras *Acromyrmex ambiguus*, así como sus bases neurobiológicas y sensoriales, que sirvan para el desarrollo de estrategias de manejo de hormigas cortadoras en el contexto de una problemática agroforestal en el entorno de plantaciones de álamo y sauce del Delta del Paraná.

Con dicho fin se investigaron las modalidades sensoriales involucradas en el reconocimiento de plantas que son más y menos recolectadas por las hormigas.

Se buscó identificar especies vegetales con potencial uso en estrategias de manejo sustentable para minimizar el impacto de la recolección de hormigas sobre las plantaciones de interés. Además se apuntó a establecer en qué medida la recolección está influida por preferencias innatas y si dichas preferencias pueden ser modificadas por la experiencia.

1.3.2. Hipótesis general

Hipotetizamos que las hormigas poseen la capacidad de detectar e identificar especies vegetales preferidas y rechazadas principalmente en base a sus olores. Además, postulamos que existen especies vegetales nativas de la zona del Bajo Delta del Paraná que son más preferidas que el sauce comercial y otras que generan rechazo en estas hormigas.

Capítulo 2: Materiales y métodos generales

2.1 Recolección de colonias de *Acromyrmex ambiguus*

Las colonias de *Acromyrmex ambiguus* utilizadas a lo largo de este proyecto fueron colectadas en la Estación Experimental Agropecuaria Delta del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA EEA Delta) ubicado en el Río Paraná de la Palmas y Canal Laurentino Comas, 4ta. Sección de Islas, Localidad de Campana, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Las colonias fueron fácilmente identificables al momento de la recolección, ya que sus nidos conforman un montículo de tierra y material orgánico seco visible que lo distingue de nidos de otras especies (*Figura 2.1*).



Figura 2.1: Fotografía de hormiguero de *Acromyrmex ambiguus* en INTA EEA Delta (Ayelén Nally).

Una vez ubicada la colonia, se utilizó una cuchara previamente esterilizada con alcohol 96% para remover el montículo de tierra y la materia orgánica, de modo tal de exponer la cámara de la colonia que contenía el hongo simbionte (junto a las hormigas que se alojan con él). Con la misma cuchara, el hongo y las hormigas se trasladaron a cajas plásticas previamente esterilizadas con alcohol 96%. Esta esterilización del material tiene como objetivo preservar el hongo simbionte (*Leucocoprinus gongylophorus*) de posibles contaminaciones. Las cajas plásticas con la colonia colectado se ubicaron dentro de una caja plástica de mayor tamaño (32cm x 42cm x 6,5cm). De este modo, la caja de mayor tamaño será análoga a la estructura general de la colonia y las cajas pequeñas serán análogas a las cámaras de hongo y de hongo con cría. Posteriormente, para evitar que las

hormigas escapan se colocó vaselina líquida en los bordes de las paredes laterales de la caja de mayor tamaño. En menos de 24hs la colonia es capaz de reorganizarse en esta nueva estructura artificial.

2.2 Mantenimiento de colonias de *Acromyrmex ambiguus*

Una vez que una colonia llegó al laboratorio ésta fue conectada mediante tubos plásticos transparentes a una arena experimental (Figura 2.2) y el recipiente original se mantuvo tapado con el objetivo de mantener la humedad y la temperatura.

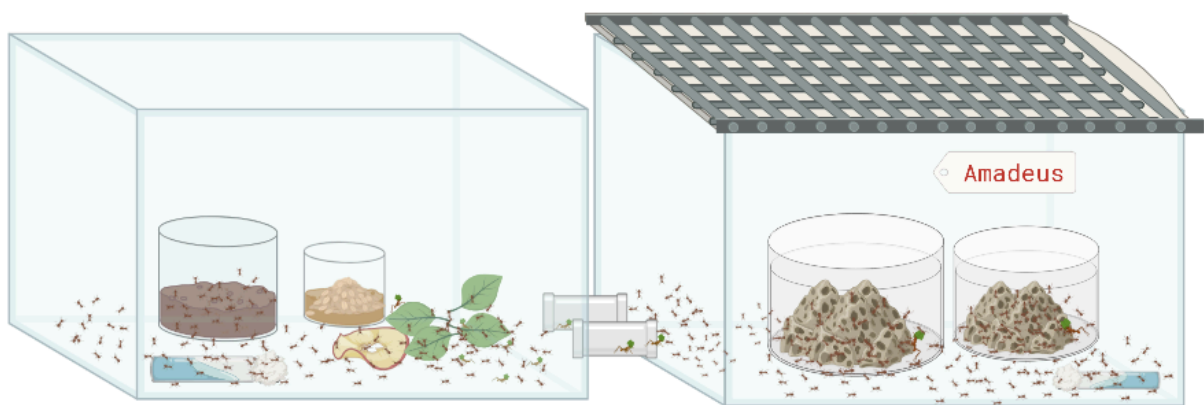


Figura 2.2: Esquema de la estructura de una colonia mantenida en el laboratorio. Izquierda: Arena de recolección, contiene un recipiente con desechos, un recipiente con agua y algodón en su extremo, un recipiente con alimento seco (avena, arroz, polenta) y alimento fresco (hojas, fruta). Derecha: Colonia propiamente dicha, conectada a la arena de recolección por tubos plásticos; contiene recipientes que ofician de cámaras con hongo y cría, recipiente con agua y algodón en su extremo. Se encuentra cerrado constantemente.

Las colonias fueron mantenidas en el laboratorio, aproximadamente a 25°C, 50-60% de humedad relativa y fotoperiodo natural. Se alimentó diariamente a las colonias con especies que no fueron utilizadas en los experimentos, como ser hojas de fresno (*Fraxinus sp.*), corona de novia (*Spiraea cantoniensis*), tipa (*Tipuana tipu*), jacarandá (*Jacaranda mimosifolia*), mora (*Morus nigra*), entre otras. Además se le dieron frutos tales como: manzana (*Malus domestica*), naranja

(*Citrus × sinensis*) y mandarina (*Citrus reticulata*). El alimento constante de las colonias durante toda su estancia en el laboratorio desde su recolección, inclusive durante los períodos de experimentación, fue una mezcla de avena, polenta y arroz. Adicionalmente, los experimentos comportamentales fueron realizados luego de 3 meses de recolectada la colonia, de modo tal de asegurar el recambio de las hormigas recolectoras en la misma, es decir, que éstas hormigas no hayan tenido experiencia previa con las especies vegetales utilizadas en los ensayos. Todos los experimentos fueron realizados en época estival.

Los especímenes de plantas nativas utilizados en esta tesis fueron adquiridos a través de, por un lado, donaciones de parte del Ing. Edgardo Casaubón (INTA EEA Delta), el *Vivero Comunitario Ciudad Universitaria* (VICCU) y la *Fundación Chicos Naturalistas* y, por otro lado, a través de compras en el *Vivero Inclusivo Vicente López*. Los especímenes fueron mantenidos en macetas bajo condiciones naturales en el parque del Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias. Se los regó periódicamente a excepción de épocas de altas temperaturas, cuando fueron regados diariamente o hasta dos veces al día (por ejemplo durante la sequía de la temporada de verano 2023).

2.3 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Graphpad Prism 8.0.1 para Windows. Los distintos análisis utilizados fueron prueba de t y prueba de χ^2 . También se utilizó ANOVA de un factor sumado a comparaciones a posteriori Duncan para comparar entre más de un tratamiento, cuando la distribución de datos cumplía con normalidad y homogeneidad de varianza. Se utilizó test de Kruskal-Wallis y comparaciones a posteriori Dunn cuando la distribución de datos no resultaba normal. En cada sección experimental se indica el análisis con más detalle según corresponda.

Capítulo 3: Preferencia de recolección sobre especies vegetales nativas del Bajo Delta del Paraná: Del campo al laboratorio

3.1 Introducción

En la sección 1.3.2 se hizo referencia a la metodología de *push-pull* como estrategia alternativa y promisorio para el control de hormigas e insectos herbívoros en general. La misma está basada en el uso combinado de semioquímicos repelentes y atrayentes para proteger cultivos de alto valor durante fases en las que las plantas son más vulnerables (ej: en el caso de los árboles son los 2-3 primeros años de vida (Della Lucia et al., 2014). Esta estrategia puede darse a distintas escalas, distancias y con distintos elementos disuasorios (*push*) y atractantes (*pull*) (Cook et al., 2007), donde se espera un efecto sinérgico al utilizar dos tipos de estímulos de manera simultánea y antagónica.

En el caso de las hormigas cortadoras de hojas existe un único reporte de estrategias *push-pull*, que además ha tenido resultados prometedores en ensayos de campo (Perri et al., 2020). En este caso, se utilizó el compuesto farnesol junto a una barrera mecánica, como *push* de corta distancia, mientras que a modo de *pull* y como clave de larga distancia se utilizó la vegetación espontánea. En dicha experiencia, se observó que la vegetación espontánea era seleccionada por las hormigas cortadoras en base a la especie vegetal y no simplemente en base a su abundancia. Como resultado se sugirió que la técnica de *push-pull* aumenta la biodiversidad, la función ecosistémica y es posible de ser implementada por productores locales (Perri et al., 2020).

Los resultados en relación a la diversificación del agroecosistema y el aumento en la diversidad vegetal planeados en pos de mejorar la producción de manera sustentable traen aparejados la disminución de insumos agroquímicos, como fertilizantes y pesticidas, además de traer beneficios ecosistémicos. Algunos ejemplos de ellos son el incremento en abundancia y riqueza de aves, de insectos polinizadores y depredadores de insectos que afectan los cultivos, por ejemplo depredadores y/o parasitoides de las hormigas cortadoras de hojas. Estos cambios resultan en mejoras tanto en la producción como el rendimiento de forraje,

producción de madera, estabilidad del rendimiento, etc. (Letourneau et al., 2011; Kremen et al., 2012; Isbell et al., 2017).

La disminución en los daños en cultivos provocados por especies consideradas dañinas no sólo se debe a la presencia de depredadores de éstas últimas, sino también al efecto de disrupción de la capacidad de los insectos de localizar las plantas de interés, debido a la abundancia de claves visuales y químicas. Algunos de los fenómenos que emergen en un ambiente con un diseño estratégico de *push-pull* con mayor biodiversidad son: la repelencia del cultivo, el redireccionamiento de herbívoros a una especie vegetal distinta del cultivo de interés, bloqueo del movimiento hacia el cultivo y a la alteración de los perfiles de volátiles en el ambiente (Gurr et al., 2017).

En esta tesis se propuso estudiar los patrones de herbivoría de **especies vegetales nativas** de la región de estudio por parte de las hormigas cortadoras de hojas de la misma ecorregión. Considerando que ambas han evolucionado en conjunto, esperamos encontrar estrategias de defensa en las especies vegetales, así como mecanismos de tolerancia y aprovechamiento de claves para localización por parte de los insectos.

Este tipo de información será relevante para el diseño racional de estrategias de reforestación con plantas nativas y siguiendo esquemas de manejo *push-pull* asociados a cultivos de interés comercial. Esto ayudará a recuperar la biodiversidad original de la región y en particular del monte blanco, en base a una propuesta de diseño de la plantación forestal para producción que considere el equilibrio entre intereses socio-culturales, ambientales y comerciales.

3.1.1 Defensas de las plantas

Las especies vegetales tienen distintos tipos de mecanismos de defensa ante la herbivoría: directos e indirectos. Los primeros son físicos (tricomas no glandulares, lignificación de la pared celular o deposiciones sílicas) o químicos (compuestos repelentes, disuasivos, antinutritivos o antidigestivos -como alcaloides, terpenoides y compuestos fenólicos-) (Levin, 1973, Villard et al., 2019). Los mecanismos indirectos incluyen también la atracción de depredadores y

parasitoides de las especies herbívoras por medio de compuestos volátiles. Ambos mecanismos de defensa se conjugan para disminuir la herbivoría. Los mecanismos indirectos se activan a través de diversos y complejos mecanismos de señales químicas, tales como cambios en la expresión génica. En muchos casos, estos mecanismos indirectos se expresan una vez que la planta sufrió daño por la especie herbívora y demandan cierto tiempo de acción (War et al., 2011). Los mecanismos químicos pueden producir diversos efectos sobre los insectos tales como el retardo del desarrollo, intoxicaciones y muerte, dependiendo de la relación específica entre la planta y el insecto (Schoonhoven et al., 2005). Por otra parte, dentro de los mecanismos físicos de defensa, se destaca el endurecimiento de la pared celular por medio de deposiciones de diversos compuestos como celulosa y lignina, entre otros. Este endurecimiento genera mayor resistencia a daños mecánicos como por ejemplo la acción de los aparatos bucales y oviposidores de insectos. La dureza de la hoja constituye un mecanismo efectivo y relevante en la reducción de la herbivoría (Coley, 1983). Cabe destacar que algunos elementos, tanto apetitivos como mecanismos de defensa de vegetales, requieren que los insectos se encuentren a corta distancia de la especie o bien mantengan contacto físico directo con ésta, de modo de obtener información sobre la calidad del espécimen. De este modo, se ponen en juego mecanismos mecano- y quimiosensoriales (Schoonhoven et al., 2005).

En cuanto al material vegetal que actúa como sustrato para el hongo simbiote; por un lado, las hormigas presentan un comportamiento de “raspado” de la hoja con la consecuente remoción de la capa de ceras epicuticulares (*Figura 3.1*), lo cual facilita la acción del hongo sobre el material vegetal (Andrade et al., 2002).

Por otro lado, algunas especies vegetales producen sustancias que pueden afectar negativamente al hongo simbiote -por ej.: β -eudesmol (*Eucalyptus maculata*; Myrtaceae), ácido limonoide (*Raulinoa echinata*; Rutaceae)- y, por este motivo, resulta interesante evaluar la presencia de compuestos equivalentes en plantas nativas, especialmente compuestos inhibidores de la actividad enzimática del hongo simbiote o capaces de generar un comportamiento de acercamiento o repulsión en las hormigas cortadoras para potencial uso como *push-pull* de corta distancia (dos Santos et al., 2013).



Figura 3.1: Esquema de estratificación de la cutícula vegetal (Modificado de Müller y Riederer, 2005). Se encuentran presentes barreras físicoquímicas. Como barrera física se encuentra una capa de cristales de cera epicuticulares. Como barreras químicas se encuentran capas de ceras epicuticulares que dificultan la acción del hongo simbionte sobre el material vegetal (Andrade et al., 2002).

3.1.2 Preferencias de recolección en hormigas cortadoras

Existe una gran variedad de aspectos que pueden influir sobre las preferencias de recolección de las hormigas cortadoras de hojas. Respecto a las plantas nativas del Delta del Paraná, existe un completo desconocimiento acerca de las preferencias de hormigas cortadoras. Incluso, el impacto y tamaño del daño están únicamente descriptos en función de las pérdidas económicas que las hormigas ocasionan sobre los cultivos de interés comercial.

Por lo tanto, el conocimiento acerca de preferencias o rechazo por plantas nativas sería información inicial fundamental para:

- i) diseñar esquemas de manejo *push-pull* basados en la reforestación estratégica con plantas nativas.
- ii) comenzar a comprender las bases químicas, fisiológicas y sensoriales de dichas preferencias.

Por ello, en este capítulo se estudió la preferencia de recolección de plantas nativas en comparación con la de una especie de sauce comercial por hormigas cortadoras de la especie *Acromyrmex ambiguus*. En función de ello se profundizó en el estudio de la preferencia de *A. ambiguus* por especies vegetales nativas.

3.2 Objetivos e hipótesis

Objetivos:

1. Establecer qué especies vegetales nativas son más o menos preferidas que la especie de sauce comercial (*Salix babylonica* var. *Sacramenta*) por las hormigas cortadoras de hojas en el Núcleo forestal de la región del Bajo Delta del Paraná.
2. Establecer el tipo de claves sensoriales que son relevantes para las hormigas al momento de la recolección de esas especies vegetales.
3. Establecer si las preferencias se conservan a nivel individual y colectivo.

Hipótesis:

- Dentro del grupo de especies vegetales nativas estudiadas, habrá especies más y menos preferidas que el sauce comercial (*S. babylonica*) por las hormigas cortadoras de hojas *A. ambiguus*.
- En el comportamiento de recolección de un ítem existen claves sensoriales más relevantes que otras para las hormigas cortadoras de hojas *A. ambiguus*.
- Los estímulos volátiles serán claves relevantes para determinar el acercamiento a un ítem durante la recolección en hormigas cortadoras de hojas *A. ambiguus*.
- Las preferencias a nivel individual se conservan a nivel colectivo en las hormigas cortadoras de hojas *A. ambiguus*.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Preferencia en el campo: Herbivoría

Árboles utilizados

Se trabajó con pequeñas arboledas de plantas nativas jóvenes ubicadas en el INTA EEA Delta (*Figura 3.2*) realizadas por la investigadora Natalia Fracassi en el año 2017, con el fin de generar parches experimentales y de conservación de flora y fauna nativa. Se aprovecharon estos parches con biodiversidad de flora nativa para

medir la herbivoría a la que se ven expuestas estas especies en la naturaleza. La ubicación de estas áreas fue:

- Parche 1: Ambos márgenes del arroyo Tornillo y lindero a una plantación de Álamo y Sauce.
- Parche 2: A ambos márgenes del arroyo Tornillo en su desembocadura sobre camino interno (Ruta 90).
- Parche 3: Lindero al camino de ingreso a INTA EEA Delta.



Figura 3.2: Ubicación de los tres parches de plantas nativas ubicadas en las inmediaciones de la Estación Experimental Agropecuaria Delta del INTA (INTA EEA Delta), en el Río Paraná de las Palmas y Canal Laurentino Comas, 4ta. Sección de Islas, Localidad de Campana, Provincia de Buenos Aires, Argentina (-34.17, -58.86). En color rojo se indica la ubicación del edificio de la INTA EEA Delta y en color turquesa se indican con alfileres las ubicaciones de las agrupaciones de árboles nativos en forma de arboledas en tres ambientes distintos.

Cada uno de los parches de especies nativas han sido plantados y mantenidos por el grupo de la Dra. Natalia Fracassi (INTA EEA Delta) tiempo antes de comenzar esta tesis doctoral. Por lo tanto, no hemos tenido injerencia en el diseño de los mismos. Cada parche presenta distinto tipo y número de especies así como

distintos y relativamente aleatorios ordenamientos espaciales (Figura 3.3). Algunos de los especímenes nativos han muerto a lo largo del experimento, posiblemente debido a inundaciones (Figura 3.3 -Parche 3-) o sequía (Figura 3.3 -Parche 1-).

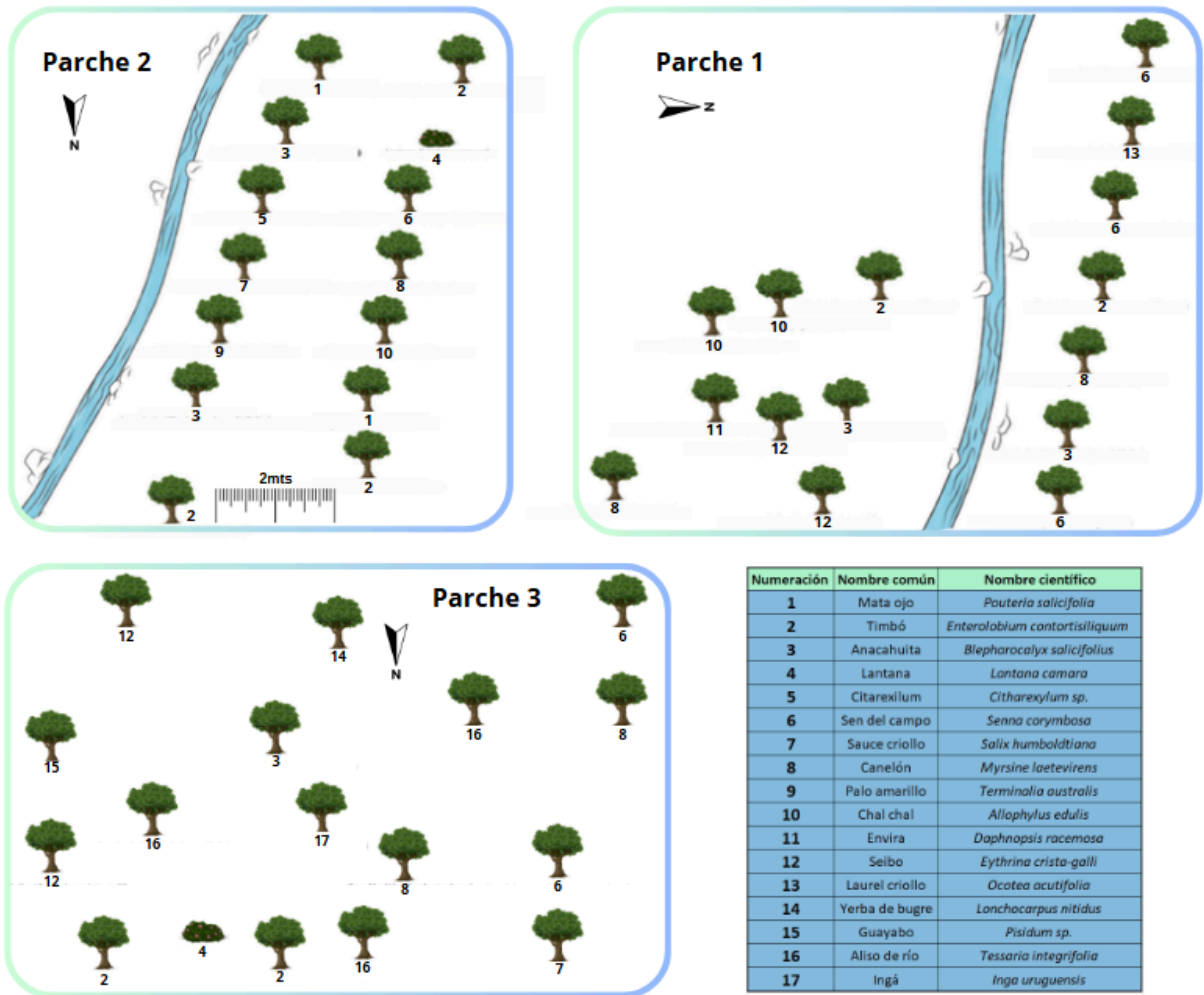


Figura 3.3: Composición de parches de especies nativas en la EEA Delta INTA. Parche 1, parche 2 y parche 3.

Como se mencionó previamente, la composición y ubicación de los especímenes difiere entre los parches. En la Tabla 3.1 se listan las especies presentes en las arboledas, su ubicación en relación a cada una de los tres parches, su nombre común, su nombre científico y la cantidad de especímenes por especie.

Tabla 3.1: Para cada especie se indica la arboleda en la cual se encuentra (1, 2 o 3), el nombre común, nombre científico y la cantidad de especímenes (en caso de

que haya especímenes en distintas arboledas se presentan en orden creciente de arboleda separados por comas), cantidad total de especímenes en todas las arboledas, estado de conservación según UICN y se indica con asterisco (*) si la especie fue utilizada en este trabajo de tesis.

Parche	Nombre común	Nombre científico	Cantidad	Cantidad total	UICN	Utilizadas en este estudio (*)
3	Aliso de río	<i>Tessaria integrifolia</i>	3	3	Preocupación menor	-
1,2,3	Anacahuíta	<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	2,2,1	6	Sin información	*
1,2,3	Canelón	<i>Myrsine laetevirens</i>	1,2,2	7	Sin información	*
1,2	Chal chal	<i>Allophylus edulis</i>	1,2	1	Preocupación menor	-
1	Citarexilon sp	<i>Citharexylum sp</i>	1	3	Sin información	-
2	Envira	<i>Daphnopsis racemosa</i>	1	2	Preocupación menor	-
3	Guayabo	<i>Psidium sp</i>	1	4	Sin información	-
3	Inga	<i>Inga uraguensis</i>	1	1	Preocupación menor	-
1, 3	Lantana	<i>Lantana camara</i>	1,1	2	Sin información	-
2	Laurel criollo	<i>Ocotea acutifolia</i>	1	1	Preocupación menor	-
1	Mata ojo	<i>Pouteria salicifolia</i>	2	2	Sin información	-
1	Palo amarillo	<i>Terminalia australis</i>	1	1	Preocupación menor	*
1,3	Sauce criollo	<i>Salix humboldtiana</i>	1,1	2	Preocupación menor	*
2,3	Seibo	<i>Erythrina crista-galli</i>	2,2	4	Preocupación menor	*
1,2,3	Sen del Campo	<i>Senna corymbosa</i>	1,3,2	6	Preocupación menor	*
1,2,3	Timbó	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	3,2,2	7	Preocupación menor	-
-	Verbena	<i>Verbena bonaerensis</i>	-	-	Sin información	*
3	Yerba de bugre	<i>Lonchocarpus nitidus</i>	1	1	Preocupación menor	-

De las especies nativas presentes en los muestreos a campo, se midió daño por herbivoría y luego se utilizaron para ensayos de laboratorio, sólo aquellas especies de las que fue posible obtener especímenes en viveros. Adicionalmente, se incluyó el Sauce criollo (*Salix humboldtiana*) por su importancia a nivel de conservación a pesar de que no fue posible adquirirlo en viveros.

Protocolo para mediciones

Cada espécimen fue fotografiado sobre un fondo gris una vez al mes durante cuatro meses, desde enero hasta abril (inclusive) de 2019 (Figura 3.4) siguiendo la metodología de Perri (2020). Este período coincide con la etapa de mayor

consumo, es decir, época estival. Esta tarea pudo ser realizada gracias a la colaboración de Patricia Fernandez, Djoney Gomez, Hugo Rossi, Agustín Álvarez Costa y Daiana Perri.



Figura 3.4: Fotografía de Anacahuita (*Blepharocalyx salicifolius*), arboleda 1 (izquierda). Fotografía de Canelón (*Myrsine laetevirens*), Parche 2 (derecha). Fotografías: Daiana Perri.

Para cada uno de los especímenes se tomaron fotografías que permitieron evaluar su follaje durante 4 meses. Se tomó la primera fotografía como el 100% del follaje. Luego, en mediciones subsiguientes se comparó el porcentaje de follaje con la primera medición. En el caso de que hubiese mediciones que, debido al crecimiento, presentaran un porcentaje de follaje superior al inicial, se consideraron las nuevas como 100%. Las comparaciones fueron anotadas y luego se realizaron los gráficos para cada una de las especies.

3.3.2 Jerarquía de consumo en el laboratorio: Ensayos duales

Especies utilizadas: Se utilizaron 8 especies de las cuales 7 de ellas fueron plantas nativas y 1 de ellas fue el sauce americano (*Salix babylonica* var. *Sacramenta*). Esta última es una de las más utilizadas en plantaciones forestales de la zona del bajo Delta del Paraná (*Tabla 3.2*). Cabe destacar que en todos los casos en que se utilizaron hojas de plantas, éstas fueron de la misma madurez, es decir, no se

Tabla 3.2: Especies de plantas utilizadas en ensayos de comportamiento para obtener jerarquías de consumo por hormigas *A. ambiguus*.

Dispositivo experimental: Cada colonia de hormigas fue conectada a una arena experimental a través de un puente de madera. En la arena experimental (Dimensiones: 43 cm x 11 cm x 6 cm), se ubicaron dos hojas frescas y de área similar provenientes de las especies de las plantas utilizadas (*Tabla 3.3 y Figura 3.5*). La arena experimental fue filmada con una cámara web (Logitech C920 Full 30 FPS) desde el momento en que una hormiga tuvo contacto físico con la arena experimental hasta 45 minutos después de esta instancia.



Figura 3.5: Dispositivo experimental de ensayos duales con hojas frescas.

Metodología: Durante cada ensayo las hormigas pudieron cortar y recolectar porciones de las hojas frescas que le fueron ofrecidas. Cada ensayo duró 45 minutos. Las hojas fueron fotografiadas antes y después del ensayo (*Figura 3.6*). En base a las fotos y por medio del programa *ImageJ* se determinó el área de cada una de las hojas, antes y después del ensayo, según el protocolo propuesto por Guerrero Rincón y colaboradores (2012). Se calculó para cada hoja el porcentaje de superficie consumida y se estableció la diferencia de consumo de las dos hojas, como la diferencia entre los respectivos porcentajes.

Cada ensayo consistió en la presentación de un par de hojas. Se presentaron de a pares las 8 especies vegetales utilizadas. Esto generó 28 ensayos que corresponden a las 28 combinaciones posibles. Además, para cada una de las 8 especies, se realizaron ensayos control con dos hojas de la misma especie, para establecer un valor de referencia que indicase cuál es la diferencia de consumo esperable entre dos hojas de iguales características. En total, cada repetición del experimento incluyó 36 ensayos (28 comparaciones duales + 8 controles) que fueron realizados con 6 colonias de *A. ambiguus*. Esto generó un total de 216 ensayos. Todos ellos realizados en época estival.

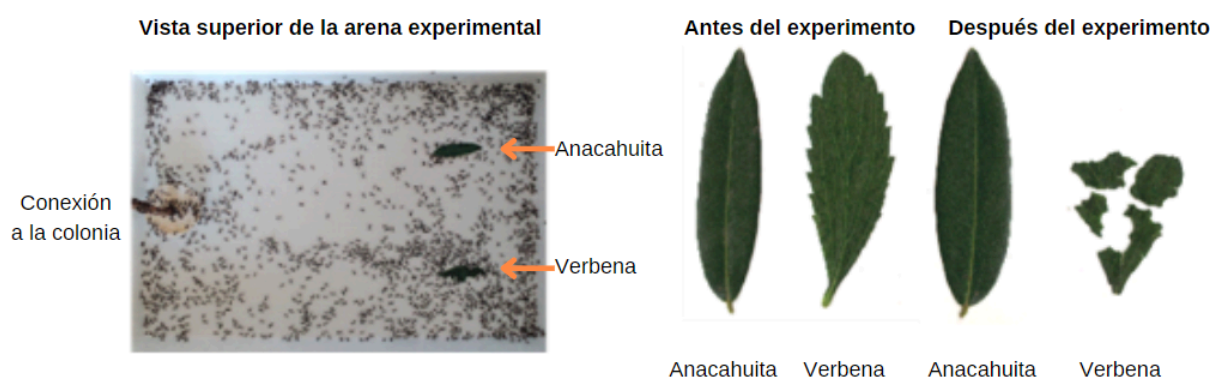


Figura 3.6: Panel izquierdo: Presentación de hojas frescas de las especies nativas Anacahuita -arriba- y Verbena -abajo- en ensayo de consumo dual. Panel derecho: imagen de las hojas de Anacahuita -izquierda- y Verbena -derecha- antes y después del ensayo, respectivamente.

En este ensayo se identificaron tres instancias: : *1er acercamiento*, que refiere a con cuál de las dos hojas fue el primer contacto de una hormiga ; *1er corte*: que refiere a sobre cuál de las dos hojas se realizó el 1er corte; y *consumo*: que refiere a cuál de ambas hojas resultó más consumida al terminar el ensayo. Para cada instancia se calculó una jerarquía de especies. Para calcular la jerarquía de acercamiento se identificó en cada ensayo dual la hoja con la cual una hormiga recolectora tuvo el 1er contacto físico. En ese ensayo, la especie elegida recibió un puntaje de 1 y la otra de 0. Esto se repitió así para los 28 pares de hojas. Cada especie participó de un total de 7 ensayos. Al finalizar se calculó un índice proporcional al número de ensayos en los que resultó elegida. Índice de 1 corresponde a que fue elegida las 7 veces, e índice 0 (cero) a que no fue elegida nunca. Finalmente se hizo un promedio de las 6 colonias evaluadas.

Para calcular la jerarquía de 1er corte, se procedió de la misma manera.

Para calcular la jerarquía de consumo se procedió levemente distinto. Se tuvo en cuenta la diferencia de consumo medida en ensayos realizados con dos hojas de la misma especie (ensayos control). El promedio de diferencia de consumo de todas las especies y todas las colonias se tomó como valor de referencia -11,87- para evaluar el resultado de los ensayos duales (Anexo *figura 3*). Si la diferencia de consumo entre dos hojas era mayor en términos absolutos al valor de referencia entonces se asignaba un “1” a la especie más consumida y un “0” a la menos consumida. Si la diferencia de consumo entre las dos hojas era igual o menor al valor de referencia, se consideraba un empate y entonces se asignaba “0.5” para las dos especies (Perri et al. 2020). El valor de 0.5 para cada una representa el hecho de que ambas fueron elegidas por igual. En base a dichos criterios se completaron con 1, 0 o 0,5 cada una de las celdas de una matriz como la que se muestra en la *Tabla 3.3*. Luego se sumaron los puntajes a lo largo de cada fila. Si una especie resultó ser siempre la más consumida terminó el experimento con un puntaje de 7. Si en cambio resultó ser siempre la menos consumida, terminó el experimento con un puntaje de 0. Si empató en todos los ensayos, entonces terminó con puntaje 3,5. Para calcular la jerarquía de consumo final se promediaron los puntajes de las 6 colonias.

Tabla 3.3: Matriz de comparaciones entre las especies analizadas y suma final de éstas para establecer jerarquía de consumo. Se completó una matriz como esta para cada colonia.

Colonia:	Anacahuíta	Canelón	Seibo	Palo amarillo	Sauce americano	Seibillo	Sen del campo	Verbena	TOTAL
Anacahuíta									
Canelón									
Seibo									
Palo amarillo									
Sauce americano									
Seibillo									
Sen del campo									
Verbena									

3.3.3 Ensayos de preferencia colectiva entre Anacahuíta y Sen del campo

Discos de hoja

A lo largo de esta tesis se realizaron diferentes experimentos con discos de hojas frescas. Para ello, desde este punto en adelante se utilizó la misma metodología: las hojas fueron recolectadas e inmediatamente cortadas con una perforadora para papel. El tamaño de los discos fue controlado midiendo tanto el diámetro de perforación de la perforadora como el diámetro del disco con un calibre digital. Cada lado de la perforadora fue utilizado para una sola de las especies para evitar contaminaciones. Se corroboró que no existieran diferencias en su diámetro (Figura A.2). Los discos de hoja fueron diferenciados a partir de su posición en la arena experimental y en base a sus nervaduras abaxiales (Figura 3.7).



Anacahuíta



Sen del campo



Figura 3.7: Caras adaxial y abaxial, respectivamente, de hojas de Anacahuita (izquierda) y Sen del campo (derecha) a través de lupa.

3.3.3.1 Hojas frescas

Para evaluar la preferencia colectiva de una colonia de hormigas cortadoras, se presentó a ésta un grupo de 12 discos de hojas frescas: 6 discos de Anacahuita y 6 discos de Sen del campo. Éstos se ubicaron de manera intercalada en forma de semicírculo, equidistantes entre sí y todos a igual distancia del puente que conectaba la arena experimental con la colonia (*Figura 3.8*).

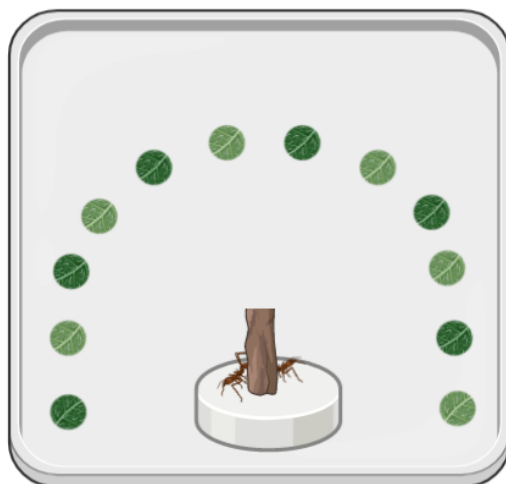


Figura 3.8: Esquema de arena experimental para selección de discos de hojas frescas. La distancia de la bajada del puente a cada disco fue de 6 cm.

Con cada una de las colonias utilizadas se realizaron entre 5 y 3 ensayos. Un ensayo comenzaba cuando una hormiga proveniente de la colonia cruzaba el puente y tomaba contacto físico con la arena experimental, y finalizó a los 30 minutos o bien, cuando se colectaron los 12 discos ofrecidos. Se registró el tiempo en el que una hormiga recolectaba un disco de hoja, teniendo en cuenta el momento en que la hormiga tomaba un disco, lo ubicaba sobre su cabeza y/o tórax y daba un paso con él. Adicionalmente se registró a qué especie pertenecía el disco recolectado. La hormiga que había recolectado el disco y las hormigas a su alrededor, fueron tomadas con una pinza y trasladadas a una arena de espera tal que el siguiente evento de recolección durante el mismo ensayo no se viera influenciado por este comportamiento. Al finalizar el experimento, todas las

hormigas fueron retornadas a la colonia. Ninguno de los discos recogidos durante el experimento llegaba a la colonia, de modo tal que las hormigas recolectoras salientes no tuvieran información acerca del material entrante. Además, al remover del experimento a las hormigas que habían levantado un disco se evitó el posible comportamiento de marcado del camino de recolección con feromonas que generan un refuerzo positivo del camino al sitio de recolección y también otros posibles rastros de olores de la hoja recolectada.

Como medida de la preferencia de las hormigas recolectoras por los discos de hojas frescas de Anacahuíta y Sen del campo se tomó nota de: i) la especie del primer disco recolectado y, ii) la especie de los primeros 6 discos recolectados. El análisis de los datos correspondientes al primer disco se basó en la proporción de réplicas del experimento con la misma colonia en las que el primer disco fue Anacahuíta o Sen del Campo y por ello se obtuvo un solo valor de proporción por colonia (*Figuras 3.15A y 3.17A*). Para analizar los 6 primeros discos, se tuvo en cuenta la proporción de discos de Anacahuíta y de Sen del campo en cada ensayo, y por ello los resultados se expresan como proporción de cada especie en cada repetición del experimento (*Figuras 3.15B y 3.17B*). Ambas constituyen aproximaciones analíticas alternativas y complementarias.

Como una medida cualitativa de la preferencia a lo largo del ensayo, se calculó un índice de selectividad. Teniendo en cuenta la metodología utilizada de diseño experimental sin reposición, el índice que se calculó da cuenta de la preferencia por un elemento (A) por sobre otro (B) a lo largo de todo el experimento y es sensible a la cantidad de discos remanentes de cada uno (Greenwood y Elton, 1979; Allen et al., 1998).

$$\beta_A = \frac{\frac{\text{Remoción A}}{\text{Cantidad A inicial}}}{\frac{\text{Remoción A}}{\text{Cantidad A inicial}} + \frac{\text{Remoción B}}{\text{Cantidad B inicial}}} \quad (\text{Ec. 1})$$

La *Ecuación 1* está pensada para diseños experimentales sin reposición, motivo por el cual utiliza el término *remoción*; da como resultado un índice con valores

entre 0 y 1 (Greenwood y Elton 1979; Allen et al. 1998). El valor 1 corresponde a un valor de máxima preferencia de A sobre B, y 0 (cero) a una mínima recolección de A comparado con B. Esta ecuación considera a una de las especies vegetales (A) como la focal, es decir, la especie sobre la cual se centra el análisis en cuestión. Por lo tanto, se realizará un análisis donde A será una de las especies y B otra, mientras que luego se invierten estos roles. Por otro lado, tanto para el ítem A como para el B, el número de ítems removidos es relativizado en cada término de la ecuación al número inicial de cada uno de los ítems. Sin embargo, dado que en nuestro diseño siempre se comenzó con el mismo número de 6 ítems, dicha relativización no tiene un efecto real en nuestro caso.

3.3.3.2 Extractos foliares en diclorometano

Para evaluar el rol de las ceras superficiales de las hojas, que son censadas por las hormigas a través del contacto, se utilizó el mismo diseño de la sección 3.3.3.1. En este caso se utilizaron discos de papel de filtro en vez de discos de hojas frescas y a cada uno de los discos de papel de filtro se le adicionaron extractos de ceras de las especies vegetales en estudio.

Para ello, los extractos se realizaron sumergiendo 10 gr de hojas de cada una de las especies nativas en 50 ml de diclorometano (grado plaguicida-Sintorgan) durante 20 seg., según Cameron y colaboradores (2002). Posteriormente, el diclorometano fue evaporado bajo una corriente de nitrógeno hasta llegar a 2 ml. Se sembraron 3 µl de solución en cada disco a utilizar en la arena comportamental y se dejó evaporar el solvente. Luego, a cada colonia se le presentó un grupo de 12 discos de papel de filtro con extracto de ceras provenientes de las especies en estudio y discos control (sólo solvente). Estos grupos consistieron en: 4 contenían extracto de Anacahuita, 4 contenían extracto de Sen del campo, y cuatro discos control, para medir la recolección espontánea de discos de papel. Los ensayos fueron realizados en 3 colonias y se repitieron entre 2 y 4 veces con cada colonia. Se calcularon los índices de selectividad al igual que en el ensayo de preferencia colectiva con discos de hojas frescas.

3.3.4. Ensayos de preferencia individual entre Anacahuita y Sen del campo

Dispositivos

Cada colonia fue conectada desde su propia arena de recolección a una nueva arena de recolección experimental (Dimensiones: 43 cm x 11 cm x 6 cm), por medio de un puente de madera. La nueva arena de recolección ofrecía hojuelas de avena con el objeto de marcar el camino de recolección. Una vez que una hormiga retornaba con una hojuela de avena, era tomada con una pinza desde la misma hojuela y trasladada (hormiga+hojuela) hacia el extremo de un segundo dispositivo experimental. Este último varió entre un puente asociado a una plataforma (*Figura 3.9*) y un puente asociado a un olfatómetro de ambiente estacionario (*Figura 3.10*), ambos se describen a continuación.

Luego de trasladar a la hormiga con su hojuela al extremo del puente experimental, se removía la hojuela de avena procurando generar la menor perturbación posible en la hormiga, tal que continúe de manera natural con el comportamiento de recolección y así poder evaluar su comportamiento de preferencia. Esta técnica permitió identificar de manera certera aquellas hormigas motivadas a recolectar. De lo contrario, cuando se utilizaron hormigas elegidas al azar los tiempos de recolección eran demasiado extensos y no permitieron realizar el experimento.

3.3.4.1 Claves de contacto: Plataforma de recolección

Con el objetivo de evaluar la preferencia individual de hormigas recolectoras por discos de hojas frescas de las especies de plantas nativas Anacahuita (*Blepharocalyx salicifolius*) y Sen del campo (*Senna corymbosa*) se utilizó el dispositivo que denominamos plataforma individual de recolección (Saverschek y Roces, 2011). Se utilizaron 3 colonias de *A. ambiguus* a partir de las cuales se logró realizar el ensayo con 91 hormigas, de las cuales 63 respondieron activamente y optaron por uno de los dos discos presentados.



Figura 3.9: Esquema de plataforma, adaptada de (Saverschek y Roces, 2011). La hormiga era depositada en el extremo distal del puente. Los postes verticales estaban pintados con vaselina líquida para que la hormiga no baje del dispositivo. Los discos de hoja estaban lo suficientemente cerca uno del otro para que la hormiga pueda tomar contacto con ambos antes de decidir levantar uno de ellos. La hormiga era depositada en el extremo distal del puente.

Se registró la especie vegetal seleccionada, el tiempo que cada hormiga demoró en realizar la elección, es decir, desde que se depositó a la hormiga en el extremo distal del puente hasta que abandonó la plataforma con un disco de hoja. Adicionalmente, se registró el tiempo transcurrido desde que una hormiga comenzó a manipular uno de los discos de hoja hasta que lo levantó (de ahora en más denominado tiempo de manipulación). Se consideró recolección cuando una hormiga tomó un disco, lo ubicó sobre su cabeza y/o tórax y dió un paso con él.

3.3.4.2 Claves volátiles: Olfatómetro de ambiente estacionario

Con el objetivo de evaluar la preferencia individual de hormigas recolectoras por odorantes provenientes de discos frescos, se utilizó el olfatómetro de ambiente estacionario (Saverschek y Roces, 2011) descrito en la *figura 3.10*. En primera instancia se realizó un control positivo que consistió en la comparación de papel de filtro limpio versus uno con aceite esencial de naranja (extracción del Dr. Hugo Chludil, Biomoléculas, FAUBA). Luego, para los ensayos con plantas nativas fueron utilizadas 4 colonias de *A. ambiguus* a partir de las cuales se logró realizar el

ensayo con 110 hormigas, de las que 92 respondieron activamente y prefirieron una de las dos opciones presentadas.

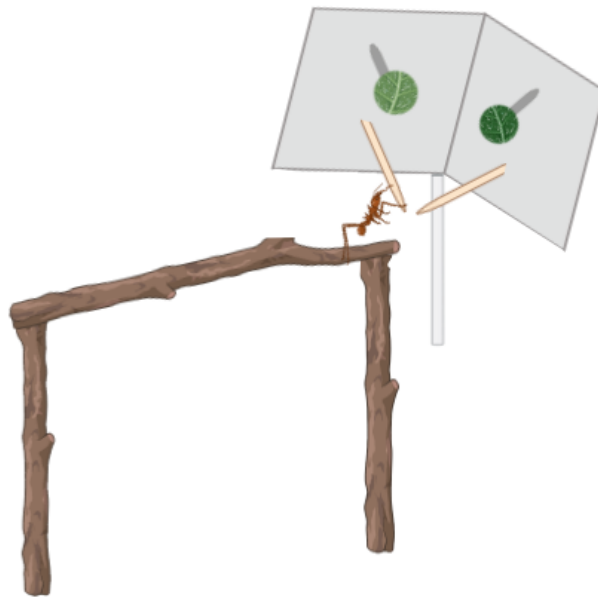


Figura 3.10: Esquema de olfatómetro de ambiente estacionario con discos frescos de las especies de plantas nativas Anacahuita y Sen del campo, adaptado de (Saverschek y Roces, 2011). Una hormiga recolectora era depositada en el extremo distal del puente. En el extremo proximal que conecta el puente a los palillos que conectaban a cada disco, la hormiga necesariamente extendía su par de patas delanteras hacia uno de los palillos para poder cruzar la brecha. La arena experimental estaba ubicada en un ambiente cerrado con el objeto de minimizar corrientes de aire. Los lados izquierdo y derecho estuvieron contrabalanceados en todos los experimentos y se constató que no influyeron en las preferencias.

Cada hormiga experimental fue depositada en el extremo de un puente intermediario (*Figura 3.10*). Durante el tiempo que duró el experimento, la hormiga pudo moverse por el puente hacia el otro extremo del mismo donde se colocó el dispositivo adaptado de Saverschek y Roces (2011). Este dispositivo contó con un cartón fino atravesado por dos palillos de madera ubicados a 90° entre sí y sobre cada uno de ellos se ubicó una aguja de metal, de menor tamaño, con el mismo ángulo y con un disco de hoja fresca o de papel de filtro en su extremo, ubicados de manera balanceada, tal como se muestra en la *figura 3.10*. Los discos de hoja fresca o de papel de filtro se encontraron fuera del alcance de la hormiga,

de modo tal que, para que la hormiga pudiera acercarse a la fuente de olor debió, necesariamente, decidir hacia qué palillo de madera orientarse, dar un paso hacia éste y subir al mismo. Por lo tanto, se registró la decisión de cada hormiga de trasladarse a uno u otro de los palillos y el tiempo que el animal demoró en tomar esta decisión. Luego de su utilización, cada uno de los dispositivos fue descartado excepto por las agujas metálicas que fueron reutilizadas luego de ser lavadas en alcohol 96%.

En primera instancia se realizó un control donde las opciones presentadas consistían en: un disco de papel de filtro tratado con 3µl aceite esencial de naranja al 1% (en diclorometano), y un disco control (solo diclorometano). Luego se realizó el experimento con discos de hojas frescas y de madurez intermedia que provenían de distintos especímenes de las especies nativas Anacahuita y Sen del campo.

3.4 Resultados

3.4.1 Preferencia en el campo: Herbivoría

Se midió el follaje de especímenes completos seleccionados de las especies de plantas a evaluar en los tres parches de plantas nativas a lo largo de una temporada de verano-otoño .

Los tres parches presentaron distinta cantidad de follaje, distribución, composición, luminosidad, tamaño y cantidad de especímenes evaluados. A pesar de esta diversidad en sus características, todos los parches pudieron ser utilizados para las mediciones a lo largo de los meses de verano a otoño (*Figura 3.11*). Se cuantificó la presencia de follaje de Anacahuita (n=9), Canelón (n=6), Sauce Criollo (n=1), Seibo (n=4) y Sen del Campo (n=4).

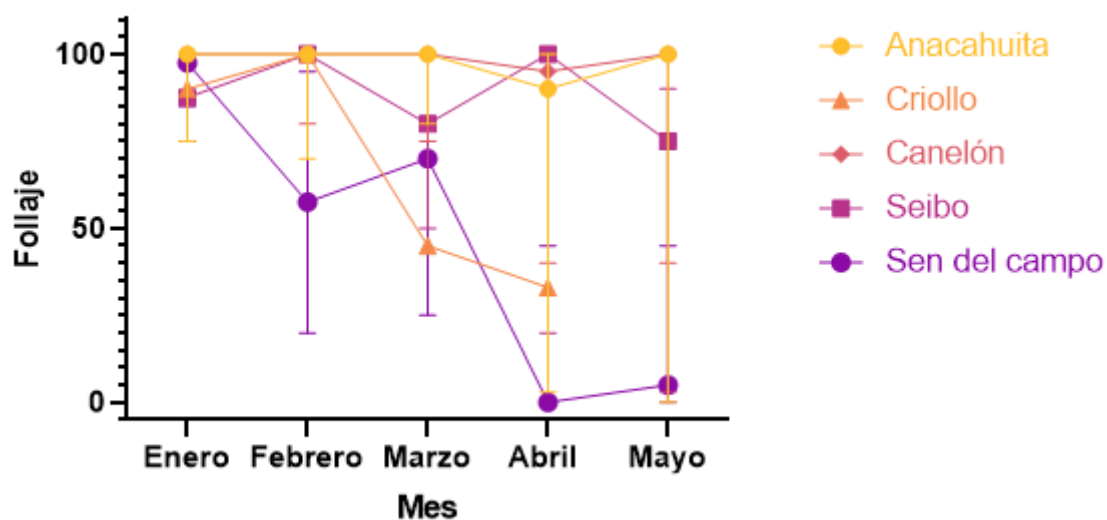


Figura 3.11: Mediana y error (CI 95%) para el porcentaje de follaje de especies nativas a lo largo del tiempo.

Si bien no puede tenerse certeza de que la actividad de hormigas fuese la única causa de la pérdida de follaje, se observó que el tipo de daño y de consumo era compatible con el daño por hormigas cortadoras. Adicionalmente, en el mes de abril 2019 lograron observarse hormigas cortadoras en algunas especies como Anacahuita, Sen del campo, Sauce criollo y Seibo (*Figura 3.12*).

La *figura 3.11* muestra la clara pérdida de follaje de los ejemplares de Sen del campo y de Sauce criollo (o Humboldtiana) en la temporada estival, mientras que las restantes especies no reflejaron este nivel de pérdida de follaje.

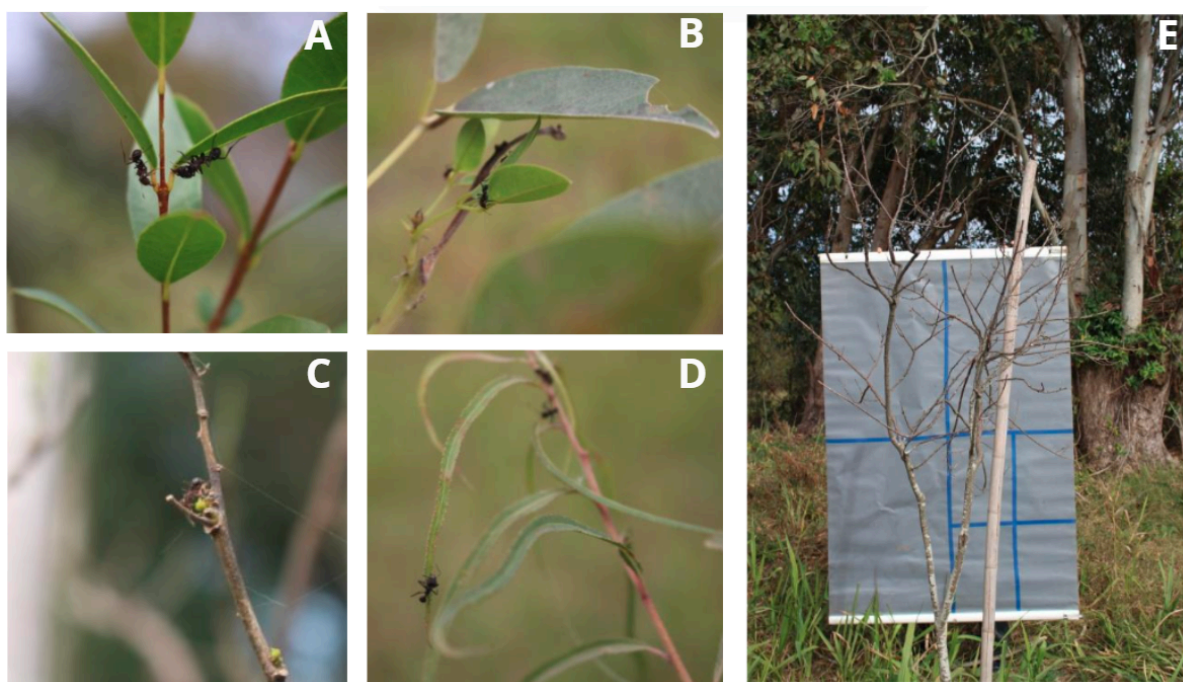


Figura 3.12: Fotografía de hormigas cortadoras halladas sobre plantas de Anacahuita (A), Seibo (B), Sen del campo (C y E) y Sauce criollo (D) en las áreas donde se midió daño por herbivoría

3.4.2 Jerarquía de consumo en el laboratorio: Ensayos duales

En base a presentaciones de a pares de hojas de las 8 especies de plantas nativas en estudio se estableció la jerarquía de preferencia de consumo por hormigas de la especie *A. ambiguus* (ver sección 3.3.2).

Con los resultados de jerarquía de consumo de las seis colonias se realizó un ANOVA de un factor para evaluar el consumo por planta (ANOVA gl-trat=7: gr-error=40; $F=10.40$; $p<0.001$), y luego comparaciones múltiples (test de Duncan para identificar qué plantas eran más o menos consumidas que otras (*Figura 3.13 A*)).

Como muestran las letras en la *figura 3.13A*, las especies en posiciones contiguas en el orden de jerarquía no presentan diferencias significativas entre sí. Se encontraron diferencias significativas ($p< 0.05$) de cada especie con las restantes

no inmediatamente vecinas en el orden. Por lo tanto, aquellas especies con menor jerarquía serán menos preferidas que aquellas de mayor jerarquía. Dentro de éstas, se destacan Anacahuíta y Canelón entre las primeras y, Sen del campo y Verbena, entre las últimas.

La *figura 3.13 B* muestra los mismos datos, ordenados de izquierda a derecha repitiendo los resultados de jerarquía de la *figura 3.13 A*, pero indicando los resultados por cada colonia. Como puede observarse en esta figura, las preferencias pueden variar de una colonia a otra, aunque todas ellas muestran tendencias similares; en especial en relación al consumo de las especies más y menos preferidas (*Figura 3.13 B*).

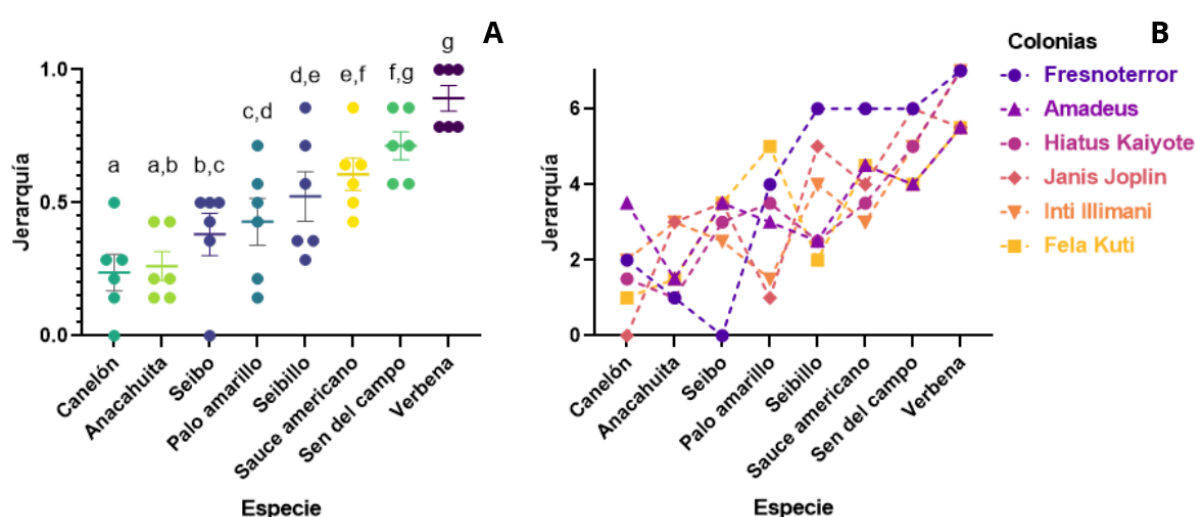


Figura 3.13: A) Jerarquía de consumo de hojas de las especies en estudio. Cada punto representa la proporción de veces en las que la especie indicada sobre el eje X resultó ser la más consumida. Los seis puntos dentro de cada categoría o especie de planta corresponden a las 6 colonias evaluadas. Las barras horizontales y barras de error indican media y error estándar entre colonias. Distintas letras indican diferencias significativas entre especies ($p < 0,0001$; comparaciones post hoc de (Kruskal-Wallis y Dunn, distintas letras indica $p < 0,001$). B) Idem (A) desglosado por colonia de hormigas.

Los ensayos de consumo fueron grabados en video en cinco de las 5 colonias y analizados a posteriori para obtener más detalle del comportamiento de elección

y preferencia. Esta estrategia permitió analizar el comportamiento de consumo de manera segmentada en las etapas de: i) acercamiento, ii) primer corte y iii) consumo (ver materiales y métodos). Para cada una de estas etapas del comportamiento se pudo ordenar a las ocho especies vegetales siguiendo una metodología similar a la mostrada para el consumo (ver materiales y métodos de este capítulo, 3.3.2) . En varias oportunidades fue posible observar que las especies vegetales que provocaron una atracción inicial muy clara luego no resultaron ser la más consumidas.

Se desglosó el comportamiento de consumo del material vegetal en etapas (acercamiento, 1er corte y consumo), se muestran las 3 jerarquías para las 8 especies analizadas (*Figura 3.14 A*). Se observa que el consumo final no puede ser predicho en base al primer acercamiento, pero sí en base al primer corte.

Al evaluar el porcentaje de coincidencia entre el primer acercamiento de la hormiga a la hoja y el primer corte realizado sobre una hoja (jerarquías en figura Anexo), así como el porcentaje de coincidencia entre el primer corte realizado sobre una hoja y el consumo final. Para dicho análisis se tomaron los 28 ensayos realizados con cada colonia y se calculó el porcentaje de coincidencia entre los 28 “acercamientos” y los 28 “primeros cortes”, y del mismo modo para los 28 “primeros cortes” con los 28 “consumos finales”. Un análisis estadístico basado en comparaciones Chi2 contra una distribución al azar mostró diferencias significativas sólo para la segunda etapa, $p < 0.001$ (*Figura 3.14 B*).

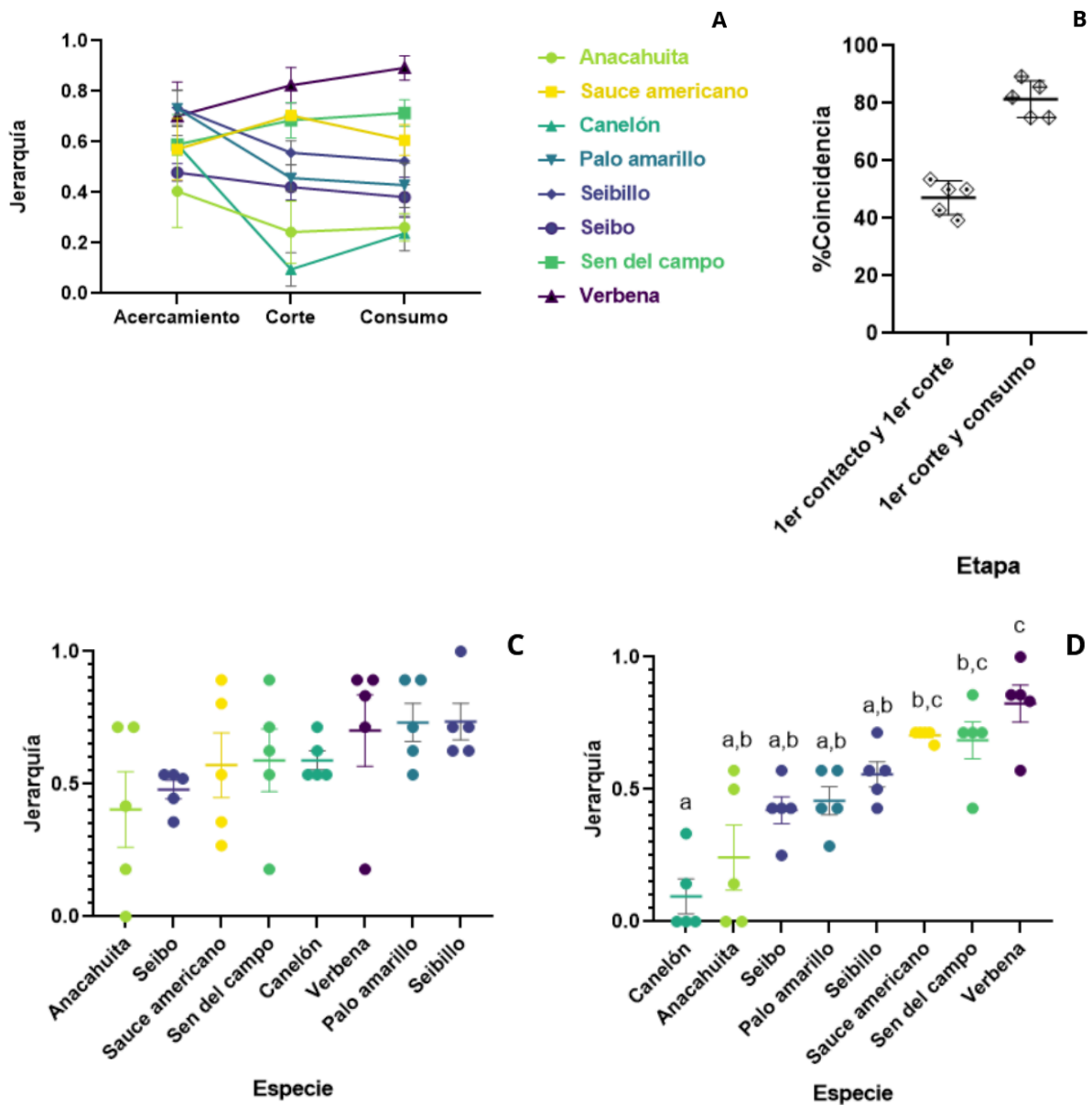


Figura 3.14: A) Jerarquía de acercamiento, 1er corte y consumo para cada una de las especies en estudio. Cada punto en acercamiento y primer corte indica la media y error estándar de 5 colonias. Cada punto indicado en *consumo* es promedio de 6 colonias. B) Porcentaje de coincidencia entre: (i) el primer contacto físico -acercamiento- de la hormiga recolectora con una hoja y el primer corte realizado sobre una hoja y, (ii) entre el primer corte realizado sobre una hoja y el consumo final de las hojas. C) Jerarquía de acercamiento a hojas de las especies en estudio. Cada punto indica la proporción de veces en que la planta indicada en el eje X fue la primera hoja contactada por una hormiga. Barras horizontales y de error corresponden a media y error estándar de 5 colonias. No hubo diferencias significativas entre especies (Kruskal-Wallis 10.40; $p=0.167$). D) Idem C para primer

contacto físico. Distintas letras indican diferencias significativas (Kruskal-Wallis, 28.89 $p < 0.01$; contrastes Dunn $p < 0.05$).

A partir de estos resultados podemos interpretar que el primer acercamiento no es, necesariamente, un comportamiento predictor del consumo final de la hoja fresca. Sin embargo, el primer corte realizado sí lo es.

Resulta muy relevante analizar qué tipo de claves sensoriales intervienen en el acercamiento inicial y cuáles participan desde el contacto hasta el primer corte para que ello derive en el consumo del material vegetal.

En las siguientes secciones se estudiará la relevancia de distintas claves físicoquímicas así como el comportamiento colectivo y el rol del aprendizaje como factores que podrían guiar el consumo del material vegetal.

3.4.3 Ensayos de preferencia colectiva de Anacahuita y Sen del campo

3.4.3.1 Hojas frescas

Preferencia

Para realizar una descripción más exhaustiva de las preferencias de recolección y su relación con distintos tipo de claves sensoriales, continuamos con dos especies vegetales que mostraron perfiles claramente diferentes de preferencia y que, por disponibilidad y características generales, podrían utilizarse en proyectos de reforestación y en programas de manejo de hormigas de tipo *push-pull*. Por ello elegimos a las especies Anacahuita y Sen del Campo como ejemplos extremos dentro de la jerarquía de preferencia de consumo.

Comenzamos con un ensayo de recolección colectiva (Sección 3.3.3). Se analizó el patrón de recolección de 12 discos de hoja fresca, 6 de Anacahuita y 6 de Sen del campo, dispuestos en una arena de recolección. Fueron evaluadas 3 colonias de

hormigas y se realizaron entre 3 y 4 mediciones por colonia, cada una en distintos días. Esto corresponde a un total de 11 repeticiones del experimento.

En cada repetición se analizó a qué especie correspondió el primer disco de hoja recogido. Cada una de las tres colonias el porcentaje de repeticiones en las que el primer disco recogido fue Sen del campo o Anacahuita (*figura 3.15 A*). Para evaluar si la recolección del primer disco difiere de una distribución al azar (50/50), se realizó un test binomial exacto. Los resultados indicaron una desviación significativa de la distribución esperada ($\chi^2=4.45$; $p=0.035$). Para determinar si dicho patrón de recolección de Sen del campo y Anacahuita dependió de la colonia, se realizó una prueba de independencia de Chi-cuadrado la cual no indicó diferencias entre colonias ($\chi^2=0.92$; $p=0.63$). Por lo tanto, hay una clara preferencia por Sen del campo en el primer disco recolectado.

Luego se evaluó la evolución de la recolección, tomando en cuenta el porcentaje de discos recogidos de Anacahuita y Sen del campo cuando la recolección llegaba al 50% de la oferta inicial. La *figura 3.15 B* muestra para cada repetición del experimento el porcentaje recogido de cada especie en ese momento. No se encontraron diferencias significativas entre colonias ni entre repeticiones y se comprobó que la cantidad de discos recogidos de Sen de campo y de Anacahuita resultaron distintos de una distribución al azar ($\chi^2=8.73$; $gl=1$; $p=0.0031$). Por lo tanto, al 50% de la oferta inicial no hay preferencia por una de las dos especies.

La *figura 3.15 C* muestra para cada repetición del experimento, el porcentaje final de discos de Sen de campo y Anacahuita recogidos al completar el tiempo máximo del experimento. Para analizar estadísticamente las diferencias, se realizó un test de Wilcoxon que reveló una recolección significativamente mayor de Sen del Campo (Wilcoxon, $Z= 2,66$; $p= 0.007$).

La *figura 3.15 D* muestra el detalle temporal de la recolección de cada disco de Sen del Campo y Anacahuita en todas las repeticiones del ensayo. De izquierda a derecha se ubican desde el primer disco recogido hasta el sexto (cuando lo hubo). Puede también observarse que conforme avanza el tiempo y la recolección de discos, hubo repeticiones del experimento en las que no todos los discos llegaron a ser levantados, y por ello no en todas las ocasiones hubo un quinto o sexto disco de Anacahuita. Se realizó una prueba de t de muestras pareadas para comparar el tiempo de recolección de cada disco de una especie con su correspondiente de la

otra especie. Es decir, el tiempo de recolección del 1er disco de Sen del campo en determinada repetición del experimento, se comparó con el tiempo de recolección del 1er disco de Anacahuita en ese mismo ensayo. La diferencia promedio de tiempo de recolección entre discos de Sen del Campo y Anacahuita fue de 188 segundos (Prueba de t, test pareado, $p < 0.0001$).

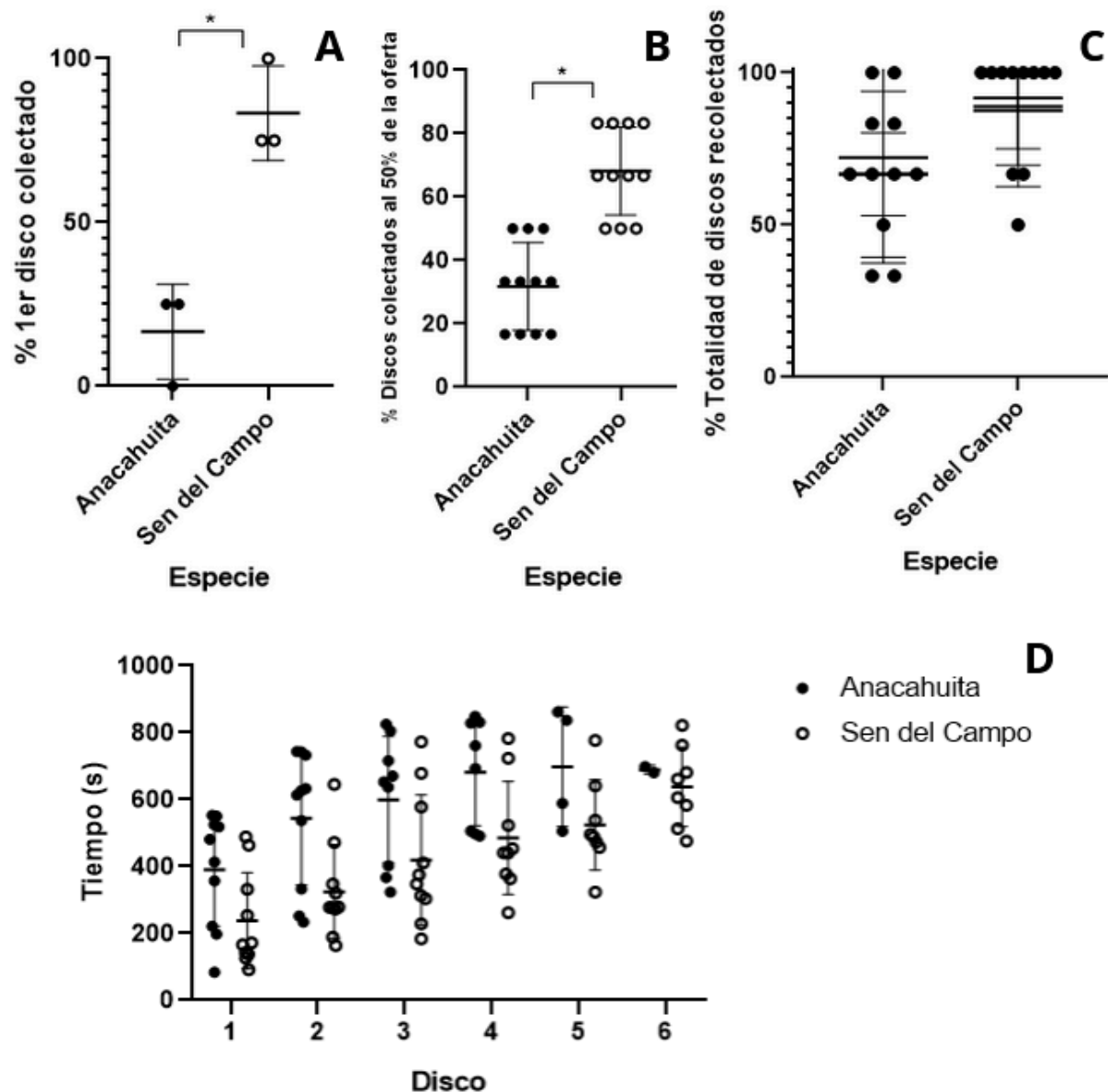


Figura 3.15: Preferencia y dinámica de recolección de discos de Sen del campo y de Anacahuita. A) Porcentaje de ensayos en los que el primer disco recolectado fue Sen del Campo o Anacahuita. Cada punto corresponde a una colonia. Se indican también media y error estándar. B) Porcentaje de discos recolectados al llegar al 50% de la oferta inicial. Cada punto representa el resultado de una repetición del experimento. C) Porcentaje de discos recogidos al finalizar el

experimento. D) Tiempo requerido para la recolección de cada disco. Datos provenientes de 3 colonias, 4 y 3 réplicas independientes en cada uno. Cada punto en la figura representa la recolección de un disco de Anacahuíta o Sen del campo. En la figura están agrupados de izquierda a derecha según el orden en que fueron recogidos. A la figura se superponen el promedio y error estándar de cada subgrupo de discos.

En resumen, se encontró que los discos de Sen del campo fueron recolectados más rápidamente por las hormigas, por lo que interpretamos que son preferidos ante aquellos de Anacahuíta. Sin embargo, el hecho de que los discos de Anacahuíta también fueron recogidos, aunque a una velocidad menor, sugiere que no se trata de un rechazo de estos, sino sólo de una menor preferencia.

Selectividad

El índice de selectividad ofrece una alternativa para analizar, de manera cualitativa y en función de la evolución del experimento, si una de las especies ofrecidas es preferida por sobre la otra. La recolección de la especie observada (focal), es comparada con la de una segunda especie y viceversa, conforme avanza el experimento. La *figura 3.16* presenta los resultados de la ecuación 1 (Sección 3.3.3.1). En el índice de selectividad, los valores cercanos a 0 indican que la especie focal no está siendo seleccionada, mientras que valores cercanos a 1 indican que la especie focal está siendo seleccionada por sobre la segunda.

Observamos una marcada selectividad por Sen del campo, que decae a medida que la proporción de discos de Sen del campo disminuye y de Anacahuíta aumenta, donde el efecto inverso puede verse para Anacahuíta (*Figura 3.16*). A partir del séptimo disco recolectado se observa que la probabilidad de recolectar un disco de Sen del Campo y de Anacahuíta se igualan, lo cual corresponde a valores de β cercanos a 0,5. El índice de selectividad permite corroborar que el número de discos recolectados al llegar a el 50% de la oferta inicial, es buen indicador de la preferencia por las especies en estudio.

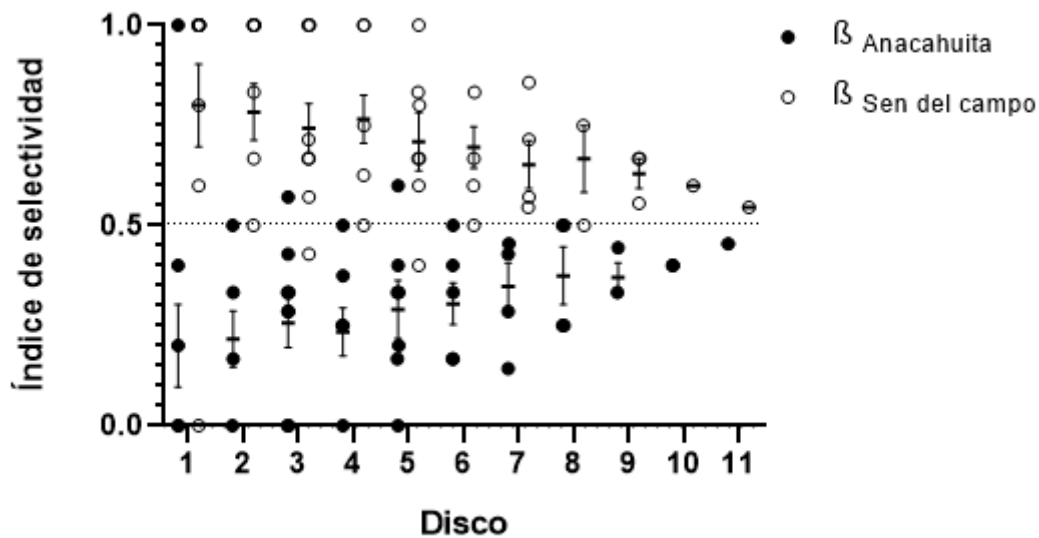


Figura 3.16: Índice de selectividad $\beta_{\text{Sen del campo}}$ y $\beta_{\text{Anacahuita}}$ (Ec. 1) conforme avanza el número de discos de hoja fresca recolectados. Se grafican resultados de 3 colonias. Cada punto del gráfico corresponde al porcentaje de cada réplica (4, 4 y 2) realizadas con cada colonia. En cada caso se indican, para cada disco, la media y su error estándar. Cada réplica recolectó discos hasta agotar la oferta de una especie o hasta el tiempo límite.

Por lo tanto, la selectividad por Sen del campo decae a medida que sus discos de hojas quedan sub-representados en la arena experimental, consecuentemente, aumenta la proporción de discos de Anacahuita. El perfil de cambio en la selectividad a lo largo del tiempo es comprensible en tanto la disponibilidad de discos de Sen del campo es cada vez menor, mientras que la proporción de discos de Anacahuita es mayor. De modo tal que, entre Sen del campo y Anacahuita, existe una preferencia clara por Sen del campo que no es absoluta sino que depende de la disponibilidad.

Por otro lado, el hecho de que las hormigas tardíamente recolectan Anacahuita conforme disminuye la oferta de Sen del Campo, indica que Anacahuita no es rechazada sino que solo es menos preferida que Sen del Campo.

3.4.3.2 Extractos foliares en diclorometano

Preferencia

Dado que las ceras cuticulares son uno de los mecanismos físicos de defensas de las plantas (Erb y Reymond, 2019) así como una posible fuente de claves de reconocimiento, estudiamos la contribución de éstas en la preferencia de las hormigas por Sen del campo y Anacahuíta.

Para ello se analizó la preferencia de cada colonia por 12 discos de papel de filtro que contenían los extractos de ceras cuticulares. En la arena experimental había 4 discos con extractos de ceras cuticulares de Anacahuíta, 4 discos de extractos de ceras cuticulares de Sen del campo y 4 discos de papel con solvente a modo de control. El experimento se realizó con 3 colonias de hormigas y se hicieron entre 5 y 3 ensayos por colonia logrando así 12 mediciones completas.

Para cada colonia se analizó el porcentaje de veces que el primer disco recolectado contenía extractos de ceras cuticulares de Anacahuíta, Sen del campo o ninguna de ambas (*Figura 3.17 A*). La distribución de primeros discos recolectados fue analizada sin encontrar diferencias significativas respecto de una distribución al azar ($\chi^2 = 1.51$; $gl=2$; $p=0.472$). Por lo tanto, no existen preferencias por sobre alguno de estos discos en la primera recolección realizada. Como medida alternativa de una preferencia diferencial entre discos, se analizó el perfil de recolección de los primeros 6 discos de cada ensayo. Observamos que el porcentaje de cada tipo de discos recolectados hasta llegar a 6, es decir, el 50% de la oferta, evidencia diferencias significativas respecto de una distribución al azar ($\chi^2 = 6.33$; $gl=2$; $p=0.042$) -*Figura 3.17 B*-. La comparación del número de discos en cada categoría respecto a una recolección de discos al azar dió diferencias significativas sólo para el grupo de discos sin extractos de ceras cuticulares ($\chi^2 = 5.57$; $gl=1$; $p=0.018$). Por lo tanto, hay una preferencia por discos sin extractos cuticulares, control, mientras que a medida que estos discos son menos representados en la arena experimental esta preferencia deja de evidenciarse.

Finalmente se tomó nota del total de discos recolectados al cumplirse el tiempo del ensayo (*Figura 3.17 C*) y se comprobó que prácticamente el 100 % de los discos fueron recolectados independientemente del origen y la presencia, o ausencia de los extractos de ceras cuticulares.

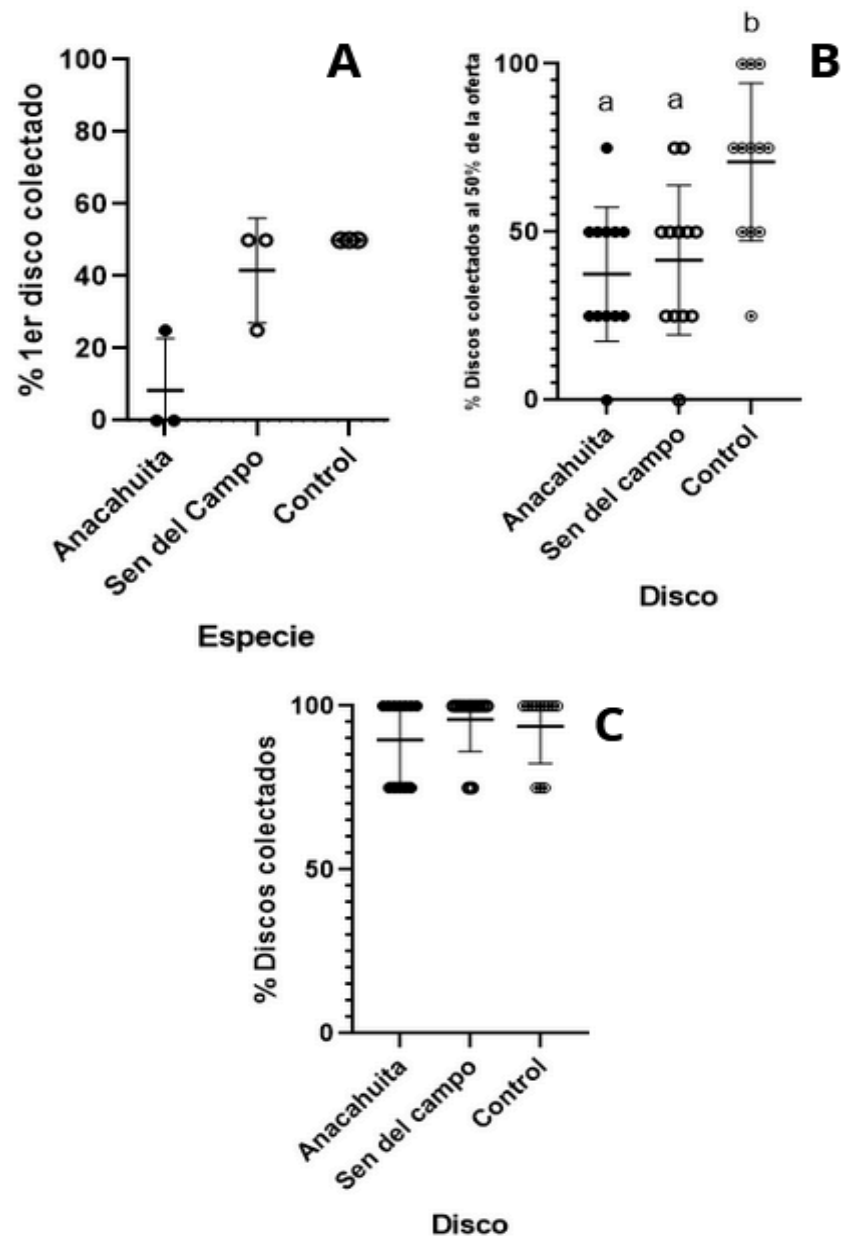


Figura 3.17: Recolección de discos de papel de filtro conteniendo extractos de ceras cuticulares de Anacahuita, Sen del Campo, o control sin extractos de ceras. El experimento se realizó con tres colonias y con cada uno se realizaron entre 5 y 3 ensayos en días distintos. A) Porcentaje de veces que un disco fue recogido como primera elección. Los tres puntos en cada tipo de disco indicado en el eje X corresponden a la proporción de réplicas en las que cada colonia levantó dicho disco como primera opción. Las barras horizontales y barras de error indican promedio y desvío estándar de las 3 colonias. No se hallaron diferencias significativas respecto de una distribución al azar ($\chi^2 = 1.51$; $gl=2$; $p=0.472$). B) Porcentaje de discos de Anacahuita, Sen del campo o control, recolectados al

llegar al 50% de la oferta inicial en cada repetición del experimento. Las barras horizontales y barras de error indican promedio y desvío estándar de todas las réplicas. Distintas letras indican diferencias significativas entre grupos y respecto de una distribución al azar ($\chi^2 = 6.33$; $gl=2$; $p=0.042$). C) Porcentaje de discos con extracto de ceras de Anacahuita, Sen del Campo o control, recolectados al finalizar el ensayo ($\chi^2 = 5.57$; $gl=1$; $p=0.018$).

En base al experimento y al análisis realizado puede concluirse que los extractos de ceras cuticulares de Sen del Campo y Anacahuita no juegan un rol determinante en los índices de preferencia entre ambas especies. En base a las tendencias observadas (*Figura 3.17 A*) y diferencias en cuanto a la recolección al llegar al 50% de discos (*Figura 3.17 B*), podría especularse que los extractos de ceras cuticulares provocan rechazo más que aceptación, lo cual es más notorio en el caso de Anacahuita. Esta última interpretación surge de observar que las hormigas también recogieron discos control sin extractos de ceras cuticulares y que las tendencias sugieren que son más preferidos que los tratados con extractos de ceras cuticulares de Sen del campo y Anacahuita (*Figura 3.17 B*).

Selectividad

Para evaluar la selectividad por discos de papel con extractos de ceras cuticulares de Anacahuita, Sen del campo y control, los resultados debieron, necesariamente, analizarse en díadas ya que la ecuación 1 contempla sólo un ítem focal -sobre el cual se analiza la selectividad- y un segundo tipo de ítem contra el cual se compara. Por lo tanto, el análisis se repitió para las tres combinaciones posibles de Sen del campo, Anacahuita y discos control.

La *figura 3.18 A* evalúa la recolección de discos de Sen del campo (como ítem focal). Luego se realizó el mismo análisis para Anacahuita vs. control (*Figura 3.18 B*) y, por último, para Sen del campo vs. control (*Figura 3.18 C*). Para una mejor visualización se mantuvo Sen del campo como ítem focal en A y C y, Anacahuita en B.

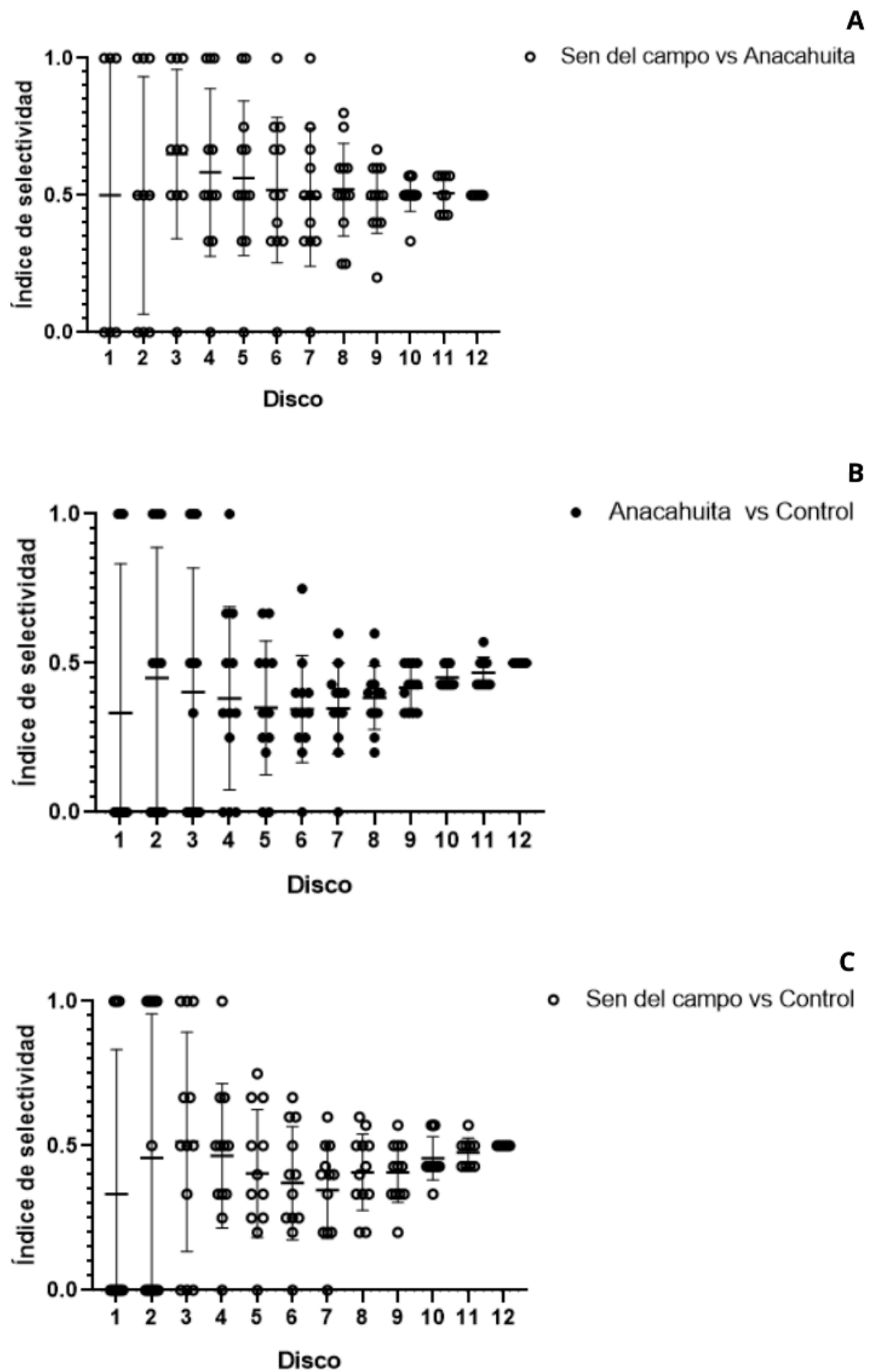


Figura 3.18: Índice de selectividad en función del número de discos de papel de filtro con extractos de ceras cuticulares recolectados por hormigas cortadoras. A)

Sen del campo vs. Anacahuita, cuando Sen del campo es el ítem focal (puntos blancos). B.) Anacahuita vs. control, cuándo Anacahuita es el ítem focal (puntos negros). C) Comparación entre Sen del campo y el control, cuándo Sen del campo es el ítem focal (puntos blancos). Los ensayos fueron llevados a cabo utilizando 4 colonias, con los cuales se realizaron entre 5 y 3 repeticiones, cada punto representa una repetición.

Los valores de selectividad oscilan en torno a 0.5, por lo cual no es posible decir que exista selectividad alguna entre los discos recolectados de Anacahuita, Sen del campo y control a lo largo del experimento (*Figura 3.18*). Si bien para algunos ensayos y en algunos de los eventos de recolección el valor de selectividad dió 0 (cero) o 1 (uno), para otros ensayos en la misma instancia dió valores del extremo opuesto, lo cual revela inconsistencias entre ensayos y colonias que indican una recolección al azar. Por lo tanto, este análisis no evidenció que la diferencia de selección entre Anacahuita y Sen del Campo observada en la sección anterior se deba preferentemente debido a sus extractos de ceras cuticulares.

Control positivo

Los resultados de la sección anterior en relación al efecto de los extractos de ceras cuticulares permiten dudar de la metodología experimental, sea por la efectividad de la extracción de ceras cuticulares, o la oferta de éstas sobre discos de papel. Es decir, la mayor cantidad de recolección de discos control (*Figura 3.17 B*) podría deberse a que los extractos de los compuestos estuvieran más concentrados que en condiciones naturales y, como consecuencia, los discos con extractos de ceras cuticulares sean menos recolectados. Otra posibilidad sería que el tiempo de extracción sea tal que se obtengan más compuestos de los que creíamos extraer y el efecto generado sea que los discos con extracto sean menos recolectados.

Por ello realizamos un experimento control en el cual evaluamos el desempeño recolector de las hormigas utilizando la misma estrategia experimental, pero para dos especies vegetales, de las cuales resulta más fácil conseguir material abundante y sobre las cuales las hormigas cortadoras muestran fuerte actividad de recolección. Utilizamos Fresno (*Fraxinus sp.*) y Eugenia (*Eugenia myrtifolia*),

esta última de la familia de las Mirtáceas al igual que Anacahuita y Canelón (estas dos especies fueron las menos consumidas al evaluar la jerarquía de consumo -Figura 3.13 A-). El tipo de ensayos y la estrategia de análisis fueron igual a los mostrados en la sección anterior para Sen del campo y Anacahuita.

Este experimento se llevó a cabo utilizando 4 colonias y se realizaron 2 ensayos independientes con cada uno de ellos. La *figura 3.19* muestra el desempeño de las hormigas ante discos de papel que contenían los extractos de ceras cuticulares de Fresno y de Eugenia. Se analizó el primer disco recogido en cada ensayo agrupados por colonia (*Figura 3.19 A*). Se observa una tendencia a una mayor recolección de Fresno, sin embargo el resultado no es estadísticamente significativo; muy probablemente por que no pudieron hacerse más repeticiones ($\chi^2=2$; $gl=1$; $p=0.15$). Al analizar el porcentaje recogido de cada tipo de disco cuando la recolección había llegado al 50% de la oferta inicial, la cual si resultó significativamente distinta de una recolección al azar ($\chi^2=10.08$; $gl=1$; $p<0.01$) -*Figura 3.19 B*-. Por lo tanto, los discos de Fresno resultan preferidos ante los de Eugenia. Realizamos además una prueba de independencia de χ^2 , la cual comprobó que la distribución fue homogénea entre las tres colonias ($\chi^2=0.096$; $gl=2$; $p=0.95$). Al analizar la totalidad de discos recolectados al final del tiempo del ensayo se observó una tendencia a una mayor cantidad de discos de Fresno que de Eugenia (Wilcoxon: $Z=1.82$; $p=0.067$).

En resumen, los resultados basados en extractos de ceras cuticulares de Fresno y Eugenia sirven de control positivo de la metodología experimental utilizada para poner en evidencia el rol de los extractos de ceras cuticulares. En definitiva, los resultados refuerzan la interpretación de que las diferencias de recolección entre Anacahuita y Sen del Campo halladas en las secciones anteriores no se deben principalmente al reconocimiento y discriminación de ambas especies en base a sus extractos de ceras foliares.

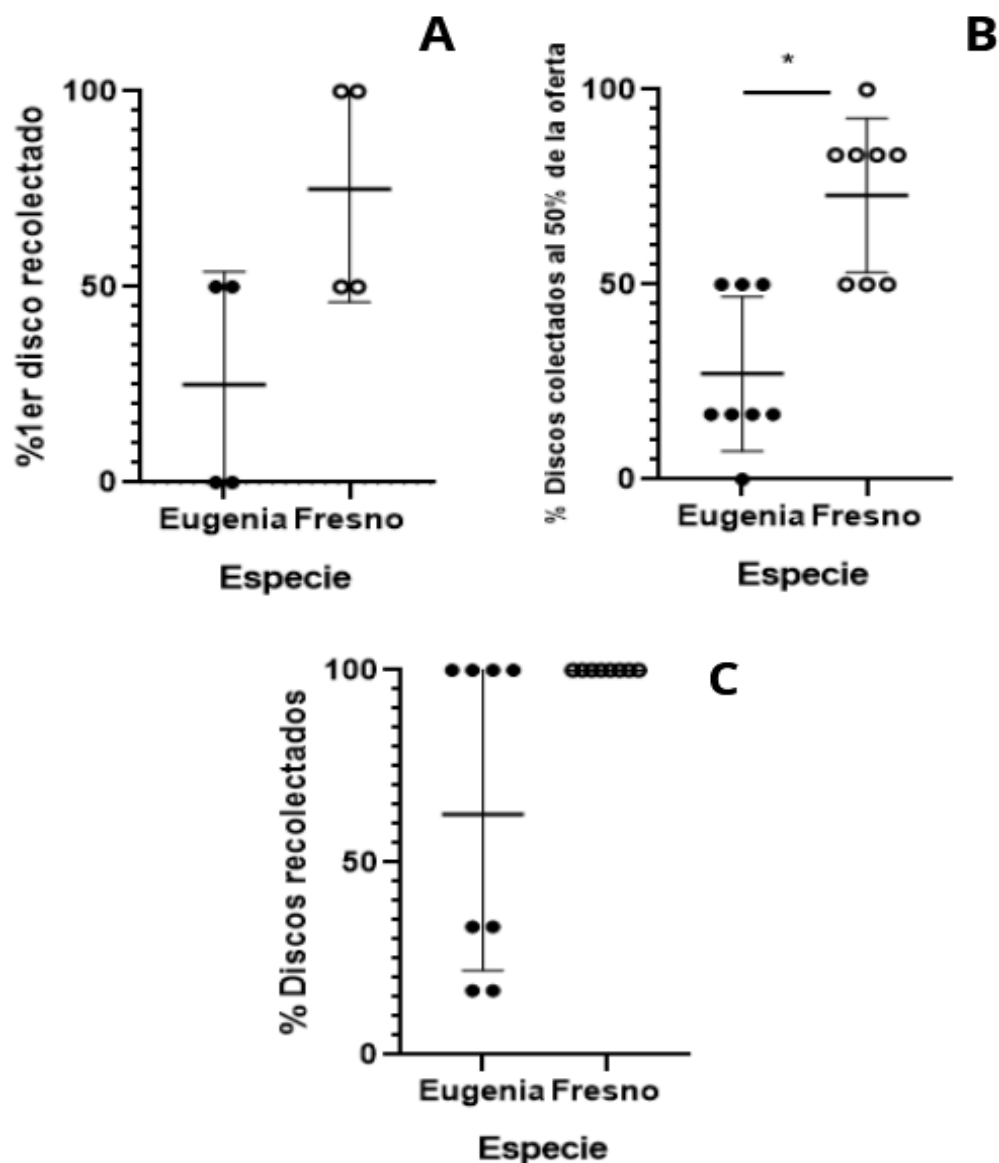


Figura 3.19: Recolección de discos de papel de filtro con extractos de ceras cuticulares de Eugenia (*Eugenia sp.*) o Fresno (*Fraxinus sp.*). A) Porcentaje de veces que el primer disco recolectado perteneció a Eugenia o Fresno. Cada punto corresponde a una colonia. B) Porcentaje de discos de Fresno o de Eugenia recolectados al llegar al 50% (6 discos) de la oferta inicial. Cada punto corresponde a una repetición del experimento. C) Discos totales recolectados al final del ensayo. Cada punto corresponde a una repetición del experimento. Se utilizaron 4 colonias y con cada una se realizaron 2 repeticiones del experimento.

3.4.4 Ensayos de preferencia individual entre Anacahuíta y Sen del campo

Luego de haber estudiado el comportamiento de recolección a nivel colectivo, decidimos estudiar si las preferencias se mantenían a nivel individual.

Para ello se trabajó con dos tipos de dispositivos que permitieron evaluar diferentes tipos de claves sensoriales. Uno de ellos consistió en una plataforma en la cual las hormigas podían tener contacto físico con los discos de hoja (*Figura 3.9*) y el otro consistió en un olfatómetro de ambiente estacionario, en el cual las hormigas sólo tuvieron acceso a claves volátiles (*Figura 3.10*).

La **plataforma** permite presentar dos discos de hojas frescas ubicados de manera contigua con las cuales la hormiga puede tener contacto físico e integrar claves olfativas y de contacto. Es importante destacar que los discos se encontraban ubicados uno muy cerca del otro (aprox. 0.5 cm), por lo cual es muy improbable que una hormiga levante un disco simplemente por ser el primero que encontró, si no que por el contrario, la decisión resulta en una verdadera elección.

En el **olfatómetro** de ambiente estacionario se utilizan dos discos de hojas frescas que se ubican a la misma distancia de la hormiga recolectora, quien debe tomar la decisión de acercarse en dirección de uno u otro disco según claves olfativas.

3.4.4.1 Claves de contacto: Plataforma de recolección individual

Para este experimento se utilizaron 3 colonias de las cuales se evaluaron 106 individuos en total. Se registró la especie del disco de hoja elegido y el tiempo que requirió esta elección, desglosado en: i) el tiempo total que un individuo permaneció en la plataforma hasta recolectar un disco, y ii) tiempo en manipular dicho disco, teniendo en cuenta para este último dato el tiempo transcurrido desde que se da el contacto con el disco de hoja hasta el momento en el cual la hormiga levanta el disco y da un paso en dirección de la colonia (*Figura 3.20*). Dado que la medición del parámetro “(ii) tiempo de manipulación” comenzó a

hacerse una vez que el experimento ya estaba en curso, el número total de esas mediciones fue menor (*Figura 3.20 C*).

Luego, puede observarse la clara preferencia de las hormigas por los discos de Sen del campo por sobre los de Anacahuita (*Figura 3.20 A*). Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas en relación a una recolección de discos al azar ($\chi^2 = 37.24$, $df=1$; $p < 0.01$).

Como muestran las figuras 3.20 B y C, no se encontraron diferencias en los tiempos de permanencia en la plataforma hasta levantar uno de los discos (Prueba de t; $p > 0.99$) y se observó una tendencia, aunque no significativa, a que los pocos individuos que recolectaron discos de Anacahuita, lo hicieron más rápidamente (Prueba t, no paramétrica; $p = 0.077$).

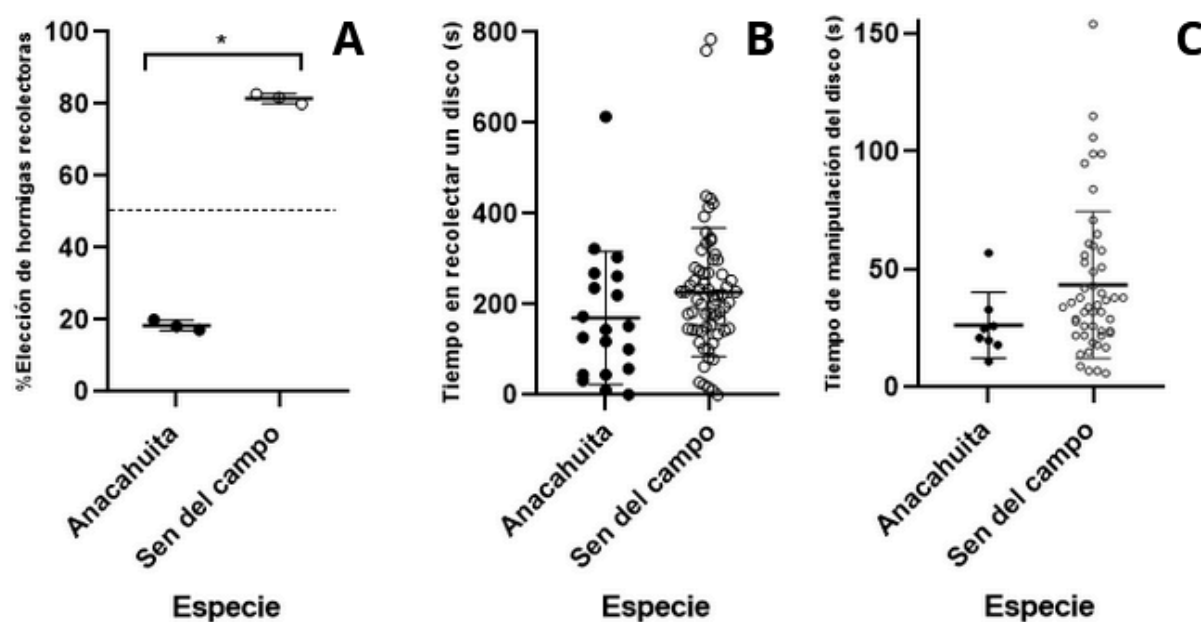


Figura 3.20: Plataforma de recolección individual con opción entre dos discos de hoja fresca de Anacahuita y Sen del campo. Se trabajó con 3 colonias de hormigas. A) Porcentaje de elección del disco entre Anacahuita o Sen del campo. Cada punto indica el porcentaje de veces en que cada individuo de una colonia recolectó Anacahuita o Sen del campo. En el gráfico se indican también la media y desvío estándar. B) Tiempo transcurrido en la plataforma (segundos) hasta recolectar cada disco de Anacahuita o Sen del campo. Se contabilizaron 19 discos recolectados de Anacahuita y 87 de Sen del campo (Prueba de t; $p > 0.99$). C)

Tiempo requerido (segundos) para la manipulación de cada disco de Anacahuita o Sen del campo. Se contabilizaron 8 manipulaciones de Anacahuita y 51 de Sen del campo (Prueba t, no paramétrica; $p=0,077$).

Por lo tanto, las hormigas han preferido los discos de hojas frescas de Sen del campo frente a los de Anacahuita. Además, aunque en menor medida, las hormigas recolectaron también discos de Anacahuita. Este resultado apoya la idea de que esta última provoque rechazo o evitación. También hubo una tendencia a que en las pocas oportunidades en la cuales las hormigas recogieron Anacahuita, lo hicieron a tiempos más cortos con un promedio de 25 segundos, mientras que en muchas oportunidades en las que una hormiga levantó un disco de Sen del campo, el tiempo de contacto con el disco superó el minuto. Aunque resultó sólo una marcada tendencia, esta diferencia podría deberse a la existencia de individuos en estados que conlleven mayores y menores umbrales de aceptación y selectividad. Un contexto como tal explicaría que algunos sujetos que toman una decisión aleatoria lo hagan más rápido.

3.4.4.2 Claves volátiles: Olfatómetro de ambiente estacionario

Para evaluar el rol de las claves volátiles en la preferencia de recolección de las hormigas cortadoras se adaptó el dispositivo de Saverschek y Roces (2011) -*Figura 3.10*-. Inicialmente realizamos un control positivo de la metodología en el cual comparamos la atracción de un disco de papel con esencia de naranja versus un papel de filtro limpio (control).

Se evaluaron 50 individuos provenientes de 4 colonias. Se analizó el porcentaje de individuos que en cada colonia optó por dirigirse hacia el lado de naranja o del papel del filtro limpio, resultando en una mayor preferencia por naranja (*Figura 3.21 A*). La distribución fue homogénea entre colonias, y resultó estadísticamente distintas del azar ($\chi^2= 6.48$; $gl=1$; $p = 0.01$).

Se evaluó la atracción de discos de Anacahuíta versus discos control (38 individuos correspondientes a 4 colonias (*Figura 3.21 B*). Si bien se observaron tendencias a un mayor número de individuos acercándose al disco de Anacahuíta, esta distribución no resultó distinta de un acercamiento al azar ($\chi^2=2.63$; $gl=1$; $p=0.10$).

Luego se dispuso para evaluar la atracción hacia discos de Sen del campo versus discos de papel control. Se utilizaron las mismas 4 colonias y 80 animales. La *figura 3.21 C*, muestra un acercamiento diferencial hacia Sen del campo ($\chi^2=7.2$; $gl=1$; $p<0.01$).

Finalmente, se evaluó la decisión por acercarse a discos de Anacahuíta o Sen del campo en base 92 individuos provenientes de 4 colonias. Evidenciamos la preferencia por Sen del campo (*Figura 3.21 D*), ($\chi^2=5.26$; $gl= 1$; $p=0.02$).

También se analizó el tiempo requerido para cada decisión entre Sen del campo y Anacahuíta, para lo cual no se hallaron diferencias significativas (*Figura 3.21 E*).

Por lo tanto, el dispositivo utilizado permitió evidenciar la preferencia por el olor de un disco de hoja de Sen del campo frente a uno de Anacahuíta. Dicha preferencia no se vió reflejada en el tiempo requerido para la decisión.

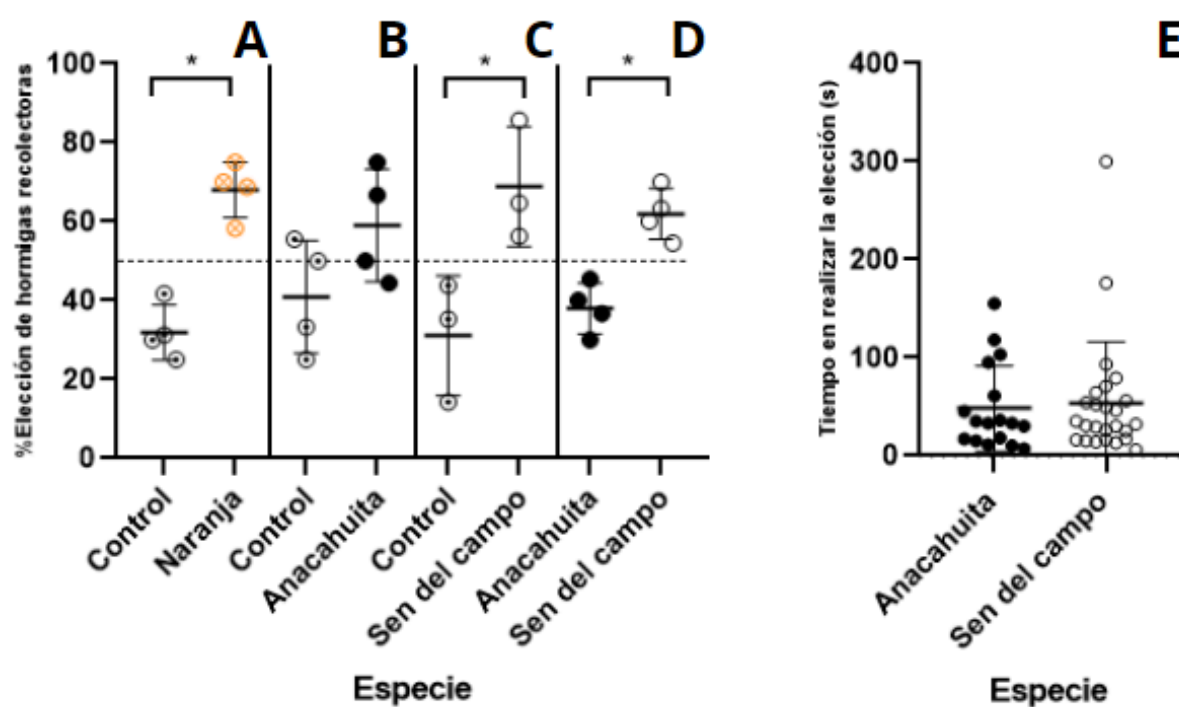


Figura 3.21: Porcentaje de elección de hormiga recolectora en olfatómetro de ambiente estacionario con opción entre dos fuentes de olor. En los gráficos se

representa el porcentaje de eventos de decisiones hacia una fuente u otra para cada colonia. Se presenta también el promedio y desvío estándar entre colonias. Las fuentes de odorantes fueron: A) Control vs. esencia de Naranja ($\chi^2=6.48$; $gl=1$; $p=0.01$). B) Control vs. disco de Anacahuita ($\chi^2=2.63$; $gl=1$; $p=0.10$). C) Control vs. discos de Sen del campo ($\chi^2=7.2$; $gl=1$; $p<0.01$). D) disco de Anacahuita vs. disco de Sen del campo ($\chi^2=5.26$; $gl=1$; $p=0.02$). E) Tiempo requerido (segundos) para que una hormiga tome la decisión de acercarse a una de las dos fuentes de olor provenientes de discos de Anacahuita o Sen del Campo.

En conclusión, las claves olfativas de los discos de hojas frescas son suficientes para generar el comportamiento de acercamiento y además evidencian una preferencia por Sen del campo por sobre Anacahuita.

3.5 Discusión

A través del estudio de herbivoría a campo (*Figura 3.11*) y estudios en el laboratorio de preferencia de consumo de hormigas cortadoras de hojas (*Figura 3.13 A*) se obtuvieron dos especies vegetales, una menos y otra más consumida (Anacahuita y Sen del campo, respectivamente). Luego, se estudió en condiciones de laboratorio la preferencia a nivel colectivo e individual, donde se constató que las colonias estudiadas prefieren recolectar hojas de Sen del campo (*Figuras 3.15, 3.16, 3.20 A y 3.21 D*). A su vez, se encontró que ante diversas ofertas vegetales, el primer corte sobre un ítem es indicador de su consumo (*Figura 3.14 B*). También se encontró que las claves volátiles de las especies vegetales en estudio son suficientes para generar el acercamiento de una hormiga recolectora (*Figura 3.21 D*). La posibilidad de contacto físico con el ítem aumenta la diferencia entre el ítem preferido y no preferido (*Figura 3.20 A*). Mientras que la presencia de los extractos de ceras cuticulares de estas especies disminuye la recolección del ítem (*Figura 3.17 B*).

El estudio de herbivoría a campo en 3 parches distintos de plantas nativas permitió comenzar el abordaje de la problemática con una mirada integral del sitio, considerar la disponibilidad de plantas nativas aledañas a cultivos y la herbivoría a la que éstas son expuestas. Si bien no fue posible identificar la exclusividad de la herbivoría por hormigas cortadoras de hojas, en ocasiones sí fue posible comprobar sobre especímenes vegetales estudiados, la presencia y actividad de hormigas cortadoras.

Adicionalmente, pudo observarse cómo en época otoñal el follaje de Sen del campo y Sauce criollo disminuyó abruptamente, mientras que especímenes mantenidos ante las mismas condiciones de humedad y temperatura de esa misma temporada, pero bajo cuidado de daño por hormigas en las cercanías del laboratorio, presentaron follaje todo el año. Estos elementos permiten pensar que la falta de follaje puede deberse a la herbivoría, particularmente por hormigas cortadoras de hojas ya que fueron observadas *in situ* en estas especies (*Figuras 3.11 y 3.12*).

Al evaluar el consumo en condiciones controladas de laboratorio pudimos realizar comparaciones pareadas entre 2 hojas de área similar y mismo estado de madurez de 8 especies vegetales distintas (*Figura 3.13*). Contamos para ello con 6 colonias de las cuales cada una de ellas presentó una jerarquía de consumo levemente distinta a la del resto pero con semejanzas en términos generales (*Figura 3.13 B*). Estos resultados, que fueron obtenidos en época estival, se condicen con antecedentes que indican variaciones entre colonias de una misma especie de hormigas cortadoras de hojas (Howard, 1987 y Perri et al., 2020), donde hay influencia de la variabilidad anual en la preferencia de una colonia y la variabilidad entre colonias debido a condiciones ambientales, de edad y tamaño de la colonia, la necesidad de la colonia y claves fisicoquímicas de las hojas (Howard, 1987; Meyer et al., 2006; Herz et al., 2007; Montoya-Lerma et al., 2012; dos Santos et al., 2013; Arenas y Rocas, 2017; Perri et al., 2020).

Sin embargo, cabe destacar que, en consonancia con estos antecedentes, hubo especies vegetales en común para todas las colonias dentro de los grupos más y menos consumidos: Verbena/Sen del campo y Anacahuita/Canelón, respectivamente. Esto sugiere que si bien existen sutilezas en las preferencias particulares de cada colonia, también existen factores comunes que pudimos

utilizar para analizar con mayor profundidad las bases de estas preferencias de consumo y que pueden ser tenidos en cuenta para su aplicación en el marco de estrategias de manejo de hormigas en el campo.

Nuestro análisis de jerarquía de consumo de especies vegetales (*Figura 3.13 A*) no sólo es novedoso en cuanto a la información que aporta sobre especies vegetales nativas de la región del Bajo Delta del Paraná, sino que además, revela información de importancia agronómica como por ejemplo, que Verbena (*Verbena bonaerensis*) resulta significativamente más consumida que la especie forestal comercial (*Salix babylonica*). Este resultado es relevante en el marco de estrategias *push-pull*, ya que Verbena podría representar un atractor para hormigas en el contexto de una plantación a la vez que resulta de fácil manipulación en el campo por su carácter herbáceo y perenne (*Anexo, Tabla A.2*). Además, corroboramos la hipótesis de que existen especies vegetales nativas más y menos preferidas que la especie comercial (*S. babylonica*). Encontramos también que la especie Sen del campo podría ejercer un rol atractor y/o trampa en el marco de una plantación con estrategia *push-pull*, con lo cual resulta interesante su análisis a campo en este sentido. Sin embargo, un dato no menor es el hecho de que presenta más dificultades de manipulación que Verbena ya que se trata de una especie leñosa y arbustiva (*Anexo, Tabla A.2*) que podría resultar una opción más resistente y durable ante la presencia humana, de animales de carga (caballos), usos del territorio para silvicultura (territorio con plantaciones de árboles y ganado) o presencia de animales nativos de gran porte como los ciervos de los pantanos (*Blastocerus dichotomus*).

Por otro lado, obtuvimos claros ejemplos de especies nativas significativamente menos preferidas que la especie comercial de *Salix*, como por ejemplo Canelón (*Myrsine laetevirens*), Anacahuita (*Blepharocalyx Salicifolius*), Seibo (*Erythrina crista-galli*) y Palo amarillo (*Terminalia australis*) -(*Figura 3.13 A*)- que pueden ser potencialmente utilizados como disuasorios en un esquema *push-pull*. Por lo tanto, es información valiosa que debe ser tomada en cuenta para el diseño de este tipo de estrategias tal como se ha realizado antes con especies de vegetación espontánea (Perri et al., 2020) pero con el beneficio adicional de utilizar especies nativas y repoblar una región donde la flora nativa ha sido diezmada. Como se menciona en la introducción de esta tesis, la reforestación con flora nativa además

impactaría positivamente en la fauna de la región, particularmente incidiendo positivamente en la población de aves insectívoras.

Por otro lado, el experimento de jerarquía de consumo permitió la segmentación en comportamientos de acercamiento, de corte y de consumo (*Figura 3.14*). Este análisis aportó información en relación a que la decisión de consumir un ítem no es al azar, ni sólo en función del acceso o la abundancia del recurso, sino que dependerá de claves sensoriales que se ponen en juego antes y durante el primer corte de hoja realizado, el cual define el consumo final. Esto se condice con autores que fueron abordados en la introducción, quienes sugieren que las claves que se ponen en juego son esencialmente olfativas pero también de palatabilidad (Littleddyke & Cherrett, 1976, Roces, 1994). Sin embargo, en el experimento diseñado para establecer la jerarquía de consumo, no fue posible identificar las claves sensoriales que modulan el comportamiento de recolección del material vegetal. Para abordar ello se decidió trabajar con las especies Anacahuita y Sen del campo como ejemplos de especies más y menos preferidas (*Figura 3.13*) y se estudiaron las claves sensoriales que determinan la preferencia entre estos dos ítems. Esta decisión resultó de utilidad por las similitudes de estas dos especies en cuanto a su morfología y área foliar, sus características leñosas, perennes, tasa de crecimiento (observaciones en el laboratorio) y por ser de mayor facilidad su obtención en viveros. Ésto último fue un factor relevante ya que al momento de comenzar esta tesis utilizar especies vegetales nativas de la región en estudio resultó un problema en sí mismo dada su baja presencia en la región, producto de la deforestación del monte blanco (1.1.2. Historización de la producción local) y la baja (o nula) producción a gran escala en viveros.

En los dispositivos experimentales empleados para evaluar la preferencia grupal e individual entre Sen del campo y Anacahuita (*Figuras 3.9 y 3.10*), el ataque de herbivoría inicial fue simulado con el daño mecánico mediante un sacabocados para obtener los discos frescos de hojas. Por lo tanto, en ambos experimentos los volátiles emitidos por los discos de hoja pertenecen, por un lado, a los volátiles propios e identificatorios de cada especie y, por otro lado, a los volátiles propios del daño mecánico que simula la herbivoría. Al tener estos elementos en cuenta, podemos considerar al olfatómetro de ambiente estacionario (*Figura 3.10*) como

un dispositivo que permite evaluar el rol de claves olfativas que resultan identificatorias de la especie vegetal y de mecanismos indirectos de defensa. Por otro lado, el dispositivo de plataforma (*Figura 3.9*) y el de recolección colectiva permiten evaluar la preferencia de manera tal que coinciden temporoespacialmente las claves volátiles y las de contacto (mecanismos directos físicos y químicos, así como indirectos químicos).

A partir de los resultados obtenidos en el olfatómetro de ambiente estacionario (*Figura 3.21 A*) podemos inferir que las claves olfativas son suficientes para generar un comportamiento de acercamiento y, además, que éste evidencia la preferencia por volátiles de Sen del Campo por sobre los de Anacahuíta. De modo que la hipótesis general de que las hormigas poseen la capacidad de detectar e identificar especies vegetales preferidas en base a sus olores pudo ser comprobada por este dispositivo. Debemos considerar que las claves volátiles evaluadas fueron relevantes para la distancia estudiada. Resta indagar qué sucede con otras claves sensoriales en otras instancias y en qué medida y a qué concentración las hormigas podrían navegar un pluma de volátiles hasta una planta preferida. Sin embargo, si bien el dispositivo permite evaluar que la especie Sen del campo es preferida en función de sus olores, el hecho de que haya cierto grado de aceptación también por Anacahuíta, no permite concluir que se trate de un rechazo o evitación de esta última. El tipo de dispositivo experimental implica un comportamiento activo por parte de las hormigas, de modo que la evidencia comportamental registrada es de acercamiento a la fuente de olor. Resulta entonces relevante destacar que por el tipo de dispositivo experimental en el que se contrastan las dos fuentes de volátiles, pueden generarse dos posibles desenlaces: que el animal responda acercándose a un estímulo, o bien, que no responde. La respuesta de acercamiento a uno de los estímulos es interpretada como preferencia. Sin embargo, la no respuesta puede implicar rechazo por ambos estímulos, la no resolución de la preferencia, o bien que el animal no se encuentra en estado o con la motivación para responder comportamentalmente (por ej. debido al estrés producto de la manipulación). De este modo, el dispositivo no resulta adecuado por sí sólo para evaluar rechazo de una fuente de volátiles, aunque sí resulta adecuado para evaluar grados de preferencia.

Al comparar los resultados obtenidos en el ensayo de la plataforma y en el olfatómetro de ambiente estacionario (*Figuras 3.20 y 3.21*, respectivamente) observamos que las diferencias en la preferencia son mayores en el dispositivo de plataforma. De hecho el porcentaje de recolección de Anacahuita disminuye en un aproximadamente 20% al pasar de la modalidad olfativa a una que además presenta claves de contacto. A nuestro entender esto implica que las claves sensoriales olfativas pueden ser moduladas por otras claves sensoriales (de contacto) que pueden incluir mecanismos de defensa directos (físicos y químicos) o bien que quedan expuestos aspectos nutricionales de las hojas. El hecho de que los discos de hojas frescas ya presentaban un daño mecánico, afectaría la preferencia ya que cada especie contendrá además volátiles de daño producto de los mecanismos de defensa ante herbivoría. Queda pendiente resolver en qué medida los volátiles de daño influyen la preferencia estudiada. Sin embargo, queda claro que no resultan disuasorios o repelentes ya que ambas especies, en distinta medida, fueron aceptadas. Por lo tanto, esta sección permitió corroborar la hipótesis de que las claves volátiles y de contacto son relevantes y determinan el acercamiento y la recolección de un ítem.

En relación al análisis del tiempo para la expresión comportamental de la preferencia no se observaron diferencias estadísticamente significativas, pero sí una tendencia que es interesante de interpretar e investigar (*Figura 3.20 C*). Una proporción importante de hormigas tomó la decisión de levantar un disco en menos de un minuto. Cuando fue así, el tiempo resultó indistinto para Sen del campo y para Anacahuita. Cuando los tiempos fueron mayores, las hormigas sólo recolectaron discos de Sen del campo, la cual resulta en términos generales la especie más preferida. Esta posibilidad indicaría la presencia de un grupo de animales, que se encuentren menos motivados a recoger el material y en ese caso se vuelvan más selectivos y sólo levantan Sen del campo. Por otro lado, el hecho de que la recolección de Anacahuita fue escasa pero rápida indicaría que los animales no tienen un rechazo por la misma. Finalmente, no debe descartarse la existencia de diferencias de preferencia entre individuos, incluso de la misma colonia.

Si bien los volátiles de estas especies nativas resultan suficientes para evocar una respuesta comportamental de acercamiento y consumo, la diferencia en la

elección resulta mayor si más modalidades sensoriales participan en la toma de decisión tanto a nivel individual (*Figura 3.20 y 3.21*) como colectivo (*Figura 3.15*). Estos resultados permiten complejizar el análisis en relación a otras claves sensoriales que podrían modular la elección basada en los volátiles de las especies vegetales. No obstante, resulta relevante destacar la importancia del análisis tanto individual como colectivo de una colonia de organismos, especialmente cuando se trata de especies eusociales.

Previamente se consideraba una colonia como un superorganismo (Wheeler, 1911) mientras que en la actualidad existen otras posturas, como la del organismo con un sistema auto-organizado con una inter-identidad (Canciani et al., 2019). Canciani y colaboradores abogan por entender a las colonias de organismos eusociales como sistemas en forma de red donde las interacciones se dan en el marco de trabajo auto-organizado que le confiere a nivel colectivo una complejidad mayor a otros grupos de organismos, y no requiere de un control vertical respecto a su organización. Esto implica que las colonias de organismos eusociales se comportarían con individualidad, es decir, que habría una cohesión tal en su organización que regule los comportamientos individuales de manera que se comporte como una unidad en términos reproductivos y en cierta medida en términos de su fisiología y desarrollo. Estos elementos son ejemplos de inter-identidad, entendida como la identidad emergente de diferentes identidades interactuando, que a su vez, son afectadas por la identidad emergente que conforman. De ello se desprende, la importancia del análisis del comportamiento de organismos eusociales no sólo en términos individuales sino colectivos y en función de la colonia a la que pertenecen. Esta propuesta se condice con las observaciones obtenidas ya que, si bien ciertos animales tienen una preferencia clara hacia una especie a nivel individual (*Figuras 3.21A y 3.20 A*) esto no se ve necesariamente reflejado a nivel de la colonia (*Figura 3.15*); e incluso cada colonia analizada tuvo una jerarquía de preferencia levemente distinta (*Figura 3.15 B*).

Al analizar las preferencias en la elección a nivel colectivo (*Figura 3.15*) los resultados fueron consistentes con aquellos encontrados a nivel individual (*Figura 3.20 y 3.21*). Incluso, las diferencias en el primer disco colectado (*Figura 3.15 A*) son similares a las halladas a nivel individual (*Figura 3.21 D*). Sin embargo, si bien los discos de Sen del campo son colectados en mayor medida, los discos de

Anacahuita, aunque más lentamente, siguen siendo colectados a pesar de que existan aún discos de Sen del campo en la arena experimental (*Figura 3.15 C y D*). En múltiples oportunidades se registraron observaciones de hormigas que intentaron recolectar alguno de los discos de hoja fresca y fueron interceptadas por otra/s, también hubo múltiples casos de hormigas que iniciaron pero no concluyeron el comportamiento de recolección. Una posible explicación a estas observaciones podría ser que la aceptación de un ítem se dé en pasos sucesivos, es decir, ante claves volátiles de cercanía y luego ante claves de contacto. Otra posibilidad, no excluyente de la primera, es que las decisiones individuales sean moduladas por congéneres. Esta propuesta se ajusta a los resultados del olfatómetro de ambiente estacionario (*Figura 3.21*). Al revisar estos resultados vemos que, los datos obtenidos permiten inferir que los volátiles de Sen del campo resultan atractivos para las hormigas recolectoras pero también que existen, aunque en menor proporción, hormigas que se ven atraídas a los volátiles de Anacahuita (*Figura 3.21*). De modo que proponemos que la preferencia por volátiles de Sen del campo es mayor a aquellos de Anacahuita y que esta preferencia sería luego reforzada ante las claves de contacto. Sin embargo, ante la posibilidad de un conflicto en el cual los estímulos sensoriales no sean lo suficientemente salientes para definir un comportamiento de recolección/no recolección, entonces, las hormigas requerirían y/o serían beneficiadas por retroalimentación (positiva o negativa) de sus congéneres. Un ejemplo de ello sería a través del comportamiento de *delay rejection* (Herz et al., 2008) o la información del “basurero” (Arenas & Roces, 2016.). Estas posibilidades están en línea con la propuesta de la colonia como una inter-identidad (Canciani et al., 2019).

Considerando la colonia como una inter-identidad (Canciani et al., 2019) cabe analizar su preferencia. Para ello habría que evaluar las consecuencias de la recolección sobre el hongo, lo cual se verá reflejado en el comportamiento de las hormigas: éstas dejarán de recolectar aquel material que sea perjudicial para el hongo simbiote, la materia orgánica muerta de cámaras fúngicas se acumulará en el sector de residuos así como el material vegetal recolectado que resulte perjudicial. Adicionalmente, si alguna hormiga intentara recolectar el material vegetal perjudicial para el hongo, otras impedirían el ingreso de este material a la

colonia (Arenas, 2016a). En los estudios realizados la preferencia colectiva se condice con la preferencia individual y la jerarquía de consumo evaluada en el laboratorio y en el campo, dónde Sen del campo es preferida por sobre Anacahuita (*Figura 3.13, 3.15, 3.18, 3.20 y 3.21*). Resulta interesante entonces resaltar que las distintas instancias de evaluación a campo y en el laboratorio, individuales y colectivas, han aportado información relevante y consistente en relación a las preferencias por estas dos especies vegetales, resultando en una marcada preferencia por Sen del Campo mientras que otras como la relevancia de los extractos de ceras cuticulares de las hojas (*Figura 3.18*) mostraron no ser suficientes para desencadenar el comportamiento de recolección, incluso la presencia de extractos de ceras cuticulares sugiere cierta valencia negativa ya que los discos control fueron significativamente más colectados (*Figura 3.17 B*). El tener en cuenta todos estos elementos da motivos suficientes para reforzar la hipótesis de que las claves de contacto son una segunda instancia de incorporación de información relevante para la toma de decisión, luego de las claves volátiles de cercanía.

Para finalizar podemos dar cuenta de que los dispositivos utilizados, en su conjunto, resultaron útiles para contrastar las hipótesis planteadas y para comprender como una/s modalidad/es sensorial/es, en este caso, de contacto, puede modular otra/s, en este caso, volátiles.

Capítulo 4: Plasticidad en la preferencia de recolección en función de la experiencia

4.1 Introducción

En el capítulo anterior se mencionó que el comportamiento colectivo en insectos sociales surge de las múltiples interacciones individuales (Arenas y Roces, 2015), lo cual da lugar a patrones altamente estructurados (Bonabeau et al., 1997). Un ejemplo de ello son los patrones de retroalimentación positiva en la recolección, que se basan en señales químicas como las feromonas (Deneubourg y Goss, 1989). Sin embargo, el comportamiento observado a nivel individual no necesariamente se refleja de la misma manera a nivel colectivo. Algunos comportamientos que a nivel individual se identifican de forma discreta o categórica, pueden describirse y cuantificarse como variables continuas a nivel colectivo, dependiendo de cuántos individuos los realizan y cuántos no. Además, es importante señalar que los comportamientos de recolección a nivel colectivo no están determinados por necesidades o lógicas individuales, sino que se ajustan a las necesidades de la colonia. En muchos casos, estas necesidades están relacionadas con el crecimiento y los requerimientos del hongo simbiote, y solo de manera indirecta y a modo transitivo con los requerimientos de las hormigas (Arenas y Roces, 2018). Cuando las hormigas recolectoras retornan a la colonia, éstas obtienen información relevante acerca de otros recursos disponibles y pueden modificar su conducta de recolección dependiendo de esta nueva información (Arenas y Roces, 2018). Por lo tanto, la colonia actúa como un nodo de información.

En la Introducción general y en el Capítulo 3 se destacó la importancia de diversas claves sensoriales, especialmente las químicas volátiles, como herramientas para la orientación y el reconocimiento de especies vegetales por parte de las hormigas cortadoras. Es por ello que cada espécimen vegetal puede entenderse como una fuente de múltiples estímulos que son asociados al estímulo recompensante de una recolección exitosa y a las consecuencias finales de la recolección, es decir, los efectos en el hongo simbiote, ya sean éstos beneficiosos o negativos para el hongo y, por lo tanto, para la colonia.

Se ha demostrado que la eficiencia en la recolección mejora significativamente con la experiencia acumulada en la tarea y con la colaboración grupal (Li et al., 2014). En este capítulo evaluamos la existencia de dos tipos de preferencias: las *innatas* y las *adquiridas*. Las primeras refieren a preferencias inherentes a cada grupo de interés (en este caso: hormigas recolectoras) y que se expresan sin que medie experiencia previa con la especie vegetal, ya sea aceptación o rechazo. Las segundas refieren a preferencias que emergen a través de la experiencia con la especie vegetal. En términos prácticos, nos referimos a la posibilidad de que las hormigas pasen a aceptar o preferir una especie vegetal inicialmente rechazada o ignorada, o a rechazar una especie vegetal inicialmente atractiva.

Cuando cierta información adquirida en base a la experiencia se mantiene en el tiempo se denomina *memoria* y, de manera genérica, se llama memoria a la combinación de procesos que incluyen la codificación de la nueva información, su almacenamiento y su evocación. La existencia de procesos de aprendizaje y memoria, se evidencia comportamentalmente como un cambio en la conducta. Un ejemplo de ello en el contexto de la recolección por hormigas es la *plasticidad* asociada a la recolección de ítems con fines alimenticios. El aprendizaje y la memoria pueden evidenciarse como la modificación de las preferencias por los ítems a recolectar, ya sea pasando a aceptar o preferir ítems que no eran recolectados en un origen, o que pasen a ser rechazados luego de haber estado entre los aceptados. El panorama es más complejo si además consideramos que individualmente las hormigas cortadoras pueden estar sujetas a modulaciones de sus preferencias en función de influencias del comportamiento colectivo. Bien podría esperarse que una hormiga cambie su preferencia de recolección, y que ello no dependa de una experiencia directa con la recolección de un determinado recurso, sino que ese cambio sea resultado de interacciones con compañeras de colonia, o en base a información que se desprende del funcionamiento colectivo de la colonia. Por ejemplo, el tipo de ítems de descarte que se acumulan fuera del hormiguero por no haber sido incorporados o por haber sido removidos del hongo simbiote, también constituye información disponible para las hormigas recolectoras al entrar y salir de hormiguero, y se sabe que ello afecta el perfil de recolección (Arenas y Roces, 2015). Deben contemplarse también fenómenos de aprendizaje de rechazo demorado (*delayed avoidance* en inglés), el cual consiste

en el rechazo de la colonia por ítems recolectados y que solo varios días o semanas después muestran un efecto negativo sobre la colonia o sobre el hongo simbiote (Herz et al., 2008). En dicho casos, resulta crucial reconocer las características del ítem que resultó perjudicial varios días o semanas después de su recolección, y de esa manera poder evitarlos (Arenas y Roces, 2015). El aprendizaje de rechazo demorado se ha reportado tanto en experimentos en laboratorio (North et al., 1999; Camargo et al., 2003; Herz et al., 2008; Saverschek y Roces, 2011) como de campo (Ridley et al., 1996; Saverschek et al., 2010). Este efecto pudo observarse a campo utilizando fragmentos de hojas y también gránulos de fungicida de sabor que luego se generalizó a otros sabores. Además, es relevante destacar que las obreras y recolectoras, en sus propias áreas de incidencia, son capaces de rechazar material recolectado que sea potencialmente peligroso para el hongo simbiote. De este modo la información sobre qué ítem rechazar se encuentra extendida en distintos ámbitos de la colonia. A su vez, la aceptación o rechazo de un ítem puede depender del contexto en el cual la hormiga tomó contacto con ese ítem. Cierta olor puede formar un aprendizaje apetitivo si se presentó en el contexto del cultivo del hongo simbiote, mientras que el mismo olor puede generar un aprendizaje aversivo si éste se presentó en el basurero de la colonia, donde se acumulan restos del hongo y hormigas muertas y en descomposición (Arenas y Roces, 2018). El carácter negativo que toma un ítem que está presente en el basurero quedó recientemente demostrado en experimentos a campo, en los cuales se reportó que hormigas de la especie *A. lundii* pasan a rechazar hojuelas de avena, altamente palatables, después de algunas de estas fuesen colocadas estratégicamente en el basurero de la colonia (Alma et al., 2024).

En el Capítulo 3 describimos la jerarquía de consumo de 8 especies vegetales e investigamos con mayor detalle el tipo de claves sensoriales que guían el comportamiento de preferencia entre dos especies nativas ubicadas en los extremos de dicha jerarquía. Los experimentos fueron llevados a cabo con distinto número de colonias y los resultados fueron consistentes aún entre colonias distintas. Cabe aclarar que las colonias nunca fueron alimentadas con plantas que después fueran a ser utilizadas en los experimentos. Esto fue realizado con el propósito de homogeneizar al máximo el punto de partida de cada colonia, teniendo en cuenta la posibilidad de que la experiencia previa y la alimentación

regular con una especie vegetal pudieran influir en la preferencia de la colonia por esa especie.

En este capítulo se propuso evaluar en qué medida las preferencias que hemos encontrado son innatas y rígidas, o si las mismas dependen de la experiencia. Para ello, se llevaron a cabo experimentos con el objetivo de determinar el grado de preferencia inicial de cada colonia y evaluar un posible cambio de preferencia tras forzar a las colonias a recolectar durante varios días exclusivamente de una especie vegetal inicialmente menos preferida.

Estimamos que este tipo de información también es muy relevante en el diseño de esquemas de reforestación y estrategias de manejo *push-pull* de hormigas en el contexto de plantaciones de interés comercial.

4.2. Objetivos e hipótesis

Objetivo

Establecer si las preferencias de recolección observadas en el Capítulo 3 en relación a Sen del campo y Anacahuita son de naturaleza innata y si las mismas son inamovibles, o constituyen una característica plástica y modulada por la experiencia.

Hipótesis

1. El perfil de preferencia innata de *A. ambiguus* por Sen del campo y Anacahuita puede ser modulada a través de la experiencia de recolección con ambas especies.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Diseño experimental y manejo de las colonias de hormigueros.

Con el objetivo de determinar si el orden de preferencia entre dos especies vegetales es de carácter rígido o si el mismo puede ser modificado por la experiencia, se llevó a cabo un experimento que tuvo como objetivo medir las preferencias iniciales y posibles cambios en función de la experiencia.

La figura 4.7 muestra el protocolo experimental y de manejo de cada colonia, para medir las preferencias colectivas e individuales por Anacahuita y Sen del campo, antes, durante y después de una secuencia de tratamientos.

Inicialmente se mantuvo a las hormigas privadas de alimento fresco. Sólo contaron con agua, avena, arroz y polenta durante 4 o 5 días. Esto fue realizado para homogeneizar las condiciones iniciales de las colonias y para hallarlos motivados a recoger material fresco durante las mediciones.

Luego, se midió la preferencia de las hormigas recolectoras por discos de hojas de Anacahuita y Sen del campo (1era medición), tanto de manera individual como de manera colectiva, del mismo modo que se lo hizo en el Capítulo 3.

Posteriormente se ofreció a cada colonia sólo hojas de la especie que había resultado ser la menos preferida durante la determinación inicial, que en todos los casos fue Anacahuita.

Tras 4-5 días se volvió a medir la preferencia individual y colectiva de las hormigas recolectoras (2da medición). Entre 4 y 5 días después de continuar con la oferta de hojas de Anacahuita se repitió una 3ra medición.

Luego, se volvió a privar a la colonia de alimento fresco durante 3 o 4 días y se llevó a cabo una cuarta medición, también llamada “final” de la etapa Anacahuita.

Con dos colonias se pudo continuar el experimento a una segunda etapa que consistió en ofrecer hojas frescas de Sen del campo. Se midió 4-5 días después (5ta medición) y de nuevo a los 8-10 días de oferta exclusiva de Sen del campo (6ta

medición). Por último volvió a dejarse a las colonias sin material fresco por 5 días y se realizó la última determinación de preferencia (7ma medición).

Cada experimento completo con una colonia tuvo una duración de 26-33 días. Dados los requerimientos del diseño experimental, el experimento pudo llevarse a cabo de a una colonia por vez. La longitud variable que se indica en ciertos intervalos, por ejemplo 4-5 y 8-10 d, fue porque se evitó hacer determinaciones de preferencia los días de lluvia o días con condiciones climáticas inestables.

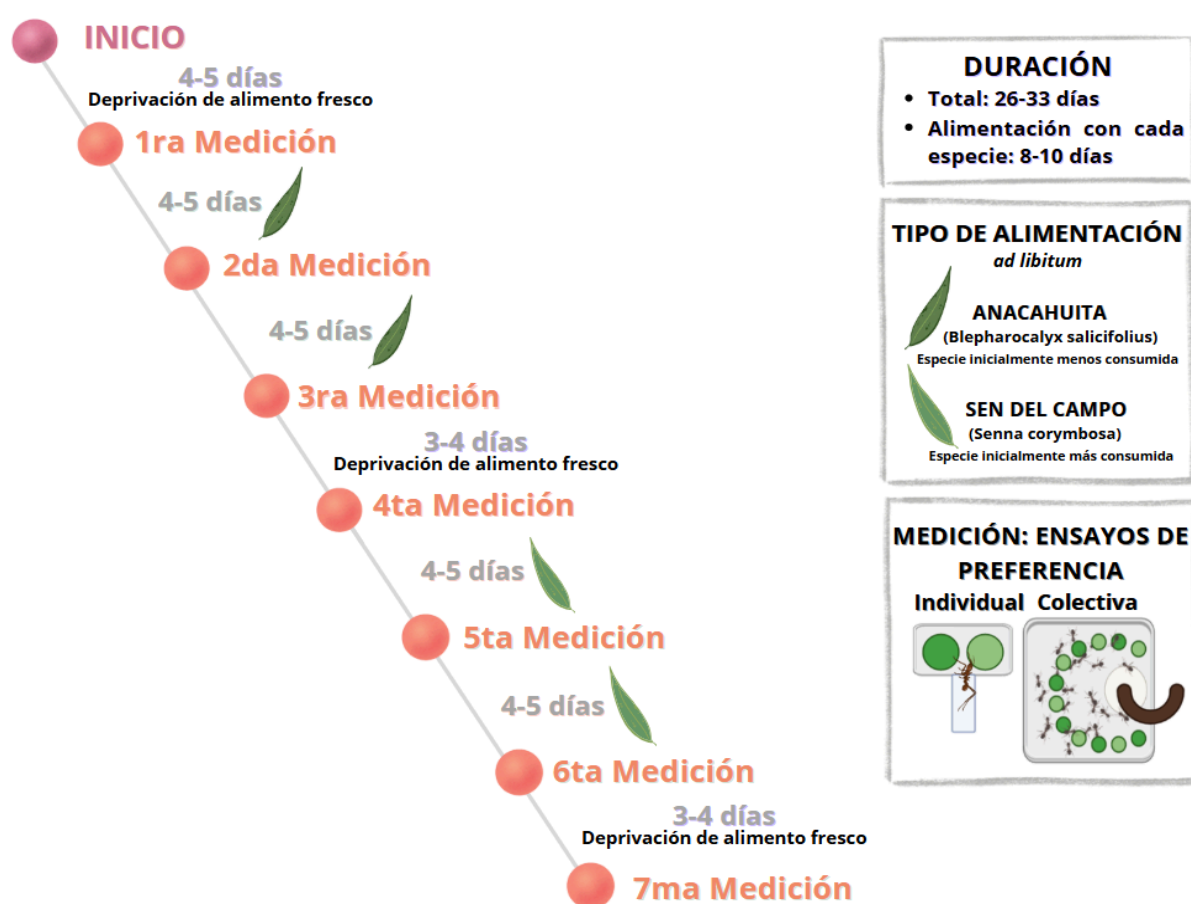


Figura 4.1: Esquema del diseño experimental utilizado.

4.3.2: Ensayos de preferencia

Se utilizaron los mismos ensayos de preferencia detallados en el Capítulo 3. Se utilizó el dispositivo de la plataforma para determinar la recolección a nivel

individual, y se utilizó la arena de 12 discos para determinar la preferencia colectiva.

4.4 Resultados

4.4.1 Innato o adquirido: ¿La preferencia depende de la experiencia?

Para evaluar si el orden de preferencia entre Sen del campo y Anacahuíta es una característica innata y rígida, o si el mismo puede ser modulado por la experiencia de la colonia se realizaron experimentos en la plataforma de recolección individual (*Figura 3.9*) y en la arena de preferencia colectiva (*Figura 3.8*). El experimento comenzó con 3 colonias. Con dos de ellos pudieron completarse las dos etapas, una primera de oferta exclusiva de Anacahuíta y una segunda de oferta exclusiva de Sen del campo (*Figura 4.1*) Con una de las colonias se pudo completar solo la primera etapa de oferta exclusiva de Anacahuíta.

Plataforma de recolección individual

La *figura 4.2* muestra los resultados de preferencia individual por discos de Sen del Campo y Anacahuíta, discriminados por colonia y a lo largo de las sucesivas mediciones: antes, durante y después de los tratamientos, con oferta exclusiva de Anacahuíta o Sen del campo.

Primero se evaluó si la recolección de discos de ambas especies al inicio del experimento difería de una distribución al azar y si ésta era homogénea entre colonias. En esta instancia inicial no se hallaron diferencias entre colonias ($Chi^2=0.57$; $gl=2$; $p = 0.74$), pero sí claras diferencias respecto de una distribución esperada al azar. La misma resultó a favor de una clara preferencia por discos de Sen del campo ($Chi^2=16.13$, $gl=1$; $p<0.01$) tal como había sido determinado en el Capítulo 3.

En la segunda medición, luego de 4 a 5 días de Anacahuíta como única oferta de hojas frescas, la situación cambió. Esta vez hubo diferencias significativas entre colonias ($Chi^2=7.5$, $gl=2$; $p=0.02$) y en términos generales la recolección de discos de ambas especies se igualó ($Chi^2=1.2$; $gl=1$; $p=0.27$). En la tercera medición, luego de 8 a 10 días de oferta exclusiva de Anacahuíta, la recolección de ambas especies volvió a ser semejante a la inicial y a favor de Sen del campo. Si dicha reversión se hubiese consolidado en las siguientes mediciones, podría tratarse de una evitación de Anacahuíta debido a un efecto adverso de ésta sobre el hongo o la colonia.

Previo a la cuarta medición, se volvió a dejar a las colonias durante 4 días sin ingreso de material fresco, para hacer la determinación de las preferencias entre ambas especies similar a la inicial y en la cual se había observado la preferencia por Sen del campo. Esta vez se hallaron diferencias entre colonias ($Chi^2=7.75$; $gl=2$; $p=0.02$) y en términos ($Chi^2=1.81$; $gl=1$; $p=0.178$), por lo cual interpretamos que las preferencias entre ambas especies se equipararon luego de que las colonias estuvieran forzadas a incorporar Anacahuíta a la circulación del hormiguero.

Terminada la primera etapa, las colonias comenzaron a recibir Sen del campo como oferta exclusiva de material fresco. Desde esta etapa del experimento sólo pudo continuarse con dos colonias. El análisis de preferencia luego de 4 días de incorporación exclusiva de Sen del campo no mostró diferencias entre la recolección de una especie u otra ($Chi^2=1.69$, $p=0.194$) pero sí un efecto dispar entre colonias ($Chi^2=6.68$, $p=0.035$). Un perfil muy similar de recolección de Anacahuíta y Sen del campo se repitió 10 días después de recoger exclusivamente Sen del campo y en la determinación final, luego de 4 días sin incorporación de material fresco.

Todos los análisis de preferencia fueron complementados evaluando el tiempo de manipulación de cada disco de hoja que fue recolectado. La *figura 4.2 B* muestra cada valor, además del promedio y error estándar, discriminados en función del tipo de disco y de la instancia del experimento. Se hallaron diferencias significativas para los tiempos de manipulación de Anacahuíta y Sen del campo, en la sesión inicial y final de la primera etapa, así como en la quinta medición luego de iniciar la oferta exclusiva de Sen del campo (Prueba de Mann-Whitney, $U=18$; $p=0.03$; $U=50$; $p<0.01$; $U=14$, $p<0.05$, respectivamente), pero no se hallaron

diferencias para los tiempos de manipulación de una misma especie antes y después de los tratamientos. Por lo tanto, no creemos que esta variable resulte indicadora de un cambio en la preferencia.

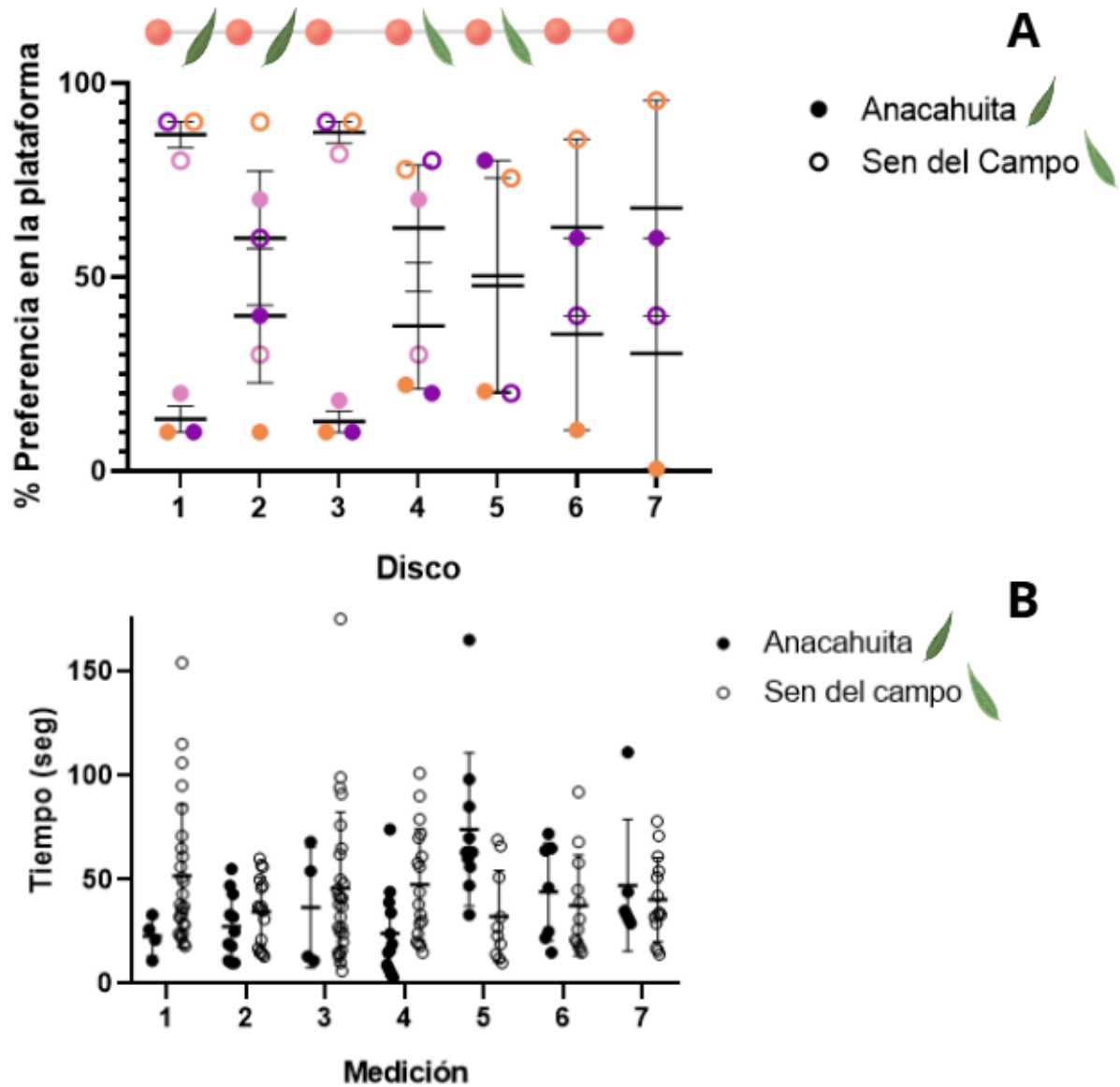


Figura 4.2: Preferencia por Anacahuita y Sen del Campo antes, durante y después del tratamiento con oferta exclusiva de Anacahuita y Sen del campo. Arriba de los gráficos se representa el esquema del diseño experimental. Cada medición se indica con esferas naranjas sobre la línea temporal, en gris, y las hojas indican el material vegetal utilizado para alimentar las colonias, primero Anacahuita y luego, Sen del campo. A) Cada punto del gráfico corresponde a una colonia y representa el porcentaje de hormigas que levantó el disco de Anacahuita o de Sen del campo. En cada caso se indican la media y error estándar entre colonias. Cada

color corresponde a una colonia distinta. B) Cada punto del gráfico corresponde al tiempo de manipulación de cada disco de hoja recolectado (segundos) en función del tipo de disco (Anacahuíta, en negro y Sen del campo, en blanco) y de la etapa del experimento.

En resumen, observamos diferencias en los perfiles de recolección inicial y final, luego de que las hormigas recolectaron durante 10 días y como única opción la especie vegetal inicialmente menos preferida, Anacahuíta. Sin embargo, los cambios resultaron ser dispares entre colonias, a pesar de que todos ellos fueron tratados siguiendo estrictamente el mismo protocolo y esquema de manejo. Los tiempos de manipulación de discos de Sen del campo y Anacahuíta mostraron diferencias entre sí, con la misma tendencia observada en el Capítulo 3. Sin embargo, dichos tiempos no se alteraron con el tratamiento.

Ensayos de preferencia colectiva:

En cada etapa del experimento también se analizó la preferencia colectiva por Sen del campo y Anacahuíta utilizando la arena de recolección en la que se ofrecían 6 discos de una especie y 6 discos de la otra.

El perfil de recolección se evaluó en cada instancia del experimento, antes, durante, y luego de los periodos con oferta exclusiva de Anacahuíta o Sen del campo. A diferencia del análisis mostrado en el Capítulo 3, en este caso se optó por no tomar en cuenta el dato del primer disco recolectado, ya que se contaba solo con tres o dos determinaciones (una por colonia y por instancia) y por ello no fue considerado un dato confiable.

Para cada colonia y cada instancia del experimento el porcentaje de discos de Anacahuíta y de Sen del campo que fueron recolectados al llegar al 50% de la oferta inicial (*Figura 4.3*). Si bien en este caso también sólo se cuenta con 3 determinaciones para cada instancia del experimento, cada dato surge de un muestreo de 6 discos por medición. El perfil de preferencias muestra una distribución dispar entre colonias en la etapa inicial y una distribución de preferencia a favor de Sen del campo aunque no llegó a ser estadísticamente distinta de una distribución esperada al azar ($Chi^2 = 2$; $p = 0.15$). Conforme transcurrió el experimento y las tres colonias fueron sometidos al mismo

tratamiento con oferta exclusiva de Anacahuita, la distribución entre colonias se hizo más homogénea.

Al cambiar la oferta por Sen del campo, la respuesta volvió a ser dispar entre colonias y tendieron a igualarse recién en la medición final del experimento.

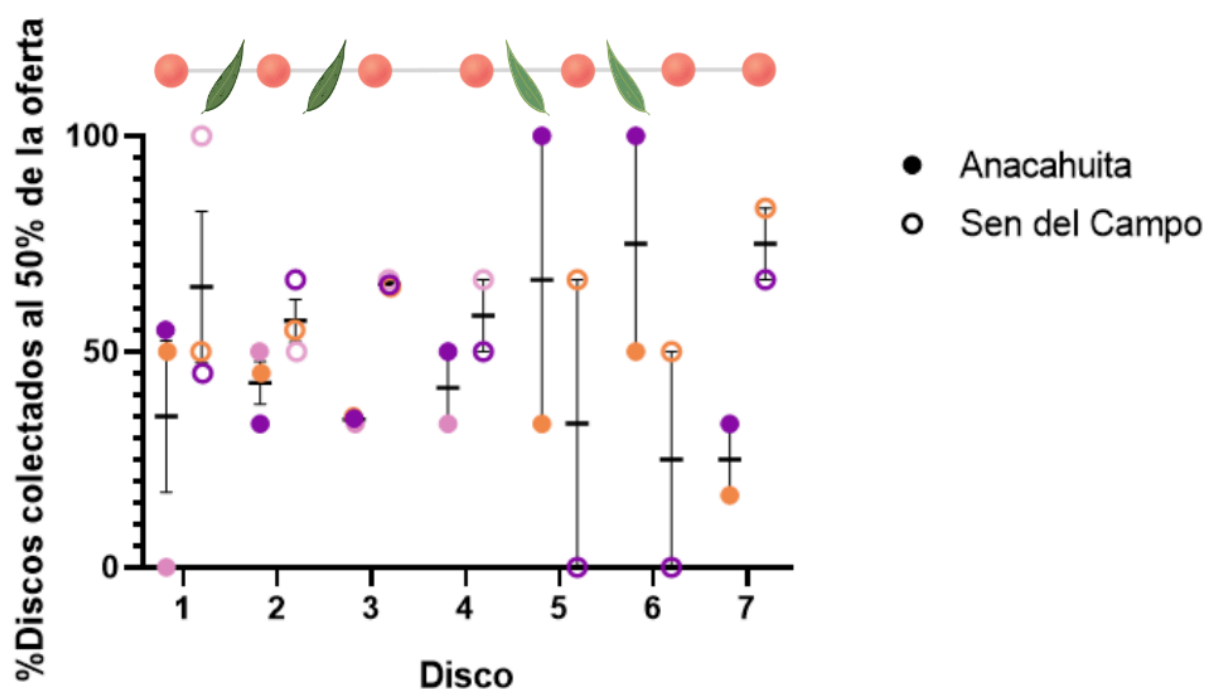


Figura 4.3: Porcentaje de discos de Anacahuita y de Sen del campo recogidos al llegar al 50% de la oferta inicial en cada medición del experimento. Cada punto representa los resultados de una colonia y un mismo color representa los resultados de una misma colonia, correspondientes a una única medición.

Los datos de esta sección no llegaron a ser suficientes para generar un análisis e interpretación rigurosa de los efectos. Sin embargo, las tendencias observadas sugieren que las preferencias por ambas especies no fueron estables a lo largo del experimento, lo cual podría estar vinculado a modulaciones inducidas por los tratamientos. Además, los efectos no fueron homogéneos para todas las colonias, lo cual impulsa la hipótesis de preferencias ajustables en base a la experiencia y requerimientos particulares de cada colonia.

Selectividad

Se analizó el índice de selectividad en función de los discos de hojas recolectados, para cada una de las etapas experimentales (*Figura 4.4*). Los perfiles observados corroboran la selectividad por Sen del campo sobre Anacahuita en la etapa inicial del experimento (*Figura 4.4 A*). En las etapas posteriores, dicha selectividad se fue suavizando, aunque en ningún momento se observó una inversión completa hacia una mayor preferencia por Anacahuita. Por lo tanto, se interpreta que las preferencias tendieron a igualarse (*Figura 4.4 B*), es decir, no se evidencia selectividad. Al final del experimento, luego de 10 días de haber vuelto a recolectar Sen del campo, el perfil se mantuvo sin selectividad por las especies en estudio en los primeros discos recolectados (*Figura 4.4 C - totalidad de las mediciones en Anexo figura 5*).

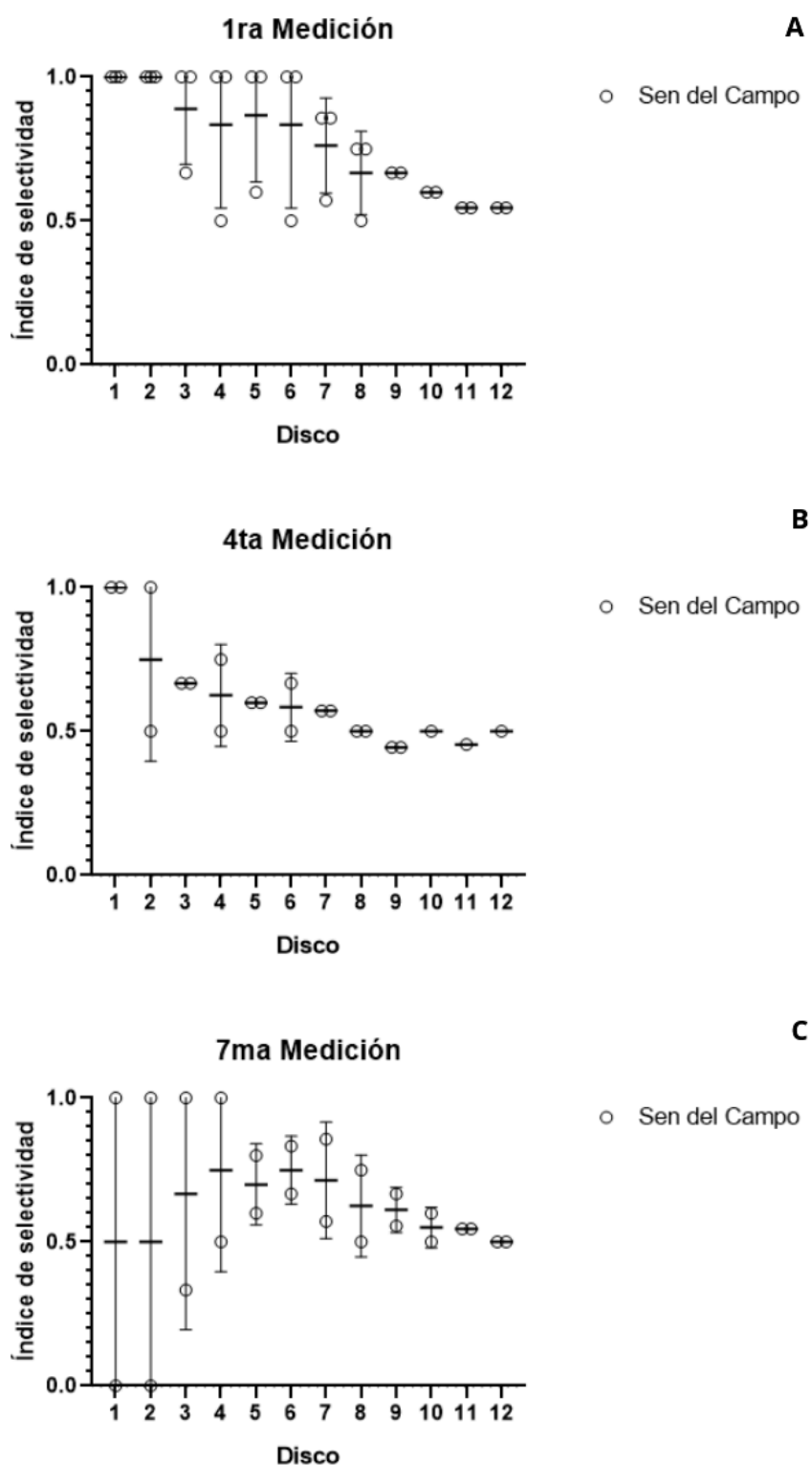


Figura 4.4: Índice de selectividad calculado en base a la ecuación 1 (Capítulo 3) en función de los discos recolectados de Sen del campo y Anacahuíta tomando a Sen del campo como ítem focal: A) Primera medición (Inicial); B) Cuarta medición (final, luego de exposición a Anacahuíta); C) Séptima medición (final, luego de exposición a Sen del campo).

En función de estos resultados podemos decir que la selectividad hacia Sen del campo en el momento inicial se pierde luego de la experiencia con Anacahuíta. De este modo, no resulta tan evidente la reconstrucción de la selectividad de alguna de las especies en estudio a lo largo de esta experiencia. Con lo cual, podemos decir que, en principio, la experiencia con Anacahuíta genera la pérdida de selectividad por Sen del campo y, además, que no exista selectividad por ninguna de las dos especies, al menos durante la ventana temporal analizada.

4.5 Discusión

Las hormigas cortadoras de hojas son insectos altamente generalistas, cuya elección de plantas no solo depende de sus preferencias individuales, sino también del impacto que los sustratos recolectados tienen sobre el hongo que cultivan (Wirth et al., 2003; Hubbell et al., 1983). En este contexto, y en relación con los experimentos realizados en esta tesis, en los cuales se evaluó la preferencia de las hormigas por plantas nativas de la misma región, se puede asumir que muchas de las preferencias observadas son el resultado de extensos procesos evolutivos, así como de la selección de comportamientos de recolección altamente adaptativos y especializados. A partir de esta premisa, y considerando el potencial de los datos generados en esta investigación para el diseño de estrategias de manejo de hormigas en plantaciones forestales, surge la pregunta sobre la robustez o plasticidad de estas preferencias.

El inicio del experimento permitió corroborar que las hormigas *A. ambiguus* presentan preferencia de recolección por Sen del campo sobre Anacahuíta. Esta preferencia se dio en las tres colonias que no habían tenido experiencia previa con ninguna de las dos especies y, por lo tanto, podemos interpretar que se trata de la expresión de una preferencia innata y conservada. El hecho de que sea innata, no significa que sea inamovible y que no pueda cambiar dependiendo de la experiencia o de requerimientos cambiantes de la colonia. Por ello se desafió a las colonias a recoger Anacahuíta como única opción disponible (la especie menos

preferida) para evaluar si el perfil de preferencias podía reajustarse en base a la nueva información una vez que Anacahuíta comenzara a ingresar y circular por el hormiguero.

En la etapa de oferta exclusiva de Anacahuíta se comprobó que las hormigas recogieron el material vegetal ofrecido y el mismo fue incorporado a la cámara del hongo (no mostrado). A simple vista no se detectaron cambios en el hongo que pudiesen estar vinculados a un efecto adverso de Anacahuíta. El régimen de incorporación de material fresco siguió patrones colectivos de recolección y aceptación regulares.

Durante la determinación de preferencias en la etapa de recolección de Anacahuíta y al final de ésta, se notaron cambios en los índices de preferencia entre Sen del campo y Anacahuíta. En términos generales la opción por escoger Anacahuíta pasó a igualar a la de Sen del campo. Esto se vió en la plataforma de preferencia individual (*Figura 4.2 A*), en la arena de preferencia colectiva (*Figura 4.3 A*) y también resultó visible en el índice de selectividad (*Figura 4.4 B*). Estos resultados indican que la preferencia inicial, tanto individual como colectiva, no son inamovibles, sino que pueden ser moduladas a través de la experiencia. Interpretamos que la preferencia de Anacahuíta aumentó porque este tipo de discos no tuvieron un efecto adverso sobre la colonia y, en consecuencia, pasó a ser tan aceptada y preferida como Sen del campo.

Resulta de interés, poder repetir experimentos similares a los descritos, pero con plazos temporales más largos, ya que un posible efecto adverso de Anacahuíta sobre el hongo o las hormigas, podría requerir más tiempo o mayor volumen de incorporación al nido. Cabe indicar que los tiempos utilizados en nuestro diseño experimental estuvieron basados en los tiempos de rechazo observados cuando los recortes de hojas recogidas eran impregnadas con un potente antifúngico que afecta el hongo simbiote (Arenas y Rocés, 2017).

Volviendo a los resultados de esta tesis, es necesario notar que el efecto fue dispar entre colonias. Algunas colonias mostraron una modulación clara mientras que en otras no se encontró el mismo efecto. Estas diferencias llevan a interpretar que cada colonia ajusta las preferencias de recolección a requerimientos y dinámicas propias y que la manipulación experimental llevada a cabo en base al cambio de material vegetal ofrecido es sólo una de las variables que afectan la decisión colectiva de la recolección.

Por limitaciones técnicas, de material y colonias disponibles, y de tiempo, no se pudieron probar otros tratamientos. Hubiese resultado sumamente interesante evaluar qué ocurre con la preferencia después de tiempos más prolongados de recolección exclusiva de Anacahuita o Sen del campo, o qué ocurriría en situaciones extremas y prolongadas de escasez de material fresco, para así estudiar las preferencias de recolección bajo distintos grados de motivación por recolectar.

En la segunda etapa del experimento pasó a ofrecerse exclusivamente Sen del campo. Se comprobó (no mostrado) que las hormigas aceptaron el material y lo incorporaron de modo regular al nido. Al final de esta etapa se midió por última vez la preferencia y se observó que la restitución de la preferencia inicial por Sen del campo no es clara, por lo tanto esto sugiere que no habría preferencias de selectividad por ninguna de estas especies.

En resumen, se obtuvieron mediciones que apoyan la hipótesis de que las hormigas ajustan sus preferencias de recolección en base a la experiencia.

Los resultados encontrados nos permiten destacar la importancia de considerar la plasticidad en las preferencias y perfiles de aceptación al momento de diseñar la utilización de ciertas especies vegetales como cultivo de atracción o repelentes en el contexto de una plantación de interés. Es importante tener en cuenta tanto las preferencias innatas como la posibilidad de que dichas preferencias pueden cambiar adaptándose a la oferta y a las consecuencias que recursos inicialmente preferidos o no preferidos puedan aparejar.

Capítulo 5: Características foliares que afectan la recolección

5.1 Introducción

Las plantas terrestres y los insectos han co-evolucionado por más de 400 millones de años dando como resultado distintos tipos de interacciones y, a través de éstas, se ha incrementado la diversidad de ambos tipos de organismos (Fürstenberg-Hägg et al., 2013). La evidencia de ello se halla en las especies vegetales a través de especializaciones morfológicas y en la capacidad de reconocer de manera específica moléculas ajenas o señales de células propias dañadas, por ejemplo ante masticación, sucto-picación, patógenos, presencia de huevos, etc. (War et al., 2012; Fürstenberg-Hägg et al., 2013). Las plantas generan metabolitos que para su estudio se clasifican en metabolitos primarios y en compuestos bioactivos especializados (en el pasado denominados metabolitos secundarios) -Fürstenberg-Hägg et al., 2013-. Los primeros son comunes a todas las plantas y son necesarios para el crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo mientras que los segundos no se encuentran de manera universal en todos los taxa y no aparentan tener un rol en el metabolismo primario. Sin embargo, pueden estar asociados a otro tipo de funciones como por ejemplo, las defensas y la polinización. Dada la diversidad de estructuras químicas, la clasificación de estos compuestos puede ser compleja. Una clasificación simple distingue: compuestos nitrogenados, terpenoides, compuestos fenólicos y compuestos acetilénicos (Schoonhoven et al., 2005). Estos compuestos pueden cumplir su rol como semioquímicos (modificadores del comportamiento de insectos). Entre los semioquímicos de interés para esta tesis están los aleloquímicos, los cuales son compuestos no nutritivos, producidos por un individuo de una especie y que afecta el crecimiento, comportamiento o biología de un individuo de otra especie. Estos compuestos podrían actuar como claves sensoriales de atracción durante el reconocimiento de la planta (kairomonas) o como repelentes (alomonas) (Schoonhoven et al., 2005).

Para el desarrollo de este capítulo nos centramos en las características foliares que podrían afectar el comportamiento de recolección de las hormigas. En particular analizamos características físicas de las hojas, metabolitos especializados (compuestos volátiles y polifenoles) y elementos nutricionales

(cantidad de materia orgánica, azúcares y proteínas) producidos por las especies vegetales en estudio.

Características físicas

Algunas características físicas de las hojas pueden actuar como barreras para los herbívoros. Estas barreras físicas comprenden, entre otras, la dureza de las hojas (el tejido lignificado), el tipo y densidad de tricomas y la película de ceras cuticulares (Erb y Reymond, 2019).

La dureza de las hojas permite predecir las tasas de herbivoría (Coley, 1983), aumenta con la maduración y, en ciertos casos, puede dificultar la penetración por parte del aparato mandibular de insectos e incrementar su desgaste (Fürstenberg-Hägg et al., 2013), como se ha observado en las mandíbulas de hormigas cortadoras de hojas (Camargo et al., 2016). Los tricomas pueden proporcionar protección ante herbivoría por insectos, incluso en algunas especies vegetales se observó que pueden aumentar en densidad como respuesta defensiva; su modo de acción se basa en generar una barrera que impide el acceso a la superficie vegetal y el traslado sobre ella, de modo que los tricomas disminuyen la tasa de depredadores, parasitoides o herbívoros (Schoonhoven et al., 2005; Southwood, 1986). Existen dos tipos de tricomas: glandulares, los cuales contienen glándulas elaboradoras de productos bioactivos, y no-glandulares, que previenen el contacto de insectos con la superficie, limitan su movimiento o funcionan como trampas. La película de ceras cuticulares puede tornar más resbaladiza la superficie foliar, y su composición fisicoquímica se modifica según la especie, el desarrollo, la estación del año y la temperatura (Schoonhoven et al., 2005).

Compuestos orgánicos volátiles

Se trata de compuestos de bajo peso molecular y alta presión de vapor a temperatura ambiente (Knudsen et al., 2006). A nivel ecológico interactúan con otras especies mediando la comunicación: inter e intra planta (Baldwin et al., 2006 y Arimura et al., 2009), planta-insecto (Blande, 2017 y Moreira et al., 2018a) y planta-polinizador (Schiestl y Johnson, 2013). Pueden ser sumamente específicos,

en interacciones con organismos especialistas, y pueden ser emitidos desde el sector dañado u otros, tanto por encima como por debajo del suelo. La emisión de volátiles puede ser constitutiva o variar como producto del daño mecánico, la herbivoría, succionamiento o postura de huevos (Turlings y Tumlinson, 1992). Además, pueden atraer “enemigos naturales” de los herbívoros (Dicke, 1999) o bien ser repelentes o disuasorios de éstos últimos (Bruinsma y Dicke, 2008). La emisión de estos compuestos es dependiente de la especie, el órgano y el estado de desarrollo de la planta así como de los factores ambientales bióticos y abióticos (Holopainen y Gershenzon, 2010). Sin embargo, a pesar de que existen ciertos volátiles típicos de una especie o género en particular, también los hay comunes a casi todas las plantas, los denominados volátiles de hoja verde. Estos últimos consisten en un esqueleto de 6 carbonos, se emiten de manera inmediata luego del daño (0-5 min), ya sea en el tejido dañado u otros, se corresponden a aproximadamente el 50% de las emisiones y son isómeros de hexanol, hexenal o hexenil acetato (Holopainen, 2004; Fürstenberg-Hägg et al., 2013). Además, si bien pueden ser atractivos para ciertos organismos, a la vez pueden generar efectos negativos (Erb y Reymond, 2019). Del mismo modo, también existen volátiles que pueden ser producidos de manera constitutiva o sintetizados luego del daño al tejido vegetal. Una categorización simple los clasifica en terpenoides, compuestos aromáticos y nitrogenados -Figura 5.1- (Dudareva et al., 2013). Los terpenoides son generalmente sintetizados luego del daño y liberados hasta horas después del mismo (Holopainen, 2004) y sólo se emiten en grandes cantidades en algunos taxones vegetales (Schnitzler et al., 2010). Pueden ser cíclicos o acíclicos y se clasifican según la cantidad de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno, 5 átomos de carbono) que contengan (éste es el terpeno más elemental y más volátil) en mono, sesqui y homoterpenoides. Los monoterpenoides (2 unidades de isopreno, C10) están típicamente asociados a plantas sanas en especial en aceites esenciales de hierbas aromáticas y especias (Ej. linalool, pineno y (Z)- β -ocimeno), pero también presentes en daño por herbivoría. Los sesquiterpenoides (3 unidades de isopreno, C15) están típicamente asociados a flores (también se encuentran en aceites esenciales), daño por ozono y mecánico (Ej. típicos del daño mecánico son: β -cariofileno y α -farneseno). Los homoterpenoides están típicamente asociados a daño mecánico y por ozono, son compuestos acíclicos irregulares que derivan de la degradación de terpenos de 15 y 20 átomos de carbono: 4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) y 4,8,12-trimetil

tridecano-1,3,7,11-tetraeno (TMTT) respectivamente (Fürstenberg-Hägg et al., 2013; Irmisch et al., 2013).

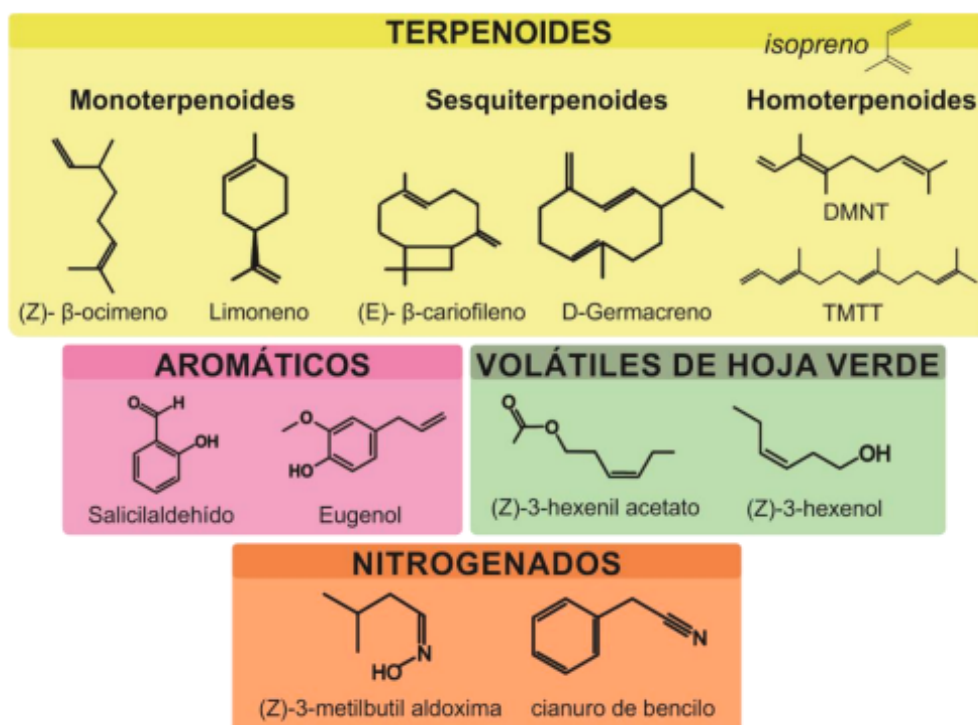


Figura 5.1: Variedad de compuestos orgánicos volátiles. Se clasifican en terpenoides -monoterpenoides (10 C), sesquiterpenoides (15 C) y homoterpenoides-, compuestos aromáticos, volátiles de hoja verde y compuestos nitrogenados (tomado de Dávila, 2023).

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos influyen en la calidad del material vegetal ya que afectan su color, aroma, y sabor (Debib, 2013). En distintos cultivos, los compuestos fenólicos correlacionan negativamente con la herbivoría (Fürstenberg-Hägg et al., 2013). Su rol ante ésta última consiste en que a nivel comportamental genera repelencia y a nivel molecular la inhibición de ciertas enzimas digestivas (Cheeke, 1989). Estos compuestos se presentan sobre la superficie vegetal (Nuessly et al., 2007) y constituyen un grupo típico y diverso de moléculas con un rol preponderante en las defensas constitutivas e inducidas contra insectos (War et al., 2012). En particular, existe un tipo de polifenoles (*Sunscreen*) que cumplen un rol protector de la radiación UV-B (280-315 nm) en las células del mesófilo de la epidermis vegetal, lo que genera la acumulación y aumento de compuestos

fenólicos, como por ej flavonoides en las hojas (Izaguirre et al., 2007). Las plantas expuestas a este tipo de luz UV-B presentan cambios fisiológicos que, como consecuencia, disminuyen su calidad para especies herbívoras y, consecuentemente, son menos consumidas por ellas (Ballaré et al., 2001; Caldwell et al., 2003; Roberts y Paul, 2006; Izaguirre et al., 2007). Este efecto es generado por rutas metabólicas similares a las inducidas por herbivoría (Izaguirre et al., 2007).

En términos generales los compuestos fenólicos presentan una estructura elemental común que consta de un anillo aromático con distinta cantidad de grupos hidroxilo. Y, si bien comparten el fenol como estructura básica, la mayoría presenta más de uno por lo que se les denomina polifenoles. Metabólicamente, pertenecen al grupo de los fenilpropanoides, del cual derivan diversos compuestos como fenoles y flavonoides (Philippe y Bohlmann, 2007). Estos compuestos son tan variados que pueden ser solubles en soluciones orgánicas, acuosas o también resultar polímeros insolubles (Engelberth, 2006).

La lignina es un polímero orgánico complejo y uno de los principales componentes de las paredes celulares en las plantas vasculares. Su principal función es proporcionar rigidez, resistencia y soporte estructural a los tejidos vegetales. Además, juega un papel crucial en la impermeabilización celular y en la protección contra el ataque de patógenos. Este polímero se considera un compuesto fenólico, ya que está compuesto por unidades monoméricas derivadas de alcoholes fenilpropanoides, como el alcohol coniferílico, el alcohol sinapílico y el alcohol p-cumárico. Estas unidades se ensamblan en una estructura tridimensional altamente ramificada mediante enlaces éter y carbono-carbono. Esta configuración le otorga características únicas, como alta rigidez y resistencia al agua. Asimismo, la lignina dificulta la descomposición de la materia vegetal, lo que hace que los tejidos lignificados sean particularmente resistentes a la degradación biológica (Singh et al., 2022).

Nutrientes

Los insectos herbívoros toman nutrientes del material vegetal ingerido separándolos de algunos compuestos que no pueden digerir, tales como celulosa, lignina y algunos aleloquímicos (Schoonhoven et al., 2005). Algunos metabolitos primarios vegetales como proteínas, carbohidratos y lípidos son nutrientes

esenciales para organismos herbívoros. Estos metabolitos pueden variar cuali y cuantitativamente en las especies vegetales y, consecuentemente, los insectos herbívoros desarrollan preferencias diferenciales por ellos (Berenbaum, 1995). Tal es así que algunos organismos presentan neuronas especializadas en la detección de metabolitos primarios específicos y en rangos particulares, de manera tal que provocan la estimulación de la alimentación. Por ejemplo, el caso de orugas que detectan ciertos tipos de azúcares (Schoonhoven et al., 2002). Por otro lado, la presencia de microorganismos simbios (micorrizas y bacterias nodulares de la raíz) en plantas pueden modificar el valor nutricional de metabolitos primarios, por ejemplo al aportar aminoácidos. Mientras que microorganismos simbios intestinales en insectos pueden aportar detoxificación o incluso ciertos metabolitos primarios específicos (Schoonhoven et al., 2005).

5.2 Objetivos e hipótesis

5.2.1 Objetivo general

- Identificar características foliares diferenciales entre Anacahuita y Sen del campo que expliquen la preferencia diferencial de las hormigas cortadoras observada en los capítulos anteriores.

5.2.2 Objetivos específicos

- Estudiar y comparar la dureza de las hojas de Sen del campo y Anacahuita.
- Recolectar e identificar volátiles de las especies Sen del campo y Anacahuita.
- Extraer e identificar polifenoles totales y fenoles *Sunscreen* en Anacahuita y Sen del campo.
- Establecer una caracterización general de variables nutricionales

5.2.3 Hipótesis

Existen diferencias fisicoquímicas que explican la preferencia de las hormigas cortadoras por las hojas de Sen del campo.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Dureza de las hojas

Con el objetivo de determinar la dureza de las hojas de las especies de plantas nativas estudiadas se analizó la fuerza necesaria para atravesar la hoja y el contenido de lignina.

5.3.1.1 Mediciones físicas

Se utilizó un penetrómetro (gentileza del Dr. Alejandro Sosa y la Dra. Nadia Jiménez) *Medio-Line 41002* (Pesola, Suiza) cuyo diámetro de punta es de 1,9 mm y su área circular de 2,83 mm². De cada una de las especies vegetales analizadas, se tomaron al azar 10 hojas de madurez intermedia y se las colocó en una placa de aluminio con una trama de 14 x 7 agujeros (cortesía de la Dra. Nadia Jiménez), se ubicó una fuente de luz debajo de la misma. Se apoyó cada hoja sobre dicha placa y luego se ubicó el penetrómetro perpendicular a la hoja hasta que la punta del mismo traspasó la hoja. Las mediciones fueron realizadas sobre 10 puntos ubicados en el perímetro de la hoja de manera tal de contar con muestras a lo largo de la longitud de la hoja (*Figura 5.2*).

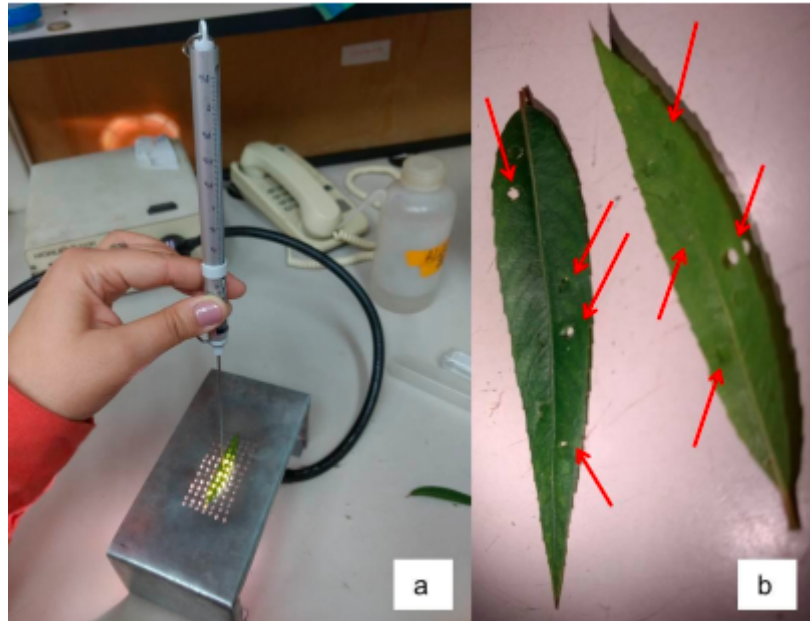


Figura 5.2: a) Penetrómetro Medio-Line 41002 (Pesola, Suiza). b) Hoja de sauce (Salix spp.) luego de mediciones con el penetrómetro. Se señalan con flechas los orificios (tomado de Jiménez, 2019).

El hecho de haber realizado las mediciones sobre las hojas de esta manera permitió abarcar datos que contemplen los sectores donde observamos que las hormigas realizan los primeros cortes de una hoja, así como la presencia de nervaduras y la posibilidad de que existan distintas durezas a lo largo de la hoja en estos sectores. Para cada una de las mediciones se registró el valor señalado por el penetrómetro (X : valor de lectura del penetrómetro) y se dividió por el área circular del mismo. Con los 10 datos correspondientes a cada una de las hojas de una misma especie, se obtuvo la media por especie. A su vez, este valor fue utilizado en la Ecuación 5.1 para obtener el valor de la fuerza necesaria para atravesar una hoja, es decir, un indicador de la dureza.

$$Fuerza \left(\frac{g}{mm^2} \right) = \frac{X_{Penetrómetro}}{\text{Área circular del penetrómetro}} \quad Ec. 5.1$$

5.3.2 Metabolitos especializados y nutrientes

Para las siguientes mediciones se recolectó material vegetal fresco de las especies a analizar que, luego, se liofilizó (Liofilizador BK-FD10P Cámara Std con Manifold, colector de 8 puertos) a -56°C por 48 a 72hs y por último se desecó. Las muestras fueron molidas en un molinillo de café y guardadas en tubos Falcon en oscuridad hasta ser utilizadas.

5.3.2.1 Compuestos volátiles: Recolección y análisis de compuestos orgánicos volátiles

Con el objetivo de obtener el perfil de emisión de compuestos orgánicos volátiles emitidos por plantas de Anacahuíta y Sen del campo, se colectaron los compuestos de la sección aérea de especímenes crecidos en macetas y mantenidas en vivero, tal como se explica en Capítulo 2. Previo a la recolección de volátiles, las plantas tuvieron un período de aclimatación por 48hs en la cámara donde luego se colectaron los volátiles en condiciones de temperatura, fotoperíodo y luz controladas ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, L16: O8, intensidad lumínica $350\ \mu\text{mol}/\text{ms}$).

Para la recolección de volátiles, la parte aérea de las especies vegetales de interés fueron ubicadas dentro de bolsas plásticas de tereftalato de polietileno transparente (PET; bolsas para horno Toppits, Minden, Alemania) que encerraron aproximadamente 1m de longitud del espécimen en un circuito de corriente de aire que atravesó el *headspace* de la planta, es decir, el espacio alrededor de la planta. Al salir del circuito enteramente hecho con tubería de *teflón* el aire pasó por una trampa de volátiles que colectó la muestra ya que contiene un polímero que adsorbe compuestos orgánicos volátiles. Se utilizó una bomba de empuje (bomba de acuario modelo AT-703, Atman, China), que inició la corriente de aire (Figura 5.3). La bomba se conectó por medio de tubos a un filtro de carbón activado, cuya función es purificar el aire de moléculas orgánicas. El filtro consistió en un tubo de metal (19.5 m de longitud, 4.5 cm de diámetro interno) con carbón activado granulado (120gr). Luego, el aire pasó por un medidor de flujo, caudalímetro (modelo 112-02-A, Aalborg Instruments, Orangeburg, Nueva York, Estados Unidos). De este modo, el aire de flujo filtrado y controlado ingresó a la bolsa plástica. Luego, el aire salía de dicha bolsa y, al hacerlo, atravesó la trampa

de recolección de volátiles. Esta trampa consistió en un tubo de vidrio Pyrex (7.5cm longitud, 4mm diámetro interno) que contenía 30mg de adsorbente HayeSep Q (adsorbente sólido de polidivinilbenceno poroso de Grace, 60-40mesh tamaño de partícula, afinidad alta por compuestos lipofílicos a polaridad media, Deerfield, Illinois-Estados Unidos). El adsorbente se retiene con un tapón de lana de vidrio de borosilicato y un tapón de compresión de teflón. El adsorbente retiene y concentra compuestos orgánicos volátiles provenientes del espacio de cabeza de la planta a medida que la corriente de aire generada por las bombas lo atraviesa. Por último, una bomba de succión (modelo Standard, Tuff, Bedford, Reino Unido) genera una presión negativa obligando a que el aire dentro de la bolsa plástica PET atravesase la trampa de recolección.

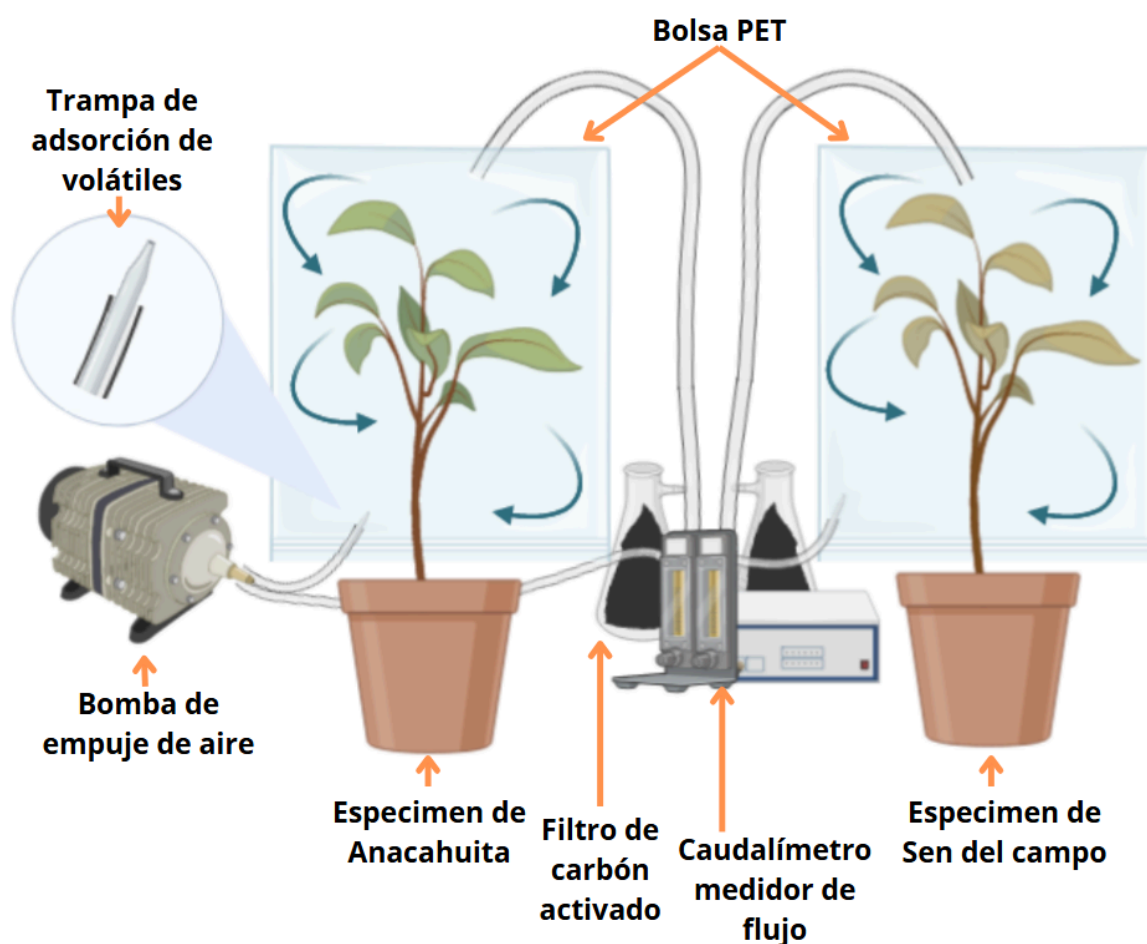


Figura 5.3: Esquema del dispositivo de recolección de volátiles: Una bomba de empuje de aire se conectó a un filtro de carbón activado. Luego el flujo de aire pasa por un caudalímetro medidor de flujo antes de ingresar a la bolsa PET que envuelve la parte superior de un espécimen joven de Anacahuita o de Sen del

campo (ambos de aproximadamente 2 años de edad). El aire que circula dentro de la bolsa, denominado espacio de cabeza, contiene los compuestos orgánicos volátiles emitidos por la planta. Una bomba de succión genera presión negativa y hace pasar el aire con los compuestos volátiles por una trampa donde quedan retenidos.

Se recolectaron los volátiles de 4 especímenes sanos de Anacahuíta y 8 de Sen del campo y, bolsas plásticas PET sin plantas a modo de blanco. Para ello cada espécimen de Anacahuíta se midió en una bolsa plástica mientras que 2 especímenes de Sen del campo se midieron en otra bolsa plástica. Se utilizaron 2 especímenes de Sen del campo por cada uno de Anacahuíta para compensar diferencias de tamaño y/o follaje (en plantas de la misma edad, Anacahuíta es el doble de tamaño que Sen del campo). La recolección de volátiles duró 6 hs (de 10:00 a 16:00hs); las trampas de recolección se envolvieron en papel de aluminio y se almacenaron en el *freezer* (-20°C) hasta su elución. Posteriormente los compuestos volátiles capturados en las trampas adsorbentes fueron eluidos con 150 µl de diclorometano (grado Plaguicida - Sintorgan) que contenía 5 ng/µl de dodecano (Sigma-Aldrich) como estándar interno. Luego, las muestras fueron analizadas mediante un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (Gas chromatography- mass spectrometry, GC-MS por sus siglas en inglés, equipo Agilent 7890-A acoplado a detector de masas selectivo Agilent 5977). Se utilizó una columna capilar DB5-MS (0.25mm de diámetro interno x 0.25µm de espesor de película). Las muestras (1µl) se inyectaron a 240°C en modo splitless. Se usó helio como gas portador (carrier) con un flujo de 0.7 ml por minuto (presión de entrada: 20.48 kPa). La temperatura de la columna se mantuvo a 35°C durante 1 minuto y luego se aumentó a una velocidad de 10°C por minuto hasta alcanzar los 230°C. Finalmente, la temperatura se mantuvo a 230°C durante 15 min.

El análisis de los datos obtenidos fue realizado con el software "MassHunter Workstation" (versión B.06.00, Agilent). Luego de restar los valores obtenidos en las muestras blanco, los compuestos fueron identificados al comparar sus espectros de masa con los provistos por NIST Chemistry WebBook (William E. Wallace, director, "Mass Spectra") y por el libro "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry" (Adams, 2007) y, se compararon los resultados con la base de datos de NIST (National Institute of Standard and Technology, USA). Por último, se corroboró la identificación

realizada previamente a partir del cálculo del índice de Kovats y se comparó el valor calculado con los tabulados para una columna DB5-MS publicados por NIST (William E. Wallace, director, "Retention Indices") y/o por Adams (2007). El índice de Kovats (IK) de un componente en una muestra (*Ecuación 5.1*) es un indicador de la relación entre el tiempo de retención de un componente de la muestra con el tiempo de retención de dos alcanos sucesivos de una serie estándar de alcanos que eluyen inmediatamente antes y después que el componente de interés (Ettre, 1993).

$$IK(X) = 100 \left[n + (N - n) \frac{(t_{\text{retención}(X)} - t_{\text{retención}(n)})}{(t_{\text{retención}(N)} - t_{\text{retención}(n)})} \right] \quad (Ec. 5.2)$$

Donde “n” representa el número de átomos de carbono del alcano de menor tamaño, “N” el número de átomos de carbono del alcano de mayor tamaño y “x” el componente incógnita de una muestra. Los índices de Kovats de los compuestos analizados fueron calculados a través de “The Pherobase” (El-Sayed AM 2022. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <https://www.pherobase.com>).

Para calcular la concentración de cada compuesto se consideró que cada pico se corresponde a un compuesto en el cromatograma de iones totales (TIC). Luego, el área de cada uno de los picos fue relativizada al área obtenida para el estándar interno. De esta manera, cada área relativa se corresponde al equivalente en masa del estándar interno (en ng/μl). Cabe destacar que los resultados de picos con una relación señal-ruido menor a 1 fueron considerados trazas y se les asignó el valor cero al realizar el análisis estadístico. Sólo se muestran los compuestos identificados que se encontraron en al menos 3 de las 4 réplicas.

5.3.2.2 Compuestos fenólicos

Extracción de polifenoles totales

Se tomó el material vegetal procesado (40-80 mg) y se realizó una solución de metanol 50% a 80°C en baño térmico durante una hora, posteriormente se filtró el extracto (Whatman N°1). A una alícuota de 0.5 ml se le agregó una solución

colorimétrica que consistió en: 10 ml de agua destilada, 1.25 ml del reactivo Folin-Ciocalteu (Cadish y Giller, 1997) y 5 ml de carbonato de sodio al 17% en ese orden, enrasado con agua destilada en 25 ml. Luego, se leyó la absorbancia a $\lambda=760\text{nm}$ con un espectrofotómetro Spectronic Genesys 2 (Spectronic Instruments ®). Para la cuantificación se realizó una curva de calibración, y se utilizó como estándar ácido gálico, 0.1 mg/ml según el protocolo descrito en Vivanco y Austin (2008).

Polifenoles *Sunscreen*

Para la detección de compuestos fenólicos que absorben a 305 nm se realizó una extracción de fenoles con el método metanol-clorhídrico. Para ello se utilizó una solución de extracción metanol: ácido clorhídrico 99 : 1 a 0,01 gr del material vegetal molido por un mínimo de 48hs a -20°C , con posterior incubación por 1 minuto a 70°C (Mazza et al, 2000). Luego, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-1700 Pharma Spec UV-VIS (Shimadzu Corporation). en todo el rango de 280-400nm, de manera de incluir $\lambda=305\text{ nm}$.

Lignina

Se recolectó material vegetal fresco de las especies a analizar que, luego, se liofilizó (Liofilizador BK-FD10P Cámara Std con Manifold, colector de 8 puertos) a -56°C por 48 a 72hs y por último se desecó. Las muestras fueron molidas en un molinillo de café y guardadas en tubos Falcon en oscuridad hasta ser utilizadas en la medición correspondiente.

La presencia de lignina, es decir, hemicelulosa y celulosa, en las muestras fue medida a partir de extracciones secuenciales sobre la base de análisis de fibra (Van Soest, 1963). Para ello se utilizó un analizador de fibra Ankom 220 (Ankom Technology), el cual incluye digestión con detergente ácido, una posterior digestión con ácido sulfúrico y, por último, la determinación de cenizas. Se analizaron 4 muestras de Anacahuita y 4 de Sen del campo.

Dado que la lignina puede estar asociada a la dureza de las hojas, los resultados de estas mediciones se muestran en la sección 5.4.1 (Dureza de las hojas)

5.3.2.3 Nutrientes

Azúcares totales

Se siguió el protocolo de Dubois et al., (1956) para el cual se pesaron 0,035 gr de material vegetal. Luego, se realizaron mediciones de acuerdo al método fenol-sulfúrico: se agregaron 7 ml de HCL 2,5 N y se incubó a 100°C durante 3hs. Posteriormente, se neutralizó la solución con carbonato de sodio (NaCO_3) y se llevó a volumen de 100 ml. Se tomó 1 ml del extracto anterior y se le agregó 1 ml de fenol 5% y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado 96%. Luego de 10 min, se llevó a baño térmico a 25-30 °C durante 20 min. Posteriormente se leyó la absorbancia a $\lambda=490$ nm. Los valores obtenidos fueron comparados con una curva de calibración realizada con glucosa estándar 100 mg/l de agua destilada. Se utilizaron 7 muestras de Anacahuita y 7 muestras de Sen del campo, cada una de un espécimen distinto.

Cantidad de Materia Orgánica

Con el objetivo de inferir la cantidad de materia orgánica se pesó la masa de muestra antes y después de ser llevadas a horno. De este modo, al peso inicial se le sustrajo el peso del contenido de cenizas como medida de la pérdida de materia orgánica (Harmon et al. 1999). Se pesó un crisol por muestra y la muestra a analizar (0,20-0,28 gr). Se llevó a horno de mufla a 400°C por 4 hs. Luego, se volvió a pesar cada muestra, es decir, la materia inorgánica. A través de estos datos pudo inferirse la cantidad de materia orgánica. Como estándar de materia orgánica se utilizaron cantidades conocidas de festuca (*Lolium arundinaceum*). Se utilizaron 7 muestras de Anacahuita y 7 muestras de Sen del campo.

Proteínas totales

Se adaptó un protocolo de medición de proteína soluble por Bradford. Para ello se agregó un buffer de extracción Cys Pls (NaPO_4 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7.2) en una relación 1 : 3 (10 mg muestra con 300 ul de buffer). Se homogeneizó con vortex y se centrifugó durante 15 min a 4°C y 12000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Luego, se cuantificó en un lector de microplacas (Varioskan Lux Multimode Microplate Reader de ThermoFisher) con 10 ul en 200 ul de patrón de Bradford (BioRad),

previamente preparado con agua destilada en una relación 1 : 4. Se agitó el lector durante 1 min y la absorbancia fue leída a 595 nm. La curva de calibración fue realizada por duplicado, con 6 puntos entre 0 y 1 ug/ml de BSA en agua destilada. Se utilizaron 8 muestras de Anacahuita y 6 muestras de Sen del campo; todas fueron medidas por duplicado.

5.4 Resultados

5.4.1 Dureza de las hojas

Mediciones físicas

La fuerza necesaria para penetrar la hoja fue significativamente mayor en Anacahuita que en Sen del campo (Prueba de t, $p=0,0036$), lo cual indica una mayor dureza de las hojas de Anacahuita (*Figura 5.4*).

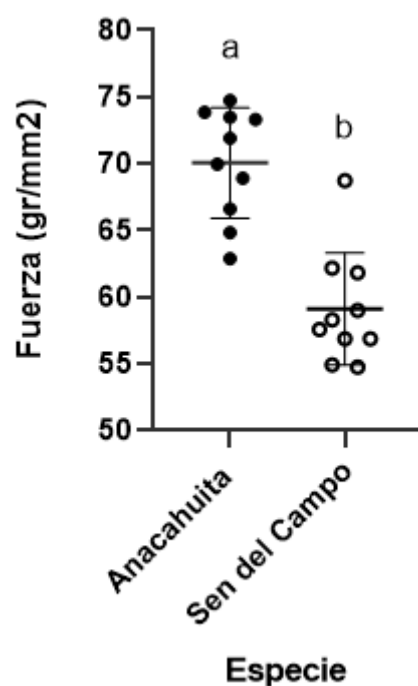


Figura 5.4: Fuerza, medida como gr/mm2 para las especies Anacahuita y Sen del campo. Cada punto representa el promedio de 10 mediciones del penetrómetro sobre el perímetro de una hoja. En cada medición se cuantificó la fuerza necesaria para atravesar la hoja. Las letras a y b significan que existen diferencias

significativas entre las especies analizadas (Prueba de t, $p=0,0036$, $N=10$ hojas, $n=10$ mediciones por hoja).

Contenido de lignina

Por otro lado, contrariamente a lo esperado, el porcentaje de lignina fue mayor en Sen del campo que en Anacahuita (Prueba de t, $p=0,0006$) -figura 5.5-.

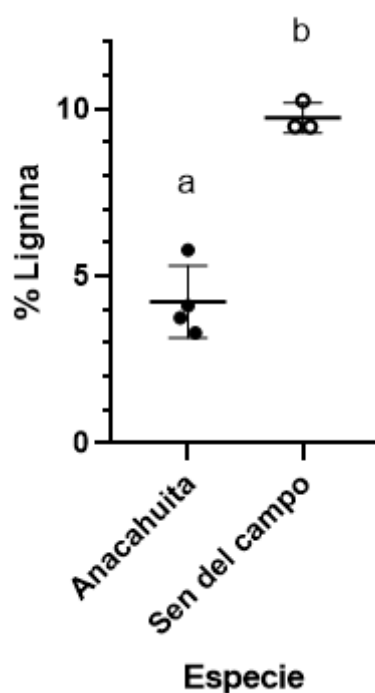


Figura 5.5: Porcentaje del contenido de lignina en Anacahuita y Sen del campo. Las letras representan diferencias significativas entre las especies estudiadas (Prueba de t, $p=0,0006$).

5.4.2 Claves volátiles: Análisis de compuestos

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos obtenidos para un ejemplar de Anacahuita (A) y dos ejemplares en conjunto de Sen del Campo (B) -Figura 5.6-. En ellos puede verse claramente que ambas especies presentan diferencias cuali-cuantitativas en la emisión de compuestos volátiles.

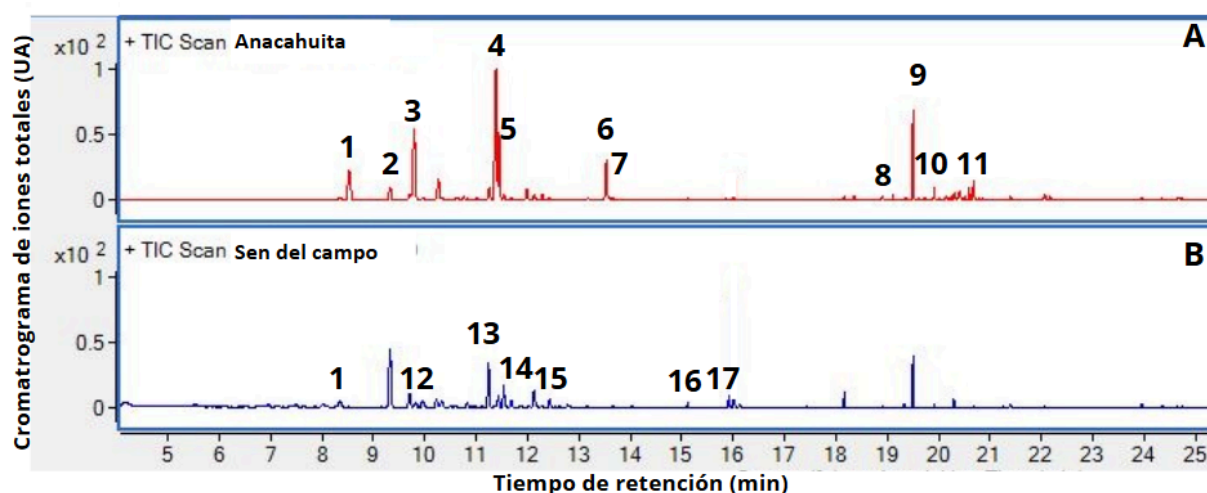


Figura 5.6: Perfil cromatográfico de los compuestos volátiles encontrados en muestras representativas de Anacahuitta (A) y Sen del campo (B). El eje y representa el cromatograma de iones totales en unidades arbitrarias (UA) en función del tiempo de retención de cada compuesto, medido en minutos. Los números sobre los picos indican los compuestos identificados y listados en la *Tabla 5.1*.

Tabla 5.1: Compuestos orgánicos volátiles identificados en las muestras de Anacahuitta y Sen del campo. Se detalla para cada especie el número del compuesto, el nombre con el que fue identificado, el tiempo de retención (TR) y la concentración obtenida (ng/ul) relativa al estándar interno. Los compuestos no detectables en una especie se simbolizan con (-) y aquellos compuestos en los que sólo se detectaron trazas (TZ).

Nº Compuesto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Nombre del compuesto	α -Pino	Camfeno	β -Pino	D-Limoneno	Eucaliptol	δ -2-Careno	Nonanal	α -Gurjuneno	Sesquiterpeno desconocido	δ -Cadineno	α -Amorfen	(E) 3-Hexen-1-ol, acetato	Limoneno	(Z) 3,7-Dimetil 1,3,6-octatrieno	(E) 3,7-Dimetil 1,3,6-octatrieno	Ácido butanóico hexenil éster	Metil salicilato
Tiempo de retención (TR)	8,5	8,9	9,8	11,4	11,5	13,2	13,7	19,4	19,6	20,5	20,6	8,5	10,7	11,4	11,9	15,8	15,9
Especie																	
Anacahuita	1,3	0,6	10,4	40,5	6,03	0,5	0,4	0,7	18,8	2,5	2,5	-	-	-	-	-	-
Sen del campo	TZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,06	TZ	0,003	0,2	0,1	0,08

Se identificaron 11 compuestos orgánicos volátiles para Anacahuita y 7 para Sen del campo. Sólo un compuesto volátil resultó común a ambas especies, α -Pineno, aunque en el caso de Sen del campo fueron sólo trazas. Se grafica la concentración calculada para los compuestos identificados (*Figura 5.7*) y sus proporciones (*Figura 5.8*). Resulta importante destacar las diferencias en los órdenes de magnitud de los diferentes compuestos encontrados en cada especie, tal es así que de no graficarse por separado los compuestos de Sen del campo son imperceptibles en su concentración en comparación con los de Anacahuita. De hecho los volátiles totales promedio de Anacahuita son de 84,23 ng/ μ l mientras que los de Sen del campo son de 0,44 ng/ μ l, en ambos casos, respecto al estándar interno.

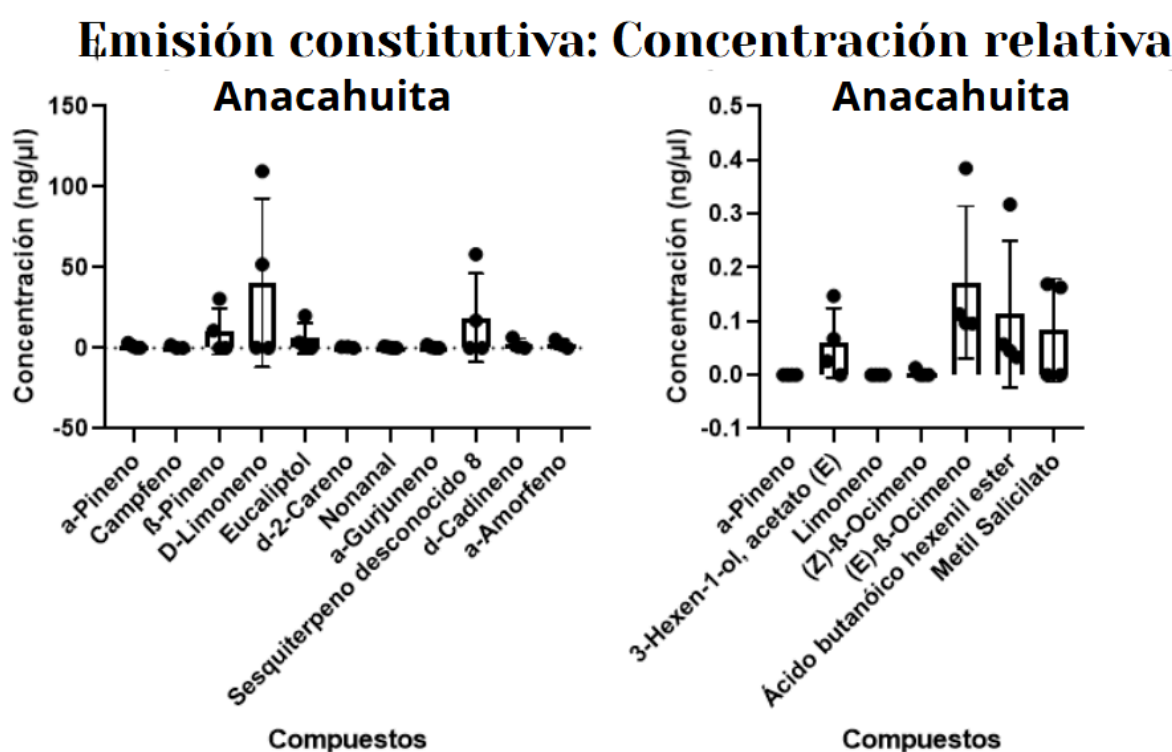


Figura 5.7: Emisión constitutiva de volátiles de Anacahuita (izquierda) y Sen del campo (derecha). Se muestran las medias \pm errores estándar. Repeticiones biológicas N=4 (donde cada repetición contiene una planta de Anacahuita y dos de Sen del campo).

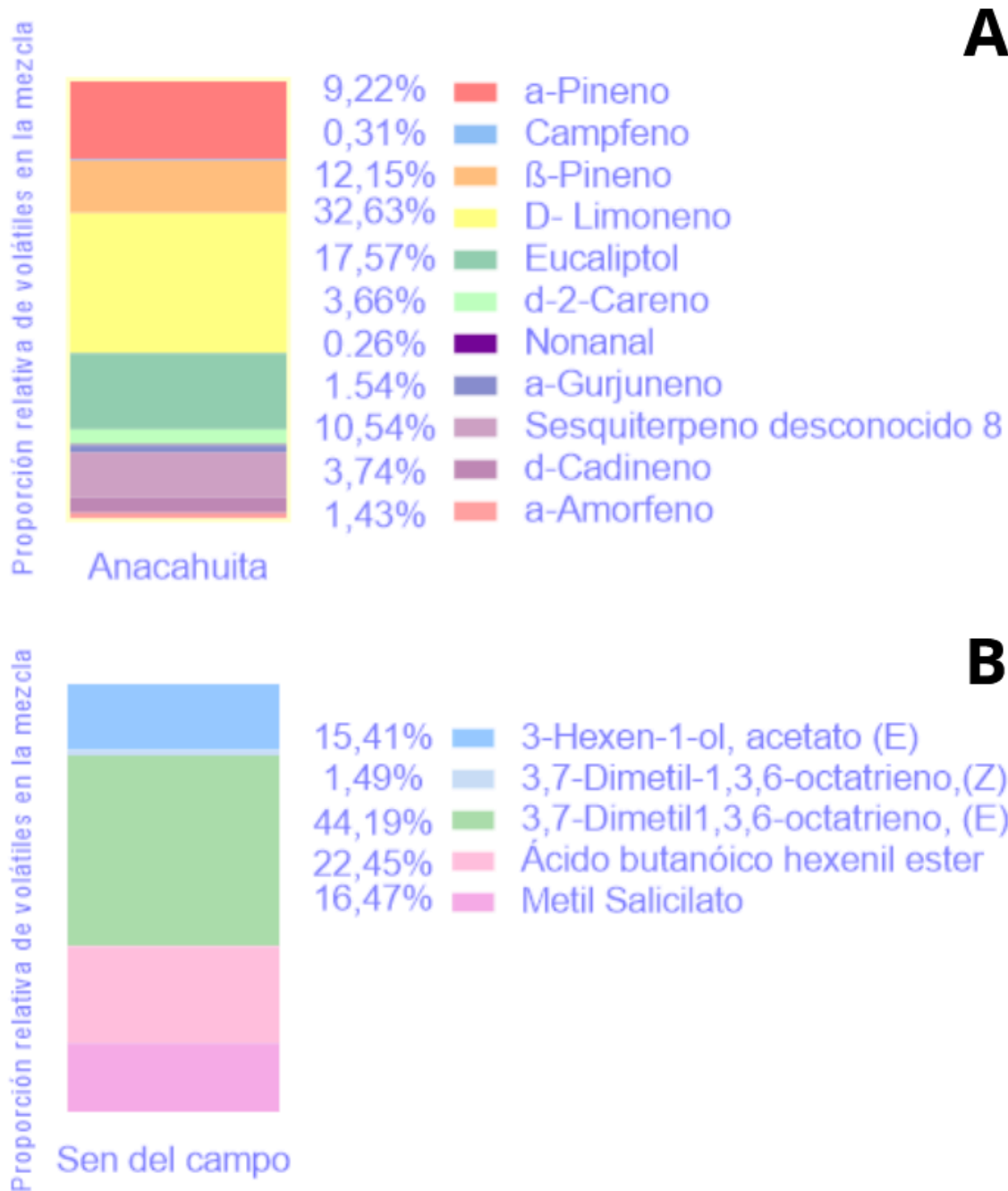


Figura 5.8: Emisión constitutiva de compuestos orgánicos volátiles de Anacahuita (A) y Sen del campo (B): Proporción relativa de los grupos de volátiles presentados con respecto a la mezcla completa de olores. Repeticiones biológicas N=4 (donde cada repetición contiene una planta de Anacahuita y dos de Sen del campo). Sólo se muestran los compuestos identificados que se encontraron en al menos 3 de las 4 réplicas.

No sólo la concentración relativa de volátiles de ambas especies es muy diferente sino también su composición química. En el caso de Anacahuita, el *blend* de volátiles está dominado por aprox un 75% de monoterpenos, en particular Limoneno y Eucaliptol, y un 17% de sesquiterpenos, dominado por un compuesto que no pudimos identificar y presentó similitudes con α -Cubebeno (*Figura 5.8*). En el caso de Sen del campo, el *blend* está formado por aproximadamente un 45% de monoterpenos (principalmente ocimeno) y un 38% de volátiles de hoja verde, en particular ésteres derivados de cadenas de 6 carbonos (*Figura 5.8*). Además, está constituido por aproximadamente un 17% de Metil salicilato, un éster metílico derivado de ácido salicílico.

5.4.3 Metabolitos especializados

Al evaluar polifenoles totales se encontró una cantidad significativamente mayor en Anacahuita que en Sen del campo (Prueba de t: $p < 0,0001$) (*Figura 5.9 A*). Además al analizar los polifenoles *Sunscreen* (305 λ) se observaron diferencias significativas entre especies (Prueba de t, $p = 0,0005$), lo cual indica distinta naturaleza de este tipo de polifenoles, lo cual podría incidir en la aceptación del material vegetal por la colonia. Y, por último en este sentido, los perfiles marcadamente distintos para las especies en estudio a lo largo de las longitudes de onda así como distintos máximos de absorción (240 λ para Anacahuita y 215 λ para Sen del campo) refuerzan la distinta naturaleza de estos polifenoles (*Figura 5.9 C*).

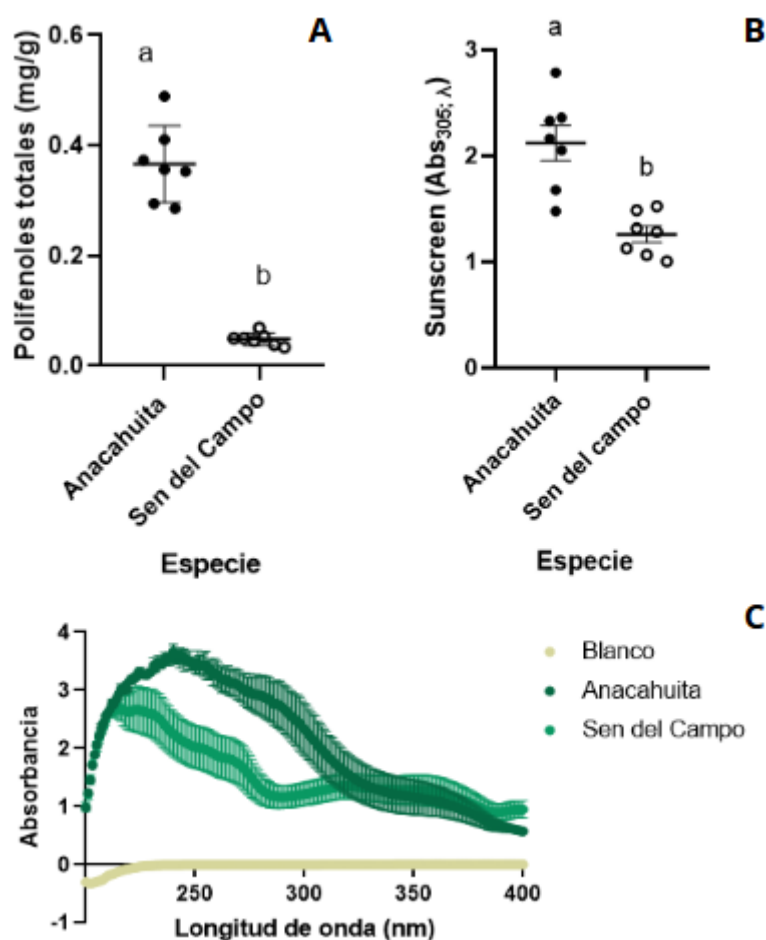


Figura 5.9: A) Polifenoles totales (Prueba de t, $p < 0,0001$). B) Polifenoles *Sunscreen*: Absorbancia a 305λ (Prueba de t, $p = 0,0005$). C) Perfil de absorbancia de Polifenoles *Sunscreen* en Anacahuita, Sen del campo y blancos.

5.4.4 Nutrientes

Al analizar los azúcares totales (*Tabla 5.2*) no se han encontrado diferencias significativas entre las especies estudiadas (Prueba de t, $p = 0,3074$). Se observó una tendencia, aunque no significativa, a mayor cantidad de proteínas totales en Sen del campo (Prueba de t, $p = 0,0749$). Mientras que la proporción de cantidad de materia orgánica evidenció un contenido significativamente mayor para Anacahuita (Prueba de t, $p = 0,0015$). Al analizar la relación entre proteínas totales y azúcares totales encontramos que los valores de Sen del campo superan ampliamente los de Anacahuita. Por lo tanto, la relación entre proteínas totales y

azúcares totales podría ser un indicador del valor nutricional de estas especies relevante para las hormigas recolectoras.

Tabla 5.2: Comparación de las variables nutricionales evaluadas en Anacahuita y Sen del campo. Se detallan sus medias, error estándar y el p-valor asociado a su significancia.

Características analizadas	Anacahuita	Sen del campo	p valor
Azúcares totales (mg/gr)	539, 3 ± 26,2	514 ± 31,7	0,3074
Cantidad de materia orgánica (% proporción)	0,92 ± 0,004	0,9 ± 0,005	0,0015
Proteínas totales (mg/ml)	0,18 ± 0,038	0,48 ± 0,033	0,038
Relación entre proteínas totales/azúcares totales (g/ml)	3,33×10 ⁻⁴	9,33×10 ⁻⁴	-

5.5 Discusión

El análisis de las características fisicoquímicas foliares mostró variables que podrían ser percibidas por las hormigas y permitir diferenciar las dos especies vegetales estudiadas. La especie vegetal preferida, Sen del campo, posee menos dureza en las hojas aunque mayor contenido de lignina. Posee distintos tipos de polifenoles y una cantidad aproximadamente 4 veces menor que Anacahuita. Además de una tendencia a mayor concentración de proteínas que Anacahuita, aunque su concentración total de azúcares y cantidad de materia orgánica es similar en cuanto a su valor, a pesar de la cantidad de materia orgánica presente diferencias significativas (*Tabla 5.2*). En el caso de Anacahuita, sus hojas son 10 unidades más duras y poseen mayor contenido de polifenoles y menor de proteínas, lo cual, en suma, podría estar relacionado a su menor preferencia por las hormigas.

Las hormigas cortadoras son insectos generalistas con un comportamiento fuertemente olfativo. La gran disimilitud en el perfil de volátiles de las dos especies vegetales estudiadas sugiere que ambas pueden ser muy fácilmente diferenciadas, al menos a distancia, por las hormigas. Esta observación refuerza los resultados encontrados a nivel comportamental en el olfatómetro de ambiente estacionario (*Figura 3.21 D*).

En el caso de Sen del campo, su perfil de volátiles es muy poco concentrado, está dominado por Ocimeno y ésteres volátiles de hoja verde, con presencia importante de Metil salicilato. En el caso de Anacahuita, su perfil de volátiles es 3 órdenes de magnitud más concentrado, cualitativamente diferente al de Sen del campo, y fuertemente dominado (aproximadamente 75%) por monoterpenos como Limoneno y Eucaliptol. La presencia de Eucaliptol podría estar relacionada a su familia, Myrtaceae, al igual que las plantas del género *Eucalyptus*. Si bien los volátiles de las especies estudiadas no han sido reportados previamente en la literatura vinculados a estas especies nativas y las colonias de hormigas, todos los compuestos aquí identificados son volátiles ampliamente distribuidos en las plantas. Resulta interesante que los volátiles encontrados, de manera individual o como mezcla, podrían ser responsables del comportamiento de preferencia descrito, especialmente considerando que casi la totalidad de los volátiles identificados son disímiles entre las dos especies. En términos ecológicos es posible enmarcar la baja concentración de volátiles de Sen del campo como una estrategia donde la especie resulta menos saliente para ciertos herbívoros. Sin embargo, ello no resultó suficiente como para no ser detectada por las hormigas a las cortas distancias evaluadas.

La celulosa, la hemicelulosa y, en algunos casos, la lignina constituyen gran parte de la pared celular y, la rigidez de la pared celular varía con la cantidad de estos componentes (Burgert 2006). Normalmente, a mayor deposición de estas macromoléculas, una planta es más resistente al daño mecánico (Coley, 1983). En esta tesis se determinó que Sen del campo tiene mayor cantidad de lignina, y que a pesar de ello, sus hojas resultaron ser de menor dureza que las de Anacahuita (Figura 5.4). Esto indica que la pared celular de Sen del campo podría tener menor cantidad de las otras macromoléculas que contribuyen a la dureza de las hojas. A su vez, los resultados de la dureza de las hojas en términos de la fuerza necesaria para atravesarlas (Figura 5.4) fueron consistentes con la jerarquía de consumo (Figura 3.13), donde Sen del campo resultó significativamente más consumida que Anacahuita. Además, estos resultados son también consistentes con observaciones de campo que indican que las hormigas prefieren hojas “jóvenes” que son más blandas, a hojas “maduras” que son más duras.

Si bien la dureza juega un rol relevante para las hormigas, se sabe también que parte de su preferencia está basada en la relación entre proteína y carbohidratos, posiblemente en base a la detección de azúcares y aminoácidos que son detectados por sensillas gustativas (Smith et al., 2023). Algunos autores plantean que los metabolitos especializados tales como alcaloides, fenólicos, flavonoides y taninos, y el contenido proteico son los elementos que más estrechamente se vinculan con la palatabilidad y aceptación de un recurso. Se propone que el balance entre los compuestos atrayentes y repelentes influye en el comportamiento final de recolección, regulando la cantidad de material recolectado. Sin embargo, en ciertos casos pueden generarse cambios repentinos en la preferencia, si es que las hormigas identifican la asociación entre alguna de las claves inicialmente atrayentes y una consecuencia no deseada, por ejemplo sobre el crecimiento y salud del hongo simbionte (Howard, 1988, Herz, et al., 2008, Infante-Rodríguez et al., 2020). Ambas posturas permiten comprender la observación de que el primer corte de hoja haya sido predictor del consumo final de un ítem (*Figura 3.14*).

La mayor cantidad de lignina en Sen del campo (*Figura 5.5*) debería encontrarse balanceada por otros atributos deseados presentes en las hojas tales como la menor proporción de polifenoles totales (*Figura 5.9 A*), la tendencia a mayor concentración de proteínas totales y la mayor concentración de materia orgánica (*Tabla 5.2*). Por otro lado, Anacahuíta posee menos lignina, pero el balance con otros compuestos y características físicoquímicas (*Tabla 5.2*) la haría menos preferida (*Figura 3.14*). Como consecuencia de estos balances, se generaría la preferencia por Sen del campo sobre Anacahuíta (*Figuras 3.13, 3.15 y 3.20*). Cabe destacar que el hecho de que el contenido de lignina sea compensado por otros atributos resulta relevante teniendo en cuenta que el hongo simbionte de este grupo de hormigas tiene menor capacidad de degradar la lignina que otros hongos emparentados (Nygaard, 2016).

El conjunto de datos fitoquímicos de ambas especies permite entender la observación de que el primer corte de un ítem predice su consumo final (*Figura 3.13*) y que el contacto físico con el ítem amplifica la diferencia de recolección (*Figura 3.20A respecto a figura 3.21 D*). En otras palabras, las claves volátiles

permiten discriminar los ítems a distancia y el acercamiento (*Figura 3.21 D*) y son luego claves gustativas, las que cumplen un rol definitivo en la decisión de recolectar determinado ítem.

Los compuestos fenólicos están asociados a defensas vegetales contra insectos (War et al., 2012). Sin embargo, existe evidencia de que el hongo simbionte es capaz de transformar estos compuestos de modo tal que no sean tóxicos para las hormigas (Cherrett 1980; Powell y Stradling 1986; Nichols-Orians 1991; Infante-Rodriguez et al., 2020). Otrxs autores destacan el hecho de que ciertos compuestos fenólicos tienen efectos antioxidantes y que algunos presentan propiedades defensivas frente al estrés biótico, tales como las propiedades antimicrobianas de flavonoides y taninos (Villard et al., 2019). En esta línea, Debib y colaboradores (2013) indican que la actividad antimicrobiana hacia bacterias grampositivas y gramnegativas puede asociarse a una alta concentración de flavonoides y taninos. Además, considerando que los taninos tienen actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral (Scalbert 1991) su presencia podría ser relevante para el mutualismo con el hongo simbionte. Esto resulta interesante, considerando el comportamiento higiénico de las hormigas y las condiciones microambientales generadas para el crecimiento del hongo simbionte, donde podría servir para controlar la reproducción de microorganismos indeseados.

Si bien en esta tesis no se observó que Anacahuita esté entre las especies más preferidas de todas las evaluadas, tampoco se observó que la misma sea activamente rechazada. Cuando la única oferta de alimento fresco fue Ancachuita observamos que las hormigas la recolectaban normalmente. En los experimentos de plasticidad observamos casos de colonias e instancias del experimento donde la frecuencia de recolección de Anacahuita se igualó a la de Sen del campo. Estas observaciones junto a las características fitoquímicas arriba descritas invitan a considerar que las hormigas podrían recolectar Anacahuita en casos eventuales como recurso particular frente a requerimientos metabólicos y sanitarios específicos. Esto resulta consistente con observaciones de campo llevadas a cabo durante esta tesis en las cuales se detectaron hormigas en árboles de Anacahuita (*Figura 3.12*) y reportes de profesionales de INTA y viveros, quienes mencionan que las hormigas cortadoras también consumen Anacahuita (comunicación personal).

En el análisis de compuestos volátiles, también se identificó la presencia de Limoneno en Anacahuita, mientras que solo se hallaron trazas de este en Sen del campo. Este compuesto tiene propiedades insecticidas y actividad antibacterial (Hebeish et al. 2008, Skalicka-Wozniak et al. 2009; Oliveira et al. 2010b) lo cual bien puede contribuir a las preferencias expresadas en los Capítulos 3 y 4.

Es importante destacar que en la naturaleza típicamente los olores no se encuentran puros sino que se presentan dentro de mezclas de distinta composición y concentración. Es decir, cada odorante se presenta y es interpretado dentro de un contexto dado por otros olores (*background*). Se ha comprobado que las mezclas de olores tienen mayor estabilidad en la representación que evocan en el cerebro y generan respuestas más rápidas que los olores puros. En muchos casos, el reconocimiento de olores claves se da correctamente solo en el contexto de otros olores (Chan et al., 2018, Jernigan et al., 2020). Estos conceptos demuestran la complejidad de los efectos comportamentales ante la presencia de olores específicos y en particular, permiten entender como Sen del campo con una baja concentración general de volátiles puede ser detectado cuando su compuesto más prevalente (3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno) tiene una concentración 3 órdenes de magnitud menor que la del más concentrado de Anacahuita (D- Limoneno).

Cabe destacar que si bien un análisis sistemático de presencia de tricomas y su contenido no pudo ser incluido en esta tesis, se realizaron observaciones preliminares que permiten interpretar algunos de los fenómenos ya discutidos. Por un lado, la diferencia en la dureza de las hojas (*Figura 5.4*) no explicada por el contenido de lignina (*Figura 5.5*) podría explicarse por la mayor presencia observada de tricomas glandulares y no glandulares en Anacahuita. En función de su largo y densidad y contenido, los tricomas influyen la decisión de realizar el corte de hoja, lo cual hace que claves repelentes estén expuestas antes de percibir otras características atrayentes (Howard, 1988). Por otro lado, la presencia de tricomas glandulares podría también explicar la diferencia en 3 órdenes de magnitud en la concentración de volátiles en comparación con Sen del campo (*Tabla 5.1, figuras 5.6, 5.7 y 5.8*).

Capítulo 6: Discusión, conclusiones y consideraciones finales

6.1 Discusión y conclusiones

En esta tesis se abordó el estudio de las preferencias de recolección de hormigas cortadoras de hojas *A. ambiguus* por un grupo de especies vegetales nativas de la región del Bajo Delta del Río Paraná. El objetivo general, fue generar información sobre el comportamiento de recolección de las hormigas y las bases sensoriales y fisicoquímicas de dicho comportamiento, que sirviese para sentar sobre bases racionales y ajustadas al sitio, un diseño estratégico de manejo integral de hormigas que fuese compatible con plantaciones forestales de interés comercial y con la recuperación del ambiente incluyendo flora y fauna autóctona. La perspectiva de esta tesis fue comprender cómo funcionan las hormigas cortadoras en base a estímulos y recursos de su entorno natural, lo que es clave para lograr un equilibrio entre el cuidado ambiental, la conservación y la actividad agrícola. Las hormigas cortadoras de hojas cumplen un rol importante en los ecosistemas al controlar el crecimiento de plantas y reciclar nutrientes, sin embargo, su interacción con cultivos puede convertirse en un desafío. Conocer a fondo su biología, su comportamiento y su relación con las plantas permitirá diseñar estrategias sostenibles que reduzcan el impacto en los cultivos sin dañar el ecosistema.

Entre los primeros objetivos puntuales de esta tesis estuvo describir la preferencias de hormigas cortadoras por una lista de especies vegetales nativas de la misma región con las cuales se asume un largo período de evolución y la consiguiente existencia de adaptaciones, tanto por parte de las especies vegetales como por parte de las hormigas. Esta situación puede permitir hallar ejemplos de defensas contra la herbivoría altamente ajustadas, así como ejemplos de tolerancia o incluso aprovechamiento de algunas señales de las plantas por parte de las hormigas. Los resultados permitieron identificar especies vegetales más preferidas que el sauce comercial que se querría proteger, en particular Verbena y Sen del campo, y una lista más larga de especies vegetales que resultaron ser aceptadas por las hormigas, pero menos preferidas que el sauce comercial. Esta

información resulta altamente valiosa para el diseño de una estrategia *push-pull* para hormigas en el campo en una plantación de sauces jóvenes.

En el trabajo de Perri et al. (2020) se comprobó la utilidad de contar con estímulos atractivos y repelentes con diferentes rangos de acción: mientras se utilizó un estímulo *push* de corto alcance basado en una barrera mecánica tratada con el compuesto farnesol y aplicada sobre el tronco de los especímenes a proteger, se utilizó como estímulo *pull* a la vegetación de crecimiento espontáneo en el lugar. Esta combinación de estímulos, *push* de corto alcance y *pull* de largo alcance, encuadran a la estrategia *push-pull* (Clasificación tipo III, Eigenbrode et al., 2016). Si bien ésta es una de las combinaciones de estímulos menos utilizada para el manejo de plagas, resultó ser una opción muy conveniente para el tratamiento de las hormigas cortadoras de hojas.

Los resultados de esta tesis brindan información superadora en cuanto al tipo de vegetación que podría utilizarse y dejar crecer como *pull* con el fin de proteger los cultivos de interés y comenzar a recuperar la flora nativa. La información ahora disponible permite diseñar el armado de un paisaje con las especies nativas más preferidas ubicadas en plena cercanía a los árboles que se desee proteger, así como establecer márgenes de distancia a partir de la cual sea seguro promover la reforestación con las especies nativas menos preferidas por las hormigas. Por otro lado, incorporar al paisaje especies nativas menos preferidas tampoco debe ser entendido como un direccionamiento de las hormigas hacia el cultivo de interés. La suma de estímulos y en particular el enriquecimiento con volátiles atractantes y repelentes en el ambiente dificulta también la identificación de objetivos y la orientación hacia ellos (Conchou et al., 2019).

En el esquema final propuesto, el estímulo *push* de cercanía debería seguir siendo la barrera mecánica asociada al repelente farnesol (Perri et al., 2017 y Perri et al., 2020). La presencia de este estímulo protector es muy importante para la estrategia ya que el sauce se encuentra en un rango de palatabilidad intermedio entre las especies evaluadas y entre las especies de crecimiento espontáneo en la zona del delta (Perri et al 2020). Por lo tanto, siempre existe el riesgo de que sea consumida. La ventaja de asociar esta protección a un estímulo *push* es que, al ofrecer vegetación alternativa de corte, disminuye en gran medida la presión de recolección de las hormigas sobre el cultivo protegido.

La extensa comparación entre Anacahuíta y Sen del campo, nos permitió identificar el rol de señales volátiles en el comportamiento de orientación hacia

especies preferidas, y el rol de señales de contacto en el reconocimiento de una especie como ítem consumible o no consumible. Esto vuelve a ser información relevante en el diseño de trampas o disuasores que funcionen a corta y larga distancia. El posible efecto repelente de las ceras cuticulares debe ser aún más estudiado y podría brindar elementos para ser utilizados en combinación con la barrera mecánica. En particular, y en base a las especies que fueron estudiadas en detalle, no se hallaron efectos de repelencia claros, sin embargo, ésta búsqueda podría extenderse a otras especies vegetales que muestren un marcado rechazo y la búsqueda entre especies vegetales que hayan evolucionado bajo la presión de hormigas cortadoras debería ser una posibilidad muy considerable.

En el Capítulo 4 se investigó si la preferencia de las hormigas es un comportamiento innato y si el mismo es modulable. Los experimentos fueron llevados a cabo con dos especies vegetales ubicadas en los extremos de la jerarquía de consumo con el objetivo de establecer generalidades, sin embargo, el concepto debe ser extrapolado a otras especies vegetales y a contextos naturales enriquecidos y altamente cambiantes.

Se observó que la preferencia entre Anacahuita y Sen del campo es innata, ya que en todas las colonias sin experiencia se comprobó el mismo patrón de recolección y también se observó que dicho patrón podía alterarse según la experiencia con esas dos especies vegetales. Por lo tanto, las variaciones en la preferencia tanto por disponibilidad como por experiencia evidencian la plasticidad del sistema.

La capacidad de las hormigas para rechazar recursos luego de comprobar un efecto adverso sobre la colonia o el hongo simbiote ha sido varias veces documentada (Saverschek et al., 2010 y 2011). Este fenómeno ha sido explicado por cambios tanto a nivel individual (Falibene et al., 2015) como a nivel social y emergente de la colonia (Arenas et al., 2017). En esta tesis, el fenómeno de plasticidad evidenciado no se trató de pasar a evitar un recurso, sino de aceptar y aumentar la preferencia por un recurso antes no preferido. Quedan aún muchos interrogantes en relación al tipo de aprendizaje y al nivel individual o social en el cual esta plasticidad ocurre. Para el fin y objetivo de esta tesis es necesario hacer énfasis en que la capacidad de adaptación debe ser tomada en cuenta al momento de diseñar una estrategia de manejo de hormigas basada en atracción y repelencia. Se debe considerar que el valor innato de muchas señales puede ser modificado por la experiencia. Por ello mismo también se puede esperar que la

combinación óptima de elementos *push-pull* en un sitio puede ser distinta a la de otro sitio pocos kilómetros más lejos pero con una historia de vegetación y manejo diferente.

En el Capítulo 5 se inició la descripción de características físicoquímicas de Sen del campo y Anacahuíta, que permitieran comprender el por qué de la preferencia y la aceptación de recursos mostrada por las hormigas *A. ambiguus*. En coincidencia con trabajos previos encontramos que las hormigas se orientaron inicialmente mediante claves químicas volátiles (Littledyke & Cherrett, 1978). Las claras diferencias en los respectivos perfiles de volátiles de ambas especies indican que esa discriminación sería perfectamente posible. Los volátiles reportados para Anacahuíta y Sen del Campo resultan solo un ejemplo de la diversidad de olores presentes en la naturaleza y en una plantación acompañada de vegetación espontánea. En sistemas agrícolas donde la arquitectura vegetal es más diversa que en un monocultivo, la combinación de olores provenientes de diferentes plantas puede enmascarar la detección de la vegetación que se quiere proteger. Los estímulos *pull* buscan redireccionar a las hormigas ofreciendo otras opciones para cortar, agregando también más volátiles al ambiente y evitando la identificación y orientación hacia el recurso protegido (Perri et al 2020). Este enfoque reduce el daño en cultivos sin necesidad de recurrir a pesticidas y pone de manifiesto la relevancia de integrar el conocimiento de la ecología química en el diseño de estrategias agroecológicas sostenibles. Futuros experimentos podrían estar apuntados a identificar cuáles de los compuestos volátiles o mezclas de ellos, desencadenan comportamientos robustos de atracción o aversión en hormigas, cuyo uso también podría ser incorporado a un plan de manejo.

El análisis del contenido químico de las hojas de Anacahuíta y Sen del campo también puede explicar los perfiles de recolección. El balance de compuestos fenólicos y nutrientes da cuenta de los factores químicos que entran en juego y de la diversidad química que puede haber en el paisaje. Esta diversidad también está asociada a una diversidad biológica mayor. Este enfoque no solo proporciona beneficios directos al cultivo, sino que también fortalece la sostenibilidad del sistema agroecológico al fomentar la coexistencia de múltiples especies. La inclusión de vegetación nativa como parte del diseño del paisaje agrícola

permitiría crear también hábitats para polinizadores, enemigos naturales de plagas y otros organismos benéficos, lo que refuerza las redes tróficas locales y mejora la estabilidad del ecosistema (Landis et al 2020). El aumento en la riqueza de especies vegetales nativas conjuntamente con el cultivo reduce la dependencia de insumos externos como fertilizantes y pesticidas, ya que mejora las funciones del ecosistema y regenera las interacciones bióticas que producen “servicios ecosistémicos” (Isbell et al., 2011, 2017; Kremen y Miles, 2012; Gurr et al., 2017; Chaplin-Kramer, et al., 2011). Al reducir la dependencia de insumos externos se disminuye el impacto ambiental asociado a la producción agrícola, contribuyendo a sistemas más resilientes frente al cambio climático y a las fluctuaciones en las dinámicas de plagas y enfermedades.

6.2 Consideraciones finales

6.2.1 Fenotipos variables

Con relación a la recolección descrita de Sen del campo o Anacahuita por parte de las hormigas, Smith y colaboradores (2023) proponen en otro sistema, la existencia de fenotipos gustatorios. Sugieren que dentro de la población de hormigas recolectoras existirían diferencias en las tareas que éstas realizan y que ello estaría basado en diferencias gustativas. Bajo esta perspectiva una colonia tendría polimorfismos dentro de la casta de “obreras” con especialización de tareas y luego, dentro de una subcasta (en este caso, recolectoras de hojas) habría fenotipos gustatorios variables que, en base a estas características, tendrían distinto comportamiento en la elección de material vegetal y la evaluación de las condiciones del hongo simbionte. Esta propuesta contribuye a comprender la diversidad social y funcional, probablemente con bases en la diversidad sensorial. También podría explicar que las preferencias a nivel individual por Anacahuita y Sen del campo, no se deben a una distribución probabilística reflejo del gusto relativo por cada especie vegetal, sino que refleja legítimas diferencias entre individuos de una misma colonia y que los ítems recolectados presentan características físicoquímicas disímiles que permiten claramente su identificación. Esta diversidad resulta relevante junto a propuestas, como las de Wagner (1991),

quien indica que la exposición de terpenos a insectos puede variar entre efectos atractantes a tóxicos dependiendo del animal, la concentración del compuesto, otros químicos presentes y el modo del contacto. En esta línea sería interesante profundizar el rol de los posibles fenotipos funcionales ante los metabolitos de interés analizados. Además sería relevante continuar con los estudios de los extractos de ceras de Anacahuita y Sen del campo que se encuentran involucrados en un potencial rechazo de un ítem.

6.2.2 Producciones sustentables

Hoy en día se realizan certificaciones, que hacen foco en los productos permitidos que se utilizan en reemplazo de aquellos prohibidos, en vez de focalizar en el rediseño global hacia la sustentabilidad del proceso productivo. Entre ellos se destacan los aspectos ecológicos, económicos y sociales, como el manejo del suelo, la diversidad vegetal (espacial y temporal), el régimen de tenencia de la tierra, la conservación de “recursos”, la eficiencia energética y el capital social. Entendiendo por éste último las interacciones entre individuos que conforman la comunidad y entre éstos y las entidades; algunos ejemplos pueden ser: la satisfacción de las necesidades de quien produce y su familia, los lazos con la comunidad y las expectativas a futuro (Dellepiane y Sarandón, 2008). De esto se desprende que, a partir de las normativas estatales o industriales y de las exigencias de los compradores, las producciones puedan modificarse. Tarde o temprano, parte de las modificaciones en la producción serán la transición hacia producciones sustentables.

En policultivos existe mayor abundancia de depredadores y/o parasitoides tanto de especies generalistas como de especialistas (Root, 1973) donde tienen bajas tasas de emigración y sin afectar las de inmigración (Coll y Bottrell, 1996). Los monocultivos generan presión sobre las especies generalistas para consumir las especies de interés comercial, ya que las posibles estrategias de obtención de nutrientes no se encuentran balanceadas. Con lo cual, la incorporación de especies nativas (especialmente Sen del campo y Verbena) y la no remoción de la vegetación espontánea permitiría una mayor diversidad de nutrientes disponibles de manera tal que la herbivoría por las especies de interés debería verse

disminuida al poder implementar otra estrategia para obtener proteínas y carbohidratos. Para este tipo de producción algunas recomendaciones elementales en el Delta del Paraná indican que un conjunto de prácticas posibles serían disminuir el uso de diques, mantener la vegetación espontánea, utilizar barreras físicas en plantas de interés, forestar con vegetación nativa generando corredores biológicos, implementar sistemas de policultivos silvopastoriles, etc. (Aquino et al., 2024, Astrada, 2023; Baigún, 2013; Casaubón y Tassano Viaña, 2012; Cerrillo et al., 2015; Fracassi et al., 2013, Fracassi et al., 2017, Gurini et al., 2020; Kaspari, 2003; Nickele et al. 2012; Moutinho et al., 2003; Perri et al., 2017; Perri et al., 2020; Quintana et al., 2014; Sánchez-Restrepo et al., 2019; Vasconcelos y Cherrett, 1997; Plan Estratégico Forestal y Foresto-Industrial Argentina 2030, 2019).

6.2.3 Enfoque interdisciplinario

Estudios etnobotánicos y etnofarmacológicos de los territorios en estudio permiten dar cuenta de los usos culturales de las especies vegetales. La revisión de compuestos alcaloides, fenólicos, flavonoides, taninos, antimicóticos y antimicrobianos que caracterizan una especie vegetal serán de potencial interés para seleccionar especies que tengan potencial efecto en las colonias. Sin embargo, esto no es posible sin la preservación del patrimonio cultural y biológico de la región. Para el caso de Anacahuita y Sen del campo los usos medicinales y/o culturales -*Tabla 6.1*- (Alcaraz et al., 2012, Alonso y Desmarchelier, 2015, Jiménez Hernández et al., 2018, Martinez et. al, 2021, Tabakian, 2019 y 2024, observaciones personales) ponen de manifiesto que no sólo son especies de potencial interés para la disminución de la herbivoría en sauces comerciales sino que presentan funciones ecosistémicas, medicinales, estéticas y alimenticias (de manera directa -frutos- o indirecta -miel-).

Tabla 6.1: Cuadro de usos etnobotánicos y etnofarmacología de Anacahuita y Sen del campo. Especies asociadas y tipo de crecimiento que presentan.

Nombre común de la especie	Usos medicinales	Otros usos	Especies asociadas	Crecimiento

Anacahuita	<p>Hojas: antibacterial, (infusión): Caída del cordón umbilical, diarrea, expectorante, gastritis, hipoglucemia, hipotensión, infecciones de las vías respiratorias (bronquitis crónicas, resfríos, tos y catarros) y de vejiga, leucorrea, secado y desinfección de llagas, trastornos hepáticos, trastorno rectal, uretritis</p> <p>Raíz: Astringente, antidiarreico</p> <p>Frutos: aperitivo y tónico</p> <p>Aceite esencial: neurotóxico en altas dosis (en estado puro)</p>	Alimento o infusión (en té o mate) para humanxs y aves (frutos), apícola, cortina forestal, madera, leña y carbón, ornamental (crecimiento lento)	<p>Mariposas: Hospedera de oruga de Polibio sangrante (<i>Phocides polybiu</i>)</p> <p>Aves: diversas frugívoras (Ej. celestino, zorzal fiofío pico corto, fuegueros, frutero, benteveo, paloma picazuró)</p>	Intermedio
Sen del campo	<p>Hojas y brácteas(*): Antibacterial. Antimalárica, cataratas, febrífuga, emoliente, laxante,</p>	Apícola, ornamental	<p>Mariposas: Hospedera de larva de Limoncito (<i>Eudeva deva deva</i>)</p>	Rápido

	infecciones urinarias, gonorrea, dismenorrea, trastornos hepáticos, erisipela. Semillas: hipoglucemiantes, laxantes Corteza: Laxante Raíz: Abortiva, cólicos			
--	--	--	--	--

(*)Hojas modificadas.

Estos usos son incluso datados de pueblos originarios pre-hispánicos de la zona (Castiñeira Latorre y Castiñeira Latorre, 2020). Sin embargo hoy en día su uso no se encuentra extendido dado que con la colonización de la región estas prácticas terapéuticas o ritos comunales de pueblos originarios y africanos fueron prohibidos, acusados de hechicería y/o brujería y juzgados (con torturas y muerte asociadas a los juicios) -Farberman, 2000- como continuación de la cacería de brujas europea. En contraposición, en la modernidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) trabaja para contrarrestar estas consecuencias históricas tal que promueve el uso y extensión de la medicina tradicional o popular, considerándola útil como nexo con la medicina occidental y también para poblaciones alejadas de centros de salud, como es el caso del Delta. La medicina tradicional o popular es entonces entendida como *“...la suma de todos los conocimientos teóricos y prácticos, explicables o no, utilizados para diagnóstico, prevención y supresión de trastornos físicos, mentales o sociales, basados exclusivamente en la experiencia y la observación, y transmitidos verbalmente o por escrito de una generación a otra. [...] (es) una amalgama de práctica médica activa y experiencia ancestral.[...] puede considerarse también como el conjunto de prácticas, medidas, ingredientes y procedimientos de toda clase, sean o no materiales, que desde tiempo inmemorial, han permitido [...] protegerse contra la enfermedad, aliviar sus propios sufrimientos y curarse a sí mismos.”* (OMS, 1978). La perspectiva

propuesta por la OMS implica la revalorización de los saberes y prácticas populares en conjunto con el desarrollo de políticas de integración de la medicina tradicional en los sistemas nacionales de salud así como investigaciones para su uso con base científica (Martínez et al., 2021). En Argentina existen algunos ejemplos de estas políticas como leyes provinciales, coordinadoras de salud intercultural, centros de salud, hospitales interculturales (Cavarra et al., 2023; Roncarolo, 2022; Redación diario Río Negro, 2021; Durán, 2021 y expedientes 91-33.131/14, 91-33.175/14 y 91-32.232/13, Cámara de diputados de la provincia de Salta). La salud intercultural y la medicina tradicional o popular dan cuenta de la importancia de la preservación de aquellas especies de uso medicinal pero también del patrimonio cultural y natural que representan. A pesar de ello diversas especies de uso medicinal se encuentran amenazadas de extinción o de graves pérdidas genéticas y no hay estudios ni información robusta sobre ellas (Martínez et al., 2021).

Montoya-Lerma (2012) plantea que es imprescindible un enfoque multidimensional e interdisciplinario para el abordaje de problemáticas asociadas a especies consideradas pestes y, a la vez, este es uno de los mayores desafíos de la disciplina. En este sentido, es indispensable recuperar estudios de otras disciplinas como los de Camarero y colaboradores (2018) -*Figura 6.1*- si queremos co-construir estrategias sustentables para las prácticas forestales de la comunidad del Bajo Delta del Paraná que puedan, efectivamente, ser aplicadas y perdurar en el tiempo.

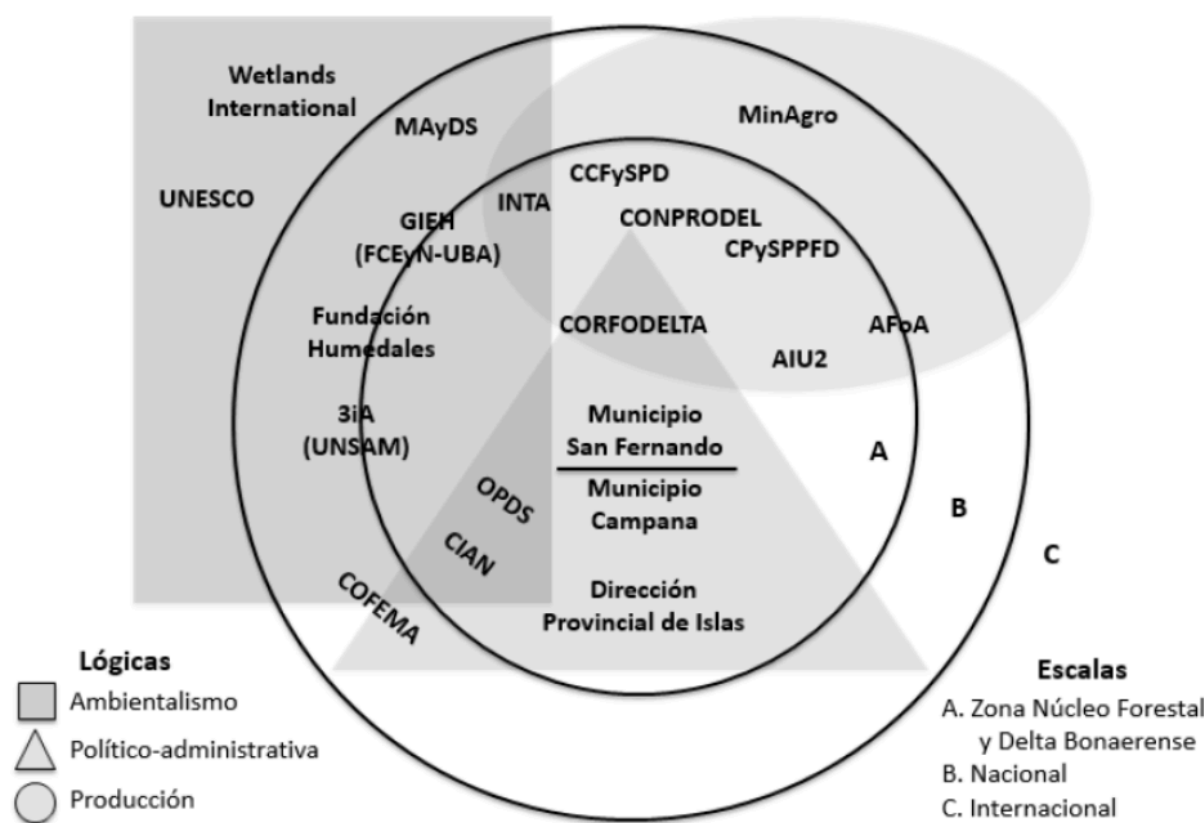


Figura 6.1: Mapa social de agentes de la Zona Núcleo Forestal del Bajo Delta del Paraná (tomado de Camarero et al., 2018). Referencias: Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación (MAYDS), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Grupo de Investigación en Ecología de Humedales de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (GIEH – FCEyN UBA), Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional San Martín (3iA – UNSAM), Consejo Federal de Medio Ambiente (COFEMA), Comité Interjurisdiccional de Alto Nivel (CIAN), Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible (OPDS), Ministerio de Agroindustria de la Nación (MinAgro), Cooperativa de Consumo Forestal y Servicios Públicos del Delta (CCFySPD), Consejo de Productores del Delta (ConProDel), Cooperativa de Provisión y Servicios Públicos para Productores Forestales del Delta (CPySPPFD), Corporación de Fomento del Delta Bonaerense (CorFoDelta), Asociación Forestal Argentina (AFoA) y Asociación Civil Isleños Unidos II (AIU2).

Por lo tanto, resulta necesario abordar las problemáticas de sujetos o regiones de manera interdisciplinar, contemplando las realidades concretas de estos sectores y bajo medidas específicas de conservación y protección del territorio. Sin estos elementos, podemos generar excelentes resultados y prácticas sustentables pero que luego no se apliquen de manera efectiva si no se adecuan a la materialidad e idiosincrasia de la población a la que están dirigidas.

Capítulo 7. Bibliografía

Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Carol Stream: Allured Publishing Corporation.

Al-Badran, A. A., Fujiwara, M., Gatlin, D. M., & Mora, M. A. (2018). Lethal and sublethal effects of the insecticide fipronil on juvenile brown shrimp *Farfantepenaeus aztecus*. *Scientific Reports*, 8, 10769. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29052-z>

Alcaráz, L., Mattana, C., Satorres, S., Petenatti, E., Petenatti, M., Delaye, L., & Laciari, A. (2012). Antibacterial activity of extracts obtained from *Senna Corymbosa* and *Tipuana tipu*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(2), 103–111.

Allen, J. A. (1988). Frequency-dependent selection by predators. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 319(1196), 485–503. <https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0056>

Alma, A. M., Arenas, A., Fernández, P. C., & Buteler, M. (2024). The refuse dump provides information that influences the foraging preferences of leaf-cutting ants. *Ecological Entomology*, 50(1), 84–92. <https://doi.org/10.1111/een.13106>

Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74(1–3), 19–31. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00028-6)

Alvarado, A., Berish, C. W., & Peralta, F. (1981). Leaf-cutter ant (*Atta cephalotes*) influence on the morphology of Andepts in Costa Rica. *Soil Science Society of America Journal*, 45(4), 790–794. <https://doi.org/10.2136/sssaj1981.03615995004500040040x>

Alonso, J., & Desmarchelier, C. J. (2015). *Plantas medicinales autóctonas de la Argentina: Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud* (1.a ed.). Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Corpus Libros Médicos y Científicos.

Análisis Digital. (2022). Incendios en el Delta. *Análisis Digital*. <https://www.analisisdigital.com.ar/provinciales/2022/09/17/incendios-en-el-delta-masiva-marcha-por-la-ley-de-humedales-y-contra-quemas>

Andrade, A. P. P., Forti, L. C., Moreira, A. A., Boaretto, M. A. C., Ramos, V. M., & Matos, C. A. O. (2002). Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. *Sociobiology*, 39(2), 293–305.

Antunes, E., Guedes, R., Della Lucia, T., & Serrão, J. E. (2000). Sub-lethal effects of abamectin suppressing colonies of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Pest Management Science*, 56(11), 1059–1064. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200011\)](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200011)56:11<1059::AID-PMPS1059>3.0.CO;2-1)

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. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.03.002>

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(Pt 16), 2490–2496. <https://doi.org/10.1242/jeb.139568>

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(1), e0171388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171388>

Arenas, A., & Roces, F. (2018). Appetitive and aversive learning of plant odors inside different nest compartments by foraging leaf-cutting ants. *Journal of Insect Physiology*, 109, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.07.001>

Arimura G., Matsui K., Takabayashi J. (2009). Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiol.* 50(5):911-23. doi: 10.1093/pcp/pcp030. Epub 2009 Feb 25. PMID: 19246460.

Astrada, E. (2023). Protocolo de mejores prácticas ganaderas bajo una gestión ambiental responsable en el Delta del Paraná / Elizabeth. Astrada; Roberto Bó; Rubén Quintana; editado por Rubén. Quintana. - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Fundación para la Conservación y el Uso Sustentable de los Humedales.

Aquino D.S., Gavier-Pizarro G., Rescia A.J. y Quintana R.D. (2024). Wetland responses to non-stationary hydro-climatic dynamics in the context of land cover and land use change. *Remote Sensing Applications: Society and Environment*. 34, 101156, ISSN 2352-9385, <https://doi.org/10.1016/j.rsase.2024.101156>.

Austin, A. T., Méndez, M. S., Ballaré, C. L. (2008). Photodegradation alleviates the lignin bottleneck for carbon turnover in terrestrial ecosystems. *PNAS*. 113(16): 4392-4397.

Bacci M Jr, Solomon SE, Mueller UG, Martins VG, Carvalho AOR, Vieira LGE, Silva-Pinhati ACO. (2009). Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta* fabricius

(Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* **51**:427–437.

Baigún C. R. M., Minotti P. G., Puig A., Kandus P., Quintana R., Vicari R., Bo R., Oldani N. O., Nestler J. (2009). Resource use in the Paraná River Delta (Argentina): Moving away from an ecohydrological approach? *Ecohydrology and Hydrobiology*. **8**(2-4): 77-94.

Baigún, C.R.M. (2013). Manual para la gestión ambiental de la pesca artesanal y las buenas prácticas pesqueras en la cuenca del río Paraná, Argentina. Fundación Humedales / Wetlands International. Buenos Aires, Argentina.

Baldwin IT, Halitschke R, Paschold A, von Dahl CC, Preston CA. (2006). Volatile signaling in plant-plant interactions: "talking trees" in the genomics era. *Science*. **311**(5762):812-5. doi: 10.1126/science.1118446. PMID: 16469918.

Ballaré CL, Rousseaux MC, Searles PS, Zaller JG, Giordano CV, Robson TM, et al. (2001). Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina). An overview of recent progress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **62**: 67–77.

Bass M, Cherrett J.M. (1995). Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Physiol. Entomol.* **20**:1–6. doi:10.1111/.

Benencia, R., Pizarro, C. (2018). Introducción. Ruralidades, actividades económicas y mercados de trabajo en el Delta vecino a la Región Metropolitana de Buenos Aires. Año: 2018; p. 7 - 24.

Berenbaum, M.R. (1995). Turnabout is fair play: secondary roles for primary compounds. *Journal of Chemical Ecology*. **21**, 925–40.

Blanco, D. E., Méndez, F. M. (2010). Endicamientos y terraplenes en el Delta del Paraná: Situación, efectos ambientales y marco jurídico. 1a ed. - Buenos Aires: Fundación para la Conservación y el Uso Sustentable de los Humedales.

Blande J.D. (2017). Chapter eleven - Plant communication with herbivores. In: Becard, G. (Ed.), *Advances in Botanical Research, How Plants Communicate with Their Biotic Environment*. Academic Press, pp. 281–304. doi: 10.1016/bs.abr.2016.09.004.

Bó R., Quintana R.D. (2013). Sistema 5e - Humedales del Delta del Paraná. En: Benzaquen L., Blanco D., Bo R., Kandus P., Lingua G., Minotti P., Quintana R., Sverlij S., Vidal L. (Eds.),

Inventario de los Humedales de Argentina. Sistemas de Paisajes de humedales del Corredor Fluvial Paraná-Paraguay. Buenos Aires. Pp.297-319. ISBN 978-987-29340-0-2.

Bollazzi M., Roces F. (2007). To build or not to build: Circulating dry air organizes collective building for climate control in the leaf-cutting ant *Acromyrmex ambiguus*. *Animal Behaviour*. **74**(5):1349–1355.

Bollazzi M. (2008). Building behavior and the control of nest climate in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Bollazzi M, Römer D, Roces F. (2021). Carbon dioxide levels and ventilation in *Acromyrmex* nests: significance and evolution of architectural innovations in leaf-cutting ants. *R Soc Open Sci*. **8**(11):210907. doi: 10.1098/rsos.210907. PMID: 34849241; PMCID: PMC8611346.

Bonabeau E., Theraulaz G., Deneubourg JL, Aron S., Camazine S. (1997). Self-organization in social insects. *Trends Ecol Evol*. **12**(5):188-93. doi: 10.1016/s0169-5347(97)01048-3. PMID: 21238030.

Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C et al. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res*. **22**:35–67.

Bonomo, M., Politis, G. G., Gianotti, C. (2011). Montículos, jerarquía social y horticultura en las sociedades indígenas del Delta del río Paraná (Argentina). *Latin American Antiquity*. **22**(3): 297-333.

Bonomo, M., Di Prado, V., Silva, C., Scabuzzo, C., Ramos van Raap, M.A., Castiñeira, C., Colobig, M.M., Politis, G. (2019). Las poblaciones indígenas prehispánicas del río Paraná Inferior y Medio. *Revista del Museo de La Plata*. **4**(2): 585-620. <https://doi.org/10.24215/25456377e089>.

Boomsma, J. J., Fjerdingstad, E. J., Frydenberg, J. (1999). Multiple paternity, relatedness and genetic diversity in *Acromyrmex* leaf-cutter ants. *Proceedings of the Royal Society of London B*. **266**: 249–254.

Boulogne, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L., Loranger-Merciris, G. (2012). Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. **10**: 325–347.

Bourke, A. F. G., Franks, N. R. (1995). *Social Evolution in Ants*. Princeton University Press, NY.

Bruinsma, M., Dicke, M. (2008). Herbivore-induced indirect defense: from induction mechanisms to community ecology. In: *Induced Plant Resistance to Herbivory*. pp. 31–60. doi:10.1007/978-1-4020-8182-8_2.

Burgert, I. (2006). Exploring the micromechanical design of plant cell walls. *American Journal of Botany*. **93**(10): 1391–1401. doi: 10.3732/ajb.93.10.1391. PMID: 21642086.

Burkart, A. (1957). Ojeada sinóptica sobre: La vegetación del Delta del Río Paraná. *Darwiniana*. **11**: 457–561.

Burkart, R. N., Bárbaro, N., Sánchez, R., Gómez, D. (1999). Eco-regiones de la Argentina. [online] Buenos Aires: Programa de Desarrollo Institucional Ambiental. Disponible en: http://www.sib.gov.ar/archivos/Eco-Regiones_de_la_Argentina.pdf.

Cadish, G., Guiller, K. (1997). Driven by nature: a sense of arrival or departure? In: *Cadish, G. & Giller, K. E. (Eds.) Driven by Nature: plant litter quality and decomposition*. CAB International, pp. 393–399.

Caldwell, M. M., Ballaré, C. L., Bornman, J. F., Flint, S. D., Bjorn, L. O., Teramura, A. H., et al. (2003). Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochemical and Photobiological Sciences*. **2**: 29–38.

Camarero, G., Straccia, P. H., Maestripieri, E., Ortiz, D., Liftenegger, A. (2018). Mapa social de los agentes de la Zona Núcleo Forestal del Delta Inferior del Río Paraná. En: *Benencia, R., Pizarro, C. (Eds.) Ruralidades, Actividades Económicas y Mercados de Trabajo en el Delta Vecino a la Región Metropolitana de Buenos Aires*. CICCUS, Buenos Aires.

Camargo, R. S., Lopes, J. (2016). Mandibles of leaf-cutting ants: Morphology related to food preference. *Sociobiology*. **63**: 881–888.

Camargo, R. S., Hastenreiter, I. N., Brugger, M., Forti, L. C., Lopes, J. F. S. (2015). Relationship between mandible morphology and leaf preference in leaf-cutting ants (*Hymenoptera: Formicidae*). *Revista Colombiana de Entomología*. **41**: 241–244.

Camargo, R. S., Forti, L. C., de Matos, C. A. O., Lopes, J. F., de Andrade, A. P. P., Ramos, V. M. (2003). Post-selection and return of foraged material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* (*Hymenoptera: Formicidae*). *Sociobiology*. **42**: 93–102.

Cameron, K., Teece, M., Bevilacqua, E., Smart, L. (2002). Diversity of cuticular wax among *Salix* species and *Populus* species hybrids. *Phytochemistry*. **60**(7): 715–725. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00198-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00198-X).

Canciani, M., Arnellos, A., Moreno, A. (2019). Revising the superorganism: An organizational approach to complex eusociality. *Frontiers in Psychology*. **10**: 2653. doi: 10.3389/fpsyg.2019.02653.

Cantarelli, E. B., Correa Costa, E., Pezzutti, R., da Silva Oliveira, R. (2008). Losses quantification in *Pinus taeda* development after leaf-cutting ants attack. *Ciencia Florestal*. **18**: 39–45.

Carpintero, D. L., de Biase, S., Konopko, S. A. (2014). Fauna del Delta del Río Paraná. *Insecta: Hemiptera: Heteroptera*. Fundación de Historia Natural Félix de Azara. **3**: 257–290.

Casaubon, E., Tassano Viaña, J. J. (2012). Manual de buenas prácticas silvopastoriles: Para obtención de madera de álamo de calidad para usos múltiples en el Delta Inferior del Río Paraná.

Cassini, M., Túnez, J. (2019). Situación ambiental del Bajo Delta del Paraná: ¿Qué opinan los pobladores? *Ecología Austral*. **29**: 296–305.

Castiñeira Latorre, E., Castiñeira Latorre, C. (2020). Aportes a la farmacopea de los cerriteros prehispánicos de la cuenca del Río de La Plata. *Ethnoscientia*. **5**(1): 1–25.

Cavarra, M. J., Rizzo, R. L., Jones, L. H., Roses, M. A., Luppi, M. M., Carrara, C. (2023). Atención primaria de la salud (APS) con abordaje inclusivo, intercultural y situado. En: *Derecho a la Salud y Sistema de Salud en la Argentina*. Ministerio de Salud de la Nación.

Cerrillo, T., Álvarez, J. A., Álvarez, J. L., Battistella, A., Braccini, C., Casaubon, E., et al. (2015). La forestación de salicáceas como aporte al desarrollo sustentable del Delta del Paraná. *XXIX Jornadas Forestales de Entre Ríos*, Concordia (Entre Ríos), pp. 14.

Chan, H. K., Hersperger, F., Marachlian, E., Smith, B. H., Locatelli, F., et al. (2018). Odorant mixtures elicit less variable and faster responses than pure odorants. *PLOS Computational Biology*. **14**(12): e1006536. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006536>.

Chaplin-Kramer, R., O'Rourke, M. E., Blitzer, E. J., & Kremen, C. (2011). A meta-analysis of crop pest and natural enemy response to landscape complexity. *Ecology Letters*, **14**(10), 922–932. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01642.x>

Cheeke, P. R. (1989). *Toxicants of plant origin, volume IV: Phenolics*. CRC Press.

Cherrett, J. M. (1980). Possible reasons for the mutualism between leafcutting ants (Hymenoptera: Formicidae) and their fungus. *Biological Ecology Méditerranée*, 7, 113–122.

Cherrett, J. M. (1986). The biology, pest status and control of leaf-cutting ants. *Agricultural Zoology Reviews*, 1, 1–28.

Coll, M., & Bottrell, D. G. (1996). Movement of an insect parasitoid in simple and diverse plant assemblages. *Ecological Entomology*, 21(2), 141–149.

Coley, P. D. (1983). Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs*, 53(3), 209–233.

Conchou, L., Lucas, P., Meslin, C., Proffit, M., Staudt, M., & Renou, M. (2019). Insect Odorscapes: From plant volatiles to natural olfactory scenes. *Frontiers in Physiology*, 10, 972. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00972>

Convención Ramsar. (1971). *Relativa a los Humedales de Importancia Internacional*. Ramsar, Irán, 2.2.1971. Modificada según el Protocolo de París, 3.12.1982 y las Enmiendas de Regina, 28.5.1987. https://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/library/current_convention_s.pdf

Convención Ramsar. (2018). *Perspectiva mundial sobre los humedales: Estado de los humedales del mundo y sus servicios a las personas*. Secretaría de la Convención Ramsar, Gland, Suiza.

Cook, S. M., Khan, Z. R., & Pickett, J. (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual Review of Entomology*, 52, 375–400.

Cosarinsky, M. I., Römer, D., & Roces, F. (2020). Nest turrets of *Acromyrmex* grass-cutting ants: Micromorphology reveals building techniques and construction dynamics. *Insects*, 11(2), 140. <https://doi.org/10.3390/insects11020140>

Crozier, R. H., & Dix, M. W. (1979). Analysis of two genetic models for the innate components of colony odor in social Hymenoptera. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 4(3), 217–224. <https://doi.org/10.1007/BF00297645>

Daily, G. C. (1997). *Nature's services: Societal dependence on natural ecosystems*. Island Press.

Dávila, C. (2023). *Metabolitos de defensa en plantas de sauce y su interacción con el herbívoro especialista *Nematus oligospilus**. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n7369_Davila

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>

Dudareva N, Klempien A, Muhlemann JK, Kaplan I.(2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.* 2013 Apr;198(1):16-32. doi: 10.1111/nph.12145. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23383981.

Eigenbrode, S. D., Birch, A. N. E., Lindzey, S., Meadow, R., & Snyder, W. E. (2016). A mechanistic framework to improve understanding and applications of push-pull systems in pest management. *Journal of Applied Ecology*, 53(1), 202–212.

Emery, C. (1888c ["1887"]). Formiche della provincia di Rio Grande do Sùl nel Brasile, raccolte dal dott. Hermann von Ihering. *Bullettino della Società Entomologica Italiana*, 19, 352–366.

Engelberth, J. (2006). Secondary metabolites and plant defense. In L. Taiz & E. Zeiger (Eds.), *Plant physiology* (Vol. 4, pp. 315–344). Sunderland, UK: Sinauer Associates.

Erb, M., & Reymond, P. (2019). Molecular interactions between plants and insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 527–557. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095910>

Erthal, M. Jr., Peres Silva, C., & Samuels, R. I. (2004). Digestive enzymes of leaf-cutting ants, *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae: Attini): Distribution in the gut of adult workers and partial characterization. *Journal of Insect Physiology*, 50, 881–891.

Ettre, L. S., Welter, C., & Kolb, B. (1993). Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace-gas chromatography utilizing the phase ratio variation method. *Chromatographia*, 35, 73–84.

Exptes. 91-33.131/14, 91-33.175/14 y 91-32.232/13 (unificados). (2014). Boletín oficial N° 19.446, del día 15 de diciembre de 2014. LEY N° 7856. Sancionado el día 06/11/2014. Promulgado el día 02/12/2014. Cámara de diputados de la provincia de Salta. https://www.diputadosalta.gob.ar/digesto_leyes/82/download_file

Faberman, J. (2000). Hechicería, cultura folclórica y justicia capitular. El proceso de Tuama (Santiago del Estero), 1761. *Andes*, 11, 2000. Universidad Nacional de Salta. ISSN: 0327-1676.

Falibene, A., Roces, F., & Rössler, W. (2015). Long-term avoidance memory formation is associated with a transient increase in mushroom body synaptic complexes in leaf-cutting ants. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 84.

Farji-Brener, A. G., & Ruggiero, A. (1994). Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: Patterns in species richness and geographical range sizes. *Journal of Biogeography*, 21(4), 391–399. <https://doi.org/10.2307/2845757>

Farji-Brener, A. G., & Silva, J. F. (1995). Leaf-cutting ant nests and soil fertility in a well-drained savanna in Western Venezuela. *Biotropica*, 27, 250–255.

Farji-Brener, A. G. (2000). Leaf cutting ant in temperate environments: Mounds, mound damage and nest mortality rate in *Acromyrmex lobicornis*. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 35, 131–138.

Farji-Brener, A. G. (2001). Why are leaf-cutting ants more common in early secondary forests than in old-growth tropical forests? An evaluation of the palatable forage hypothesis. *Oikos*, 92, 169–177.

Fernández, F. (2003). Breve introducción a la biología social de las hormigas. En F. Fernández (Ed.), *Introducción a las Hormigas de la región Neotropical* (pp. XXVI + 398). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. Capítulo 5.

Forti, L. C., Andrade, M. L. D., Andrade, A. P. P., Lopes, J. F. S., & Ramos, V. M. (2006). Bionomics and identification of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) through an illustrated key. *Sociobiology*, 48, 135–153.

Fowler, H. G., & Robinson, S. W. (1979). Field identification and relative pest status of Paraguayan leaf-cutting ants. *Turrialba*, 29, 11–16.

Fowler, H. G. (1978). Foraging trails of leaf-cutting ants. *Journal of the New York Entomological Society*, 86, 132–136.

Fracassi, N., Quintana, R., Pereira, J., Mujica, G., & Landó, R. (2013). *Protocolo de Estrategias de Conservación de la Biodiversidad en Bosques Plantados de Salicáceas del Bajo Delta del Paraná*. 1a ed. Delta del Paraná, Buenos Aires: Ediciones INTA.

Fracassi, N. G., Quintana, R. D., Pereira, J. A., Mujica, G. O., & Landó, R. (2014). *Protocolo: Estrategias de Conservación de la Biodiversidad en Bosques Plantados de Salicáceas del Bajo Delta del Paraná*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 60.

Fracassi, N. (2017). *Guía de campo para la restauración del bosque ribereño en el bajo Delta del Paraná: basada en el protocolo de estrategias de conservación de la biodiversidad en bosques plantados de salicáceas del bajo Delta del Paraná*. 1a ed. Campana, Buenos Aires: Ediciones INTA.

Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., & Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 10242–10297. <https://doi.org/10.3390/ijms140510242>

Greenwood, J. J. D., & Elton, R. A. (1979). Analysing experiments on frequency-dependent selection by predators. *Journal of Animal Ecology*, 48, 721–737.

Guerrero Rincón, N., Olarte Quintero, M. A., & Pérez Naranjo, J. C. (2012). Leaf area measurement in photographs taken with a webcam, a cell phone or a semi-professional camera. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65, 6399–6405.

Gurini, L., Dovico, A., Álvarez, A., & Maldonado, L. (2020). *Producción y procesamiento de polen: buenas prácticas de manejo y manufactura*. Buenos Aires: Ediciones INTA; Estación Experimental Agropecuaria Delta del Paraná.

Gurr, G. M., Wratten, S. D., Landis, D. A., & You, M. (2017). Habitat management to suppress pest populations: Progress and prospects. *Annual Review of Entomology*, 62, 91–109.

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. <https://doi.org/10.1093/beheco/arn016>

Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (2011). *The leafcutter ants: Civilization by instinct* (1st ed.). W. Norton & Company, Inc.

Inventario Nacional de Humedales. (2020). Gobierno de la República Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/ambiente/agua/humedales/inventarionacional>

Jiménez, N. L. (2019). *Patrones de herbivoría y coocurrencia de hormigas cortadoras de hojas en forestaciones y áreas naturales del Bajo Delta del Río Paraná, Argentina* (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Jiménez Hernández, J., Ragone, M. I., Bonazzola, P., Bandoni, A. L., & Consolini, A. E. (2018). Antitussive, antispasmodic, bronchodilating and cardiac inotropic effects of the

essential oil from *Blepharocalyx salicifolius* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 210, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.013>

Harmon, M. E., Nadelhoffer, K. J., & Blair, J. M. (1999). Measuring decomposition, nutrient turnover, and stores in plant litter. In G. P. Robertson, C. S. Bledsoe, D. C. Coleman, & P. Sollins (Eds.), *Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research* (pp. 202–240). Oxford University Press.

Hebeish, A., Moustafa, M. G., Fouda, I. A., Hamdy, S. M., & EL-Sawy, F. A. (2008). Preparation of durable insect repellent cotton fabric: Limonene as insecticide. *Carbohydrate Polymers*, 74(2), 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.02.013>

Herz, H., Beyschlag, W., & Hölldobler, B. (2007). Herbivory rate of leaf-cutting ants in a tropical moist forest in Panama at the population and ecosystem scales. *Biotropica*, 39, 482–488.

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, 575–582.

Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). *The ants*. Belknap Press of Harvard University Press.

Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (2011). *The leafcutter ants: Civilization by instinct*. New York: W. W. Norton & Company.

Holopainen, J. (2004). Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science*, 9, 529–533.

Holopainen, J., & Gershenzon, J. (2010). Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends in Plant Science*, 15(3), 176–184.

Howard, J. J. (1987). Leaf-cutting ant diet selection: The role of nutrients, water, and secondary chemistry. *Ecology*, 68(3), 503–515.

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

Hubell, S. P., Wiemer, D. F., & Adejare, A. (1983). An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). *Oecologia*, 60, 321–327.

Hughes, W. O. H., Pagliarini, R., Madsen, H. B., Dijkstra, M. B., & Boomsma, J. J. (2008). Antimicrobial defense shows an abrupt evolutionary transition in the fungus-growing ants. *Evolution*.

Infante-Rodríguez, D. A., Monribot-Villanueva, J. L., Mehlreter, K., et al. (2020). Phytochemical characteristics of leaves determine foraging rate of the leaf-cutting ant *Atta mexicana* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoecology*, 30, 147–159. <https://doi.org/10.1007/s00049-020-00306-4>

Informes de Cadenas de Valor. Forestal, papel y muebles. (2023). Año 8 - N° 68 - junio 2023. Ministerio de Economía. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/forestal_2023.pdf

Irmisch, S., Clavijo McCormick, A., Boeckler, G. A., Schmidt, A., Reichelt, M., Schneider, B., ... & Köllner, T. G. (2013). Two herbivore-induced cytochrome P450 enzymes CYP79D6 and CYP79D7 catalyze the formation of volatile aldoximes involved in poplar defense. *The Plant Cell*, 25(11), 4737–4754. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.118265>

Isbell, F., Adler, P. R., Eisenhauer, N., Fornara, D., Kimmel, K., & Kremen, C. (2017). Effects of biodiversity on ecosystem services. *Journal of Ecology*, 105, 871–879.

Isbell, F., Calcagno, V., Hector, A., Connolly, J., Harpole, W. S., Reich, P. B., Scherer-Lorenzen, M., Schmid, B., Tilman, D., van Ruijven, J., Weigelt, A., Wilsey, B. J., Zavaleta, E. S., & Loreau, M. (2011). High plant diversity is needed to maintain ecosystem services. *Nature*, 477(7363), 199–202. <https://doi.org/10.1038/nature10282>

Izaguirre, M. M., Mazza, C. A., Svatoš, A., Baldwin, I. T., & Ballaré, C. L. (2007). Solar ultraviolet-B radiation and insect herbivory trigger partially overlapping phenolic responses in *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana longiflorus*. *Annals of Botany*, 99, 103–109.

Jernigan, C. M., Halby, R., Gerkin, R. C., Sinakevitch, I., Locatelli, F., & Smith, B. H. (2020). Experience-dependent tuning of early olfactory processing in the adult honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 223(1), jeb206748. <https://doi.org/10.1242/jeb.206748>

Jiménez, Nadia Lis. (2019). *Patrones de herbivoría y coocurrencia de hormigas cortadoras de hojas en forestaciones y áreas naturales del Bajo Delta del Río Paraná, Argentina* (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

- Jehison Jiménez Hernández, María Inés Ragone, Patricia Bonazzola, Arnaldo L. Bandoni, & Alicia E. Consolini.** (2018). Antitussive, antispasmodic, bronchodilating and cardiac inotropic effects of the essential oil from *Blepharocalyx salicifolius* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.013>
- Jones, C. G., Lawton, J. H., & Shachak, M.** (1994). Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, 69, 373–386.
- Jones, C. G., Lawton, J. H., & Shachak, M.** (1997). Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology*, 78, 1946–1957.
- Kalesnik, F., Valles, L., Quintana, R., & Aceñolaza, P.** (2008). Parches Relictuales de Selva en Galería (Monte Blanco) en la región del Bajo Delta del Río Paraná. In F. G. Aceñolaza (Ed.), *Temas de la Biodiversidad del Litoral Fluvial Argentino III* (pp. 169–191). Tucumán.
- Kandus, P.** (1997). *Análisis de patrones de vegetación a escala regional en el Bajo Delta del río Paraná (Argentina)* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Kandus, P., Minotti, P., & Malvarez, A. I.** (2008). Distribution of wetlands in Argentina estimated from soil charts. *Acta Scientiarum*, 30(4), 403–409.
- Kandus, P., Morandeira, N., & Schivo, F.** (Eds.). (2010). *Bienes y servicios ecosistémicos de los humedales del Delta del Paraná*. Fundación Humedales / Wetlands International.
- Kandus, P., Minotti, P., Morandeira, N., & Gayol, M.** (2019). *Inventario de humedales de la región del complejo fluvio-litoral del Bajo Paraná*. Programa Corredor Azul. Fundación Humedales / Wetlands International y Universidad Nacional de San Martín.
- Kaspari, M.** (2003). Introducción a la ecología de las hormigas. In F. Fernández (Ed.), *Introducción a las Hormigas de la región Neotropical* (pp. XXVI + 398). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Knudsen, J. T., Eriksson, R., Gershenzon, J., & Ståhl, B.** (2006). Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review*, 72(1), 1–120. [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2006\)72\[1:DADOFs\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2006)72[1:DADOFs]2.0.CO;2)
- Kusnezov, N.** (1963). Zoogeografía de las hormigas en Sudamérica. *Acta Zoológica Lilloana*, XIX, 25–186.
- Kremen, C., & Miles, A.** (2012). Ecosystem services in biologically diversified versus conventional farming systems: Benefits, externalities, and trade-offs. *Ecology and Society*, 17(40). <https://doi.org/10.5751/ES-05035-170440>

Krug, C. P. (2018). *Integridad ecológica de los humedales del Bajo Delta del Río Paraná bajo diferentes modalidades productivas* (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Kusnezov, N. (1964). Zoogeografía de las hormigas en Sudamérica. *Acta Zoologica Lilloana*, 19, 25–186.

Landis, D.A. (2020). *Arthropod Sampling in Agricultural Landscapes: Ecological Considerations*. In *Handbook of Sampling Methods for Arthropods in Agriculture*. 1st Edition. First Published 1993. Imprint CRC Press, p. 17.

LaPolla, J. S.; Dlussky, G. M.; Perrichot, V. (2013). Ants and the fossil record. *Annual Review of Entomology*, 58, 609–630.

Latrubesse, E. M.; Stevaux, J. C.; Sinha, R. (2005). Tropical Rivers. *Geomorphology*, 70(3), 187–206.

Lecuona, R.E.; Posadas, J.B.; Mini, J.I.; Gómez, D.G.; Martínez, F.G.; Maestro, M. (2015). Control microbiano de hormigas cortadoras por medio de hongos benéficos. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de la República Argentina (Senasa), ISSN: 2314-2901, sns N.º 7.

Lenoir, A.; Fresneau, D.; Errard, C.; Hefetz, A. (1999). Individuality and colonial identity in ants: the emergence of the social representation concept. In: Detrain, C.; Deneubourg, J.L.; Pasteels, J.M. (eds), *Information Processing in Social Insects*. Birkhäuser, Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8739-7_12.

Letourneau, D.K.; Armbrrecht, I.; Salguero Rivera, B.; Montoya Lerma, J.; Jiménez Carmona, E.; Daza, M.C., et al. (2011). Does plant diversity benefit agroecosystems? A synthetic review. *Ecological Applications*, 21(1), 9–21.

Levin, D.A. (1973). The role of trichomes in plant defense. *Quarterly Review of Biology*, 48(1), 3–15. <https://doi.org/10.1086/407484>.

Lewis, T.; Norton, G. A. (1973). Aerial baiting to control leaf-cutting ants (Formicidae, Attini) in Trinidad. III. Economic implications. *Bulletin of Entomological Research*, 63(2), 289–303.

Ley Nacional 25.080 de inversiones para bosques cultivados. República Argentina. <https://forestindustria.magyp.gob.ar/archivos/normativas/ley25080.pdf>

Ley Nacional 27.621. Para la implementación de la Educación Ambiental Integral en la República Argentina.
<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-27621-350594/texto>

Li, L.; Peng, H.; Kurths, J.; Yang, Y.; Schellnhuber, H.J. (2014). Chaos-order transition in foraging behavior of ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), 8392-8397. doi: 10.1073/pnas.1407083111.

Littledyke, M.; Cherrett, J. M. (1976). Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich)(Formicidae, Attini). *Bulletin of Entomological Research*, 66(2), 205–217.

Löfstedt, G.; Gilljam, J.; Leonel, J.; Cousins, I.T.; Benskin, J.P. (2016). Is ongoing sulfluramid use in South America a significant source of perfluorooctanesulfonate (PFOS)? Production inventories, environmental fate, and local occurrence. *Environmental Science & Technology*, 50, 653–659.

Loponte, D. M.; Acosta, A. A. (2013). La construcción de la unidad arqueológica Guaraní en el extremo meridional de su distribución geográfica. *Cuadernos del Instituto Nacional de Antropología y Pensamiento Latinoamericano*, 1, 193–235.

Lothrop, S. K. (1946). Indians of the Paraná Delta and La Plata Littoral. In *Handbook of South American Indians: The Marginal Tribes*, Vol. 1, edited by Steward, J.H. Smithsonian Institution. Bureau of American Ethnology. Bulletin 143. Washington: United States Government Printing Office.

Marinho, C.; Della Lucia, T.; Guedes, R. N.; Ribeiro, M.; Lima, E. (2005). β -eudesmol-induced aggression in the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 117, 89–93. doi: 10.1111/j.1570-7458.2005.00338.x.

Marsaro, A. L.; Souza, R. C.; Della Lucia, T. M.; Fernandes, J. B.; Silva, M. F.; Vieira, P. C. (2004). Behavioral changes in workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* induced by chemical components of *Eucalyptus maculata* leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 30(9), 1771-1780. doi: 10.1023/b:joec.0000042400.14451.08.

Martínez, G.; Audisio, C.; Luján, M. C. (2021). Las plantas medicinales, patrimonio natural y cultural de la Reserva Hídrica Natural y Recreativa Bamba, La Calera, Córdoba, Argentina. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 20(3), 270–302.
<https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.3.21>

Meyer, S.T.; Roces, F.; Wirth, R. (2006). Selecting the drought stressed: effects of plant stress on intraspecific and within-plant herbivory patterns of the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Functional Ecology*, 20, 973–981.

Mikheyev, A. S. (2008). History, genetics and pathology of a leaf-cutting ant introduction: a case study of the Guadeloupe invasion. *Biological Invasions*, 10, 467–473.

Ministerio del Interior, República Argentina. (n.d.). *Ecorregiones del Delta e Islas del Paraná*. Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/interior/ambiente/parquesnacionales/ecorregiones/delta-e-islas-del-parana>

Mitsch, W. J.; Gosselink, J. G. (2007). *Wetlands*, 4th ed. John Wiley & Sons, New York.

Montoya-Lerma, J.; Giraldo-Echeverri, C.; Armbrrecht, I.; Farji-Brener, A.; Calle, Z. (2012). Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *International Journal of Pest Management*, 58, 225–247.

Moutinho, P.; Nepstad, D.C.; Davidson, E.A. (2003). Influence of leaf-cutting ant nests on secondary forest growth and soil properties in Amazonia. *Ecology*, 84, 1265–1276.

Morandeira, N. S.; Kandus, P. (2017). Do taxonomic, phylogenetic and functional plant and diversity reflect environmental patterns in the Lower Paraná River floodplain? *Plant Ecology & Diversity*, 10(2-3), 153-165. <https://doi.org/10.1080/17550874.2017.1315838>

Moreira, X.; Nell, C. S.; Katsanis, A.; Rasmann, S.; Mooney, K. A. (2018). Herbivore specificity and the chemical basis of plant–plant communication in *Baccharis salicifolia* (Asteraceae). *New Phytologist*, 220(3), 703-713. doi: 10.1111/nph.14164.

Müller, C.; Riederer, M. (2005). Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 31(11), 2621-2651. doi: 10.1007/s10886-005-7617-7.

Nanni, S.; Piquer-Rodríguez, M.; Rodríguez, D.; Nuñez-Regueiro, M.; Periago, E.; Aguilar, S.; Ballari, S.; Blundo, C.; Derlindati, E.; Di Blanco, Y.; Eljall, A.; Grau, R.; Herrera, L.; Huertas Huerrera, A.; Izquierdo, A.; Lescano, J.; Macchi, L.; Mazzini, F.; Milkovic, M.; Monthti, L.; Paviolo, A.; Pereyra, M.; Quintana, R.; Quiroga, V.; Renison, D.; Santos Beade, M.; Scaaf, A.; Gasparri, I. (2020). Presiones sobre la conservación asociadas al uso de la tierra en las ecorregiones terrestres de la Argentina. *Ecología Austral*, 30, 304-320.

Nanni, A. S., Pérez, N. N., Quintana, R.Q., Sfara, V. (2022). How are arthropod communities structured in a modified wetland under different productive activities? *Acta Oecologica*, 117, 103851. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2022.103851>

Neiff, J. J., Iriondo, M. H., Carignan, R. (1994). Large tropical South American wetlands: an overview. En G.L. Link, R.J. Naiman (Eds.), *The Ecology and Management of Aquatic-terrestrial Ecotones* (pp. 156–165). University of Washington.

Nichols-Orians, C. M. (1991). Condensed tannins, attine ants, and the performance of a symbiotic fungus. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 1177–1195.

Nickele, M. A., Filho, W. R., de Oliveira, E. B., Iede, E. T., Caldato, N., Strapasson, P. (2012). Leaf-cutting ant attack in initial pine plantations and growth of defoliated plants. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 47(1), 892–899. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000700003>

North, R. D., Jackson, C. W., & Howse, P. E. (1999). Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus. *Physiological Entomology*, 24, 127e133.

Nuessly, G. S., Scully, B. T., Hentz, M. G., Beiriger, R., Snook, M. E., Widstrom, N. W. (2007). Resistance to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Euxesta stigmatias* (Diptera: Ulidiidae) in sweet corn derived from exogenous and endogenous genetic systems. *Journal of Economic Entomology*, 100, 1887–1895.

Núñez Bustos, E. O. (2014). Comparación de la fauna de mariposas diurnas (Papilionoidea & Hesperioidea) del delta bonaerense e Isla Martín García. *Fundación de Historia Natural Félix de Azara*, 246-256.

Nygaard, S., Hu, H., Li, C., Schiøtt, M., Chen, Z., Yang, Z., Xie, Q., Ma, C., Deng, Y., Dikow, R., Rabeling, C., Nash, D., Brady S., Schultz T.R., Zhang G., Boomsma J.J. (2016). Reciprocal genomic evolution in the ant–fungus agricultural symbiosis. *Nature Communications*, 7, 12233. <https://doi.org/10.1038/ncomms12233>

Oliveira, L. S., Pereira, L. G. R., Azevêdo, J. A. G., Pedreira, M. dos S., Loures, D. R. S., Bomfim, M. A. D., Barreiros, D. C., Brito, R. L. L. de. (2010). Nutritional characterization of co-product silages of pejibaye. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 11(2), 426-439.

OMS reunión sobre Promoción y Desarrollo de la Medicina Tradicional (1977: Ginebra) & World Health Organization. (1978). *Promoción y desarrollo de la medicina tradicional:*

Informe de una reunión de la OMS, [Ginebra, 28 de noviembre - 2 de diciembre de 1977]. Organización Mundial de la Salud. Recuperado de <https://iris.who.int/handle/10665/41183>

Ortiz, D. (2020). Habitar "la isla": paisaje, lugar e identidad en la Zona Núcleo Forestal del Delta del Río Paraná. Tesis de Maestría en Políticas Ambientales y Territoriales. Facultad de Filosofía y Letras, Universidad de Buenos Aires.

Paredes, C., Iannacone, J., Alvariño, L. (2019). Efecto subletal del fipronil en el desenvolvimiento de embriones de *Oncorhynchus mykiss* "trucha arco iris". *Biotempo*, 10, 9-14.

Peden-Adams, M. M., EuDaly, J. G., Dabra, S., EuDaly, A., Heesemann, L., Smythe, J., et al. (2007). Suppression of humoral immunity following exposure to the perfluorinated insecticide sulfluramid. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 70, 1130-1141.

Peixoto Batista, J., Godfrid, J., Stevenson, H. (2019). La difusión del concepto de servicios ecosistémicos en la Argentina: Alcances y resistencias. *Revista Sociedad Argentina de Análisis Político*, 13(2), 313-340.

Pereyra, A., González, A., Leiva, C., Sabarotz, P., Ventura, P. (2019). Fenómenos hidrometeorológicos en el bajo delta bonaerense: El riesgo de inundación desde la percepción de los pobladores isleños. XXI Jornadas de Geografía de la UNLP, Ensenada, Argentina, 9 al 11 de octubre de 2019. *Construyendo una Geografía Crítica y Transformadora: En defensa de la Ciencia y la Universidad Pública*.

Perri, D., Gorosito, N., Fernández, P., Buteler, M. (2017). Plant based compounds with potential as Push - Pull stimuli to manage behavior of leaf cutting ants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 163, 150-159.

Perri, D. "Evaluación de herramientas de manejo integrado de plagas para hormigas cortadoras de hojas en el bajo delta del Río Paraná". (2020). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Perri, D., Gorosito, N., Schilman, P., Casaubón, E., Dávila, C., Fernández, P. (2020). Push-pull to manage leaf-cutting ants: an effective strategy in forestry plantations. *Pest Management Science*, 77(1), 432-439.

Philippe, R. N. C., & Bohlmann, J. (2007). Poplar defense against insect herbivores. *Canadian Journal of Botany*, 85, 1111-1126. <https://doi.org/10.1139/B07-109>

Pinto-Tomás, A. A., Anderson, M. A., Suen, G., Stevenson, D. M., Chu, F. S., Cleland, W. W., Weimer, P. J., Currie, C. R. (2009). Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science*, 326(5956), 1120–1123.

Pizarro, C. A., Straccia, P. H. (2018). “Isleños” y “ambientalistas”. Confrontaciones sobre la sustentabilidad de la producción forestal en los humedales del Delta del Paraná (2012-2013). En R. Benencia (Ed.), *Ruralidades, actividades económicas y mercados de trabajo en el Delta vecino a la Región Metropolitana de Buenos Aires*. Fundación CICCUS.

Plan estratégico forestal y foresto industrial Argentina 2030. (2019). Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Educación, Presidencia de la Nación. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/04/plan_estrategico_foresto_industrial_2030.pdf

Plan integral estratégico para la conservación y aprovechamiento sostenible en el Delta del Paraná (PIECAS-DP). (2008). Jefatura de Gabinete de Ministros, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Subsecretaría de Planificación y Política Ambiental, Dirección Nacional de Ordenamiento Ambiental y Conservación de la Biodiversidad.

Powell, R. J., Stradling, D. J. (1986). Factors influencing the growth of *Attamyces bromatificus*, a symbiont of attine ants. *Transactions of the British Mycological Society*, 87, 205–213. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80022-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80022-5)

Quinlan, R. J., Cherrett, J. N. (1979). The role fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological Entomology*, 4, 151-160.

Quintana, R. D., Bó, R. F. (2011). ¿Por qué el Delta del Paraná es una región única en la Argentina? El Patrimonio natural y cultural del Bajo Delta Insular. *Bases para su conservación y uso sustentable* (pp. 42-53). Buenos Aires.

Quintana, R. D., Bó, R. F. (2013). Humedales del complejo litoral del Paraná Inferior. En L. Benzaquén, D. E. Blanco, R. F. Bó, P. Kandus, G. F. Lingua, P. Minotti, R. D. Quintana, S. Sverlij, L. Vidal (Eds.), *Inventario de los humedales de Argentina: Sistemas de paisajes de humedales del Corredor Fluvial Paraná-Paraguay* (pp. 263-270). Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación.

Quintana, R. D., Bó, R. F., Astrada, E., Reeves, C. (2014). Lineamientos para una ganadería ambientalmente sustentable en el Delta del Paraná. Fundación Humedales / Wetlands International LAC. Buenos Aires, Argentina.

Ramsar. (n.d.). Servicio de información sobre Sitios Ramsar. Recuperado de https://rsis.ramsar.org/ris-search?page=1&solrsort=officialname_ssort%20asc&language=es&f%5B0%5D=regionCountry_es_ss%3AArgentina&pagetab=0

Redacción. (28/09/2021). El centro de salud que combina la medicina occidental con la mapuche abrirá en octubre. *Rio Negro*. Recuperado de <https://www.rionegro.com.ar/el-centro-de-salud-que-combina-la-medicina-occidental-con-la-mapuche-abrira-en-octubre-1977015/>

Reggio, P., Manzione, M., & Sagrista, H. (2021). *Guardianes del Delta: Guía visual para la identificación de especies del Delta del Paraná*. Programa Faros de conservación. Dirección Nacional de Conservación. Administración de Parques Nacionales. Contenidos: Programa de Interpretación del Patrimonio.

Ridley, P., Howse, P. E., & Jackson, C. W. (1996). Control of the behaviour of leaf cutting ants by their 'symbiotic' fungus. *Experientia*, 52, 631e635.

Roberts, M. R., & Paul, N. D. (2006). Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens. *New Phytologist*, 170, 677–699.

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

Roces, F. (1994). Cooperation or individualism: how leaf-cutting ants decide on the size of their loads. *Trends in Ecology & Evolution*, 9, 230.

Roces, F., Kleineidam, C. Humidity preference for fungus culturing by workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Insectes Soc.* 47, 348–350 (2000). <https://doi.org/10.1007/PL00001728>

Rockwood, L.L. (1973), The Effect of Defoliation on Seed Production of Six Costa Rican Tree Species. *Ecology*, 54: 1363-1369. <https://doi.org/10.2307/1934199a>

Roncarolo, L. (28/05/2022 - Actualizado 29/05/2022). El centro de salud mapuche que atiende a todos en Bariloche. *Diario Rio Negro*. <https://www.rionegro.com.ar/sociedad/el-centro-de-salud-mapuche-de-bariloche-que-atien-de-a-todos-2320329/>

Ronhede S., Boomsma J.J., Rosendahl, S. (2004). Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. *Mycological Research*.

- Rompato, K.M., Franco, R.R., Somoza S.N., Rompato L.S.** (2015). Composición nutricional de frutos de *Syagrus Romanzoffiana* (Pindó) Nativos de Formosa-Argentina. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 33, n. 2, jul./dez. 2015
- Root, R.** (1973). Organization of a plant–arthropod association in simple and diverse habitats. The fauna of collards. *Ecological Monographs*, 43, 95–124.
- Sabattini, J.A.** (2017). Impacto de hormigas cortadoras de hojas en ecosistemas implantados de Sudamérica. *Universidad Nacional del Nordeste*. Especialización en manejo de recursos forestales. Facultad de Ciencias Agrarias. Trabajo Final Integrador.
- Salvia, M.** 2010. Porte de la teledetección al estudio del funcionamiento del macrosistema Delta del Paraná: análisis de series de tiempo y eventos extremos. *Tesis doctoral*. Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Sánchez-Restrepo, A.F., Jiménez, N.L., Confalonieri, V.A., & Calcaterra, L.A.** (2019). Distribution and diversity of leaf-cutting ants in Northeastern Argentina: species most associated with forest plantations. *International Journal of Pest Management*, 1–14. doi:10.1080/09670874.2018.1555343
- Sánchez-Restrepo, A.F., Confalonieri, V.A., & Calcaterra, L.A.** (2023). The origin and spread of the southern black ant, a widely distributed leaf-cutting ant. *Journal of Biogeography*, 50, 1519–1532. <https://doi.org/10.1111/jbi.14685>
- 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. *Anim Behav* 79:689–698. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.12.021>
- Saverschek, N., Roces, F.** (2011). Foraging leafcutter ants: Olfactory memory underlies delayed avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus. *Anim. Behav.* 82, 453–458. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.05.015>
- Scalbert, A.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875–3883.
- Schiestl, F.P., Johnson, S.D.** (2013). Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(5), 307–315. doi: 10.1016/j.tree.2013.01.019
- Schnitzler, J.P., Louis, S., Behnke, K., Loivamäki, M.** (2010). Poplar volatiles - biosynthesis, regulation and (eco)physiology of isoprene and stress-induced isoprenoids. *Plant Biology*, 12, 302–316. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00284.x

Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A., Dicke, M. (2005). *Insect-Plant Biology*. Oxford University Press, Oxford, UK, 400 p.

Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A. (2002). An inventory of taste in caterpillars: each species its own key. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 48(Suppl 1), 215–63.

Scott JJ, Budsberg KJ, Suen G, Wixon DL, Balser TC, Currie CR (2010) Microbial Community Structure of Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens and Refuse Dumps. *PLoS ONE* 5(3): e9922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009922>

Skalicka-Wozniak K, Los R, Glowinski K, Malm A. Comparison of hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction techniques for antibacterial volatile compounds from the fruits of *Seseli libanotis*. *Nat Prod Commun*. 2010 Sep;5(9):1427-30. PMID: 20923002.

Shaw, S.P., Fredine, C.G. (1956). Wetlands of the United States: Their extent and values to Waterfowl and other wildlife. Washington D.C. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Office of River Basin Studies. Circular 39.

Sica, Y.V., Quintana, R.D., Radeloff, V.C., Gavier-Pizarro, G.I. (2016). Wetland loss due to land use change in the Lower Paraná River Delta, Argentina, *Science of The Total Environment*, Volume 568, 2016, Pages 967-978, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.200>

Signorelli, A., Battistella, A. (2013). Continuando un largo camino de apoyo del estado al sector forestal. *Producción Forestal*, Año N°3, Revista N°6, Agosto 2013, Argentina. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Presidencia de la Nación.

Silva, A., Bacci, M. Jr, Gomes de Siqueira, C., Correa Bueno, O., Pagnocca, F.C., Aparecida Hebling, M.J. (2003). Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *J Insect Physiol*. 49(4):307-13. doi: 10.1016/s0022-1910(03)00004-0. PMID: 12769984

Silva, A., Bacci, M. Jr, Pagnocca, F.C., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A. (2006). Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Microbiol Res* 161:299–303

Silva-Pinhati, A.C.O., Bacci, M. Jr, Hinkle, G., Sogin, M.L., Pagnocca, F.C., Martins, V.G., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A. (2004). Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). *Braz J Med Biol Res* 37:1463–1472

Silva-Pinhati, A.C.O., Bacci Jr, M., Siqueira, C.G., Silva, A., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A. (2005). Isolation and maintenance of symbiotic fungi of ants in the tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop Entomol* 34:1–5

Singh, S., Kaur, I., Kariya, R. (2022). The Multifunctional Roles of Polyphenols in Plant-Herbivore Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 22(3), 1442

Sverlij, S., Liotta, P., Minotti, F., Brancolini, C., Baigún, F., Firpo Lacoste. (2013). Los Peces del Corredor fluvial Paraná-Paraguay. En: *Inventario de los Humedales de Argentina*. Benzaquen, L., Blanco, D., Bo, R., Kandus, P., Lingua, G., Minotti, P., Quintana, R., Sverlij, S., Vidal, L. Eds. ISBN 978-987-29340-0-2

Smith, E.J., Vizueta, J., Younger, M.A., Mullen, S.P., Traniello, J.F.A. (2023). Dietary diversity, sociality, and the evolution of ant gustation. *Front. Ecol. Evol.* 11:1175719. doi:10.3389/fevo.2023.1175719

Southwood, T.R.E. (1986). Plant surfaces and insects—an overview. In *Insects and the plant surface* (ed. B. Juniper and T.R.E. Southwood), pp. 1–22. E. Arnold, London

Stahel, G. (1943). The fungus gardens of the leaf-cutting ants. *J. New York Botanical Garden* 44, 245–253

Straccia, P.H., Pizarro, C.A. Controversias acerca del concepto servicios ecosistémicos: resignificaciones sobre el impacto de la forestación en los humedales del delta inferior del río Paraná. *Agronomía & Ambiente*, 37(2), 99-113

Stroud, E.A., Jayaraman, J., Templeton, M.D., Rikkerink, E.H. (2022). Comparison of the pathway structures influencing the temporal response of salicylate and jasmonate defence hormones in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 13. doi: 10.3389/fpls.2022.952301

Swift, M.J., Izac, A.-M.N., van Noordwijk, M. (2004). Biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes—are we asking the right questions? *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 104, p.113–134

Tabakian, G. (2019). Estudio comparativo de plantas medicinales vinculadas a tradiciones indígenas y europeas en Uruguay. *Bonplandia*, 28(2), 135-158. <https://dx.doi.org/10.30972/bon.2823855>

Tabakian, G. (2024). Etnobotánica médica en Artigas, Uruguay. *Bonplandia*, 33(1): 5-33. doi: <https://doi.org/10.30972/bon.3316980>

Tablero de plantaciones forestales. Ministerio de Economía. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2023). <https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/desarrollo-foresto-industrial/inventarios/tablero.php>

Tingle, C.C., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, D. and King, W. (2003). Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 176, 1–66.

Turlings, T.C., & Tumlinson, J.H. (1992). Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89(17), 8399-8402. doi: 10.1073/pnas.89.17.8399.

Van Soest, P.J. (1963). The use of detergents in the analysis of fibrous feeds: II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Official Agriculture Chemistry*, 46, 829.

Vasconcelos, H., & Cherrett, M. (1995). Changes in leaf-cutting ant populations (Formicidae: Attini) after the clearing of mature forest in Brazilian Amazonia. *Stud. Neotrop. Faun. Environ.*, 30, 107-113.

Vasconcelos, H., & Cherrett, J. (1997). Leaf-cutting ants and early forest regeneration in central Amazonia: Effects of herbivory on tree seedling establishment. *Journal of Tropical Ecology*, 13, 357-370. doi: 10.1017/S0266467400010567.

Vergara Castrillón, J.C. (2005). *Biología, manejo y control de la hormiga arriera*. Gobernación Valle del Cauca, Secretaría de Agricultura y Pesca del Valle del Cauca, Santiago de Cali, Colombia.

Villard, C., Larbat, R., Munakata, R., & Hehn, A. (2019). Defence mechanisms of *Ficus*: pyramiding strategies to cope with pests and pathogens. *Planta*, 249, 617. doi: 10.1007/s00425-019-03098-2.

Vivianco, L., & Austin, A. (2008). Tree species identity alters forest litter decomposition through long-term plant and soil interactions in Patagonia, Argentina. *J. of Ecology*, 96(4), 727-736.

Wagner, G.J. (1991). Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiol.*, 96, 675–679. doi: 10.1104/pp.96.3.675.

War, A.R., Sharma, H.C., Paulraj, M.G., War, M.Y., & Ignacimuthu, S. (2011). Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management. *Plant Signal Behav.*, 6(12), 1973-1978. doi: 10.4161/psb.6.12.18053. PMID: 22105032; PMCID: PMC3337190.

War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H.C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav.*, 7(10), 1306-1320. doi: 10.4161/psb.21663. Epub 2012 Aug 20. PMID: 22895106; PMCID: PMC3493419.

Wetterer, J.K. (2006). The vanished plague ants (Hymenoptera: Formicidae) of 19th century Bermuda. *Myrmecologische Nachrichten*, 219–224.

Wheeler, W.M. (1911). The ant-colony as an organism. *Journal of Morphology*, 22, 307–325.

Wheeler, W.M. (1926). The natural history of ants. From an unpublished manuscript in the archives of the Academy of Sciences of Paris by René Antoine Ferchault de Réaumur. Translated and annotated by William Morton Wheeler. A. Knopf, New York, 280 pp.

Wirth, R., Herz, R., Ryel, R.J., Beyschlag, W., & Hölldobler, B. (2003). Herbivory of leaf-cutting ants: a case study on *Atta colombica* in the tropical rainforest of Panama. Springer Verlag, Berlin, 230 pp.

Anexo

Tabla A.1: Humedales de Importancia Internacional o Sitios Ramsar en la República Argentina.

Sitio	Fecha de designación	Hectáreas (ha)	Tipo
Bahía de Samborombóm	24-1-1997	243,965 ha	Marino o costero / Artificial / Continental
Bañados del río dulce y laguna de Mar chiquita	28-05-2002	996,000 ha	Continental
Delta del Paraná	03-10-2015	243,126 ha	Continental
GLACIAR VINCIGUERRA Y TURBERAS ASOCIADAS	16-09-2009	2,760 ha	Continental
HUMEDALES CHACO	02-02-2004	508,000 ha	Artificial / Continental
HUMEDALES DE PENÍNSULA VALDÉS	20-07-2012	42,695 ha	Marino o costero

HUMEDAL LAGUNA MELINCÚE	24-07-2008	92,000 ha	Continental
JAAUKANIGÁS	10-10-2001	492,000 ha	Continental
LAGUNA BLANCA	04-05-1992	11,250 ha	Continental
LAGUNA DE LLANCANELO	08-11-1995	91,365 ha	Continental
LAGUNA DE LOS POZUELOS	04-05-1992	16,224 ha	Artificial
LAGUNAS ALTOANDINAS Y PUNEÑAS DE CATAMARCA	02-02-2009	1,228,175 ha	Continental
LAGUNAS DE GUANACACHE, DESAGUADERO Y DEL BEBEDERO	14-12-1999	962,370 ha	Continental /Artificial
LAGUNAS DE VILAMA	20-09-2000	157,000 ha	Continental
LAGUNAS Y ESTEROS DEL IBERÁ	18-01-2002	24,550 ha	Continental

PALMAR YATAY	06-05-2011	21,450 ha	Continental
PARQUE NACIONAL CIERVO DE LOS PANTANOS	22-03-2008	5,561 ha	Continental / Artificial
PARQUE NACIONAL RÍO PILCOMAYO	04-05-1992	51,889 ha	Continental
PARQUE PROVINCIAL EL TROMEN	02-02-2006	30,000 ha	Continental
RESERVA COSTA ATLÁNTICA DE TIERRA DEL FUEGO	13-09-1995	28,600 ha	Marino o costero/ Continental Artificial
RESERVA ECOLÓGICA COSTANERA SUR	22-03-2005	353 ha	Marino o costero / Continental
RESERVA NATURAL VILLAVICENCIO	27-12-2017	62,244 ha	Continental
RESERVA PROVINCIAL LAGUNA BRAVA	02-02-2003	405,000 ha	Continental

Tabla A.2: Ecorregión del Delta e Islas del Paraná (Tomado del Min. Interior de la República Argentina).

Ecorregión	HA Totales	% Del país	# Áreas protegidas	HA Protegidas	% Protegido
Delta e Islas del Paraná	5.625.406	0,14%	3	11.904	0,21%

Áreas protegidas Parque Nacional Ciervo de los Pantanos - Parque Nacional Pre-Delta - Parque Nacional Islas de Santa Fe

Ecorregión	Instrumento	Área Protegida	Denominación	Fecha	HA
Delta e Islas del Paraná	CREACIÓN Ley Nacional Nro. 27.456/2018	Parque Nacional Ciervo de los Pantanos	Parque Nacional Ciervo de los Pantanos	2018	5.200
Delta e Islas del Paraná	CREACIÓN Ley 27456	Parque Nacional Ciervo de los Pantanos	Reserva Nacional Paraná de las Palmas	2018	-
Delta e Islas del Paraná	CREACIÓN Ley 27456	Parque Nacional Ciervo de los Pantanos	Reserva Nacional Islas Campana	2018	-
Delta e Islas del Paraná	CREACIÓN Ley Nacional N° 24.063/92	Parque Nacional Pre-Delta	Parque Nacional Pre-delta	13/01/1992	2.608
Delta e Islas del Paraná	CREACIÓN Ley Nacional N° 26.648/10	Parque Nacional Islas de Santa Fe	Parque Nacional Islas de Santa Fé	2010	4.096

Sitios arqueológicos en el Paraná (*Figura 8.7*). En el Bajo Delta del Paraná los sitios corresponden a las etnias Guaraníes y Goya-Malabrigo. Éstas últimas también se conocen genéricamente como chaná-timbú que, a su vez, engloban a timbú, chaná, mbeguá, caracaraes, corondás, colastinés, quiloazas, entre otros (Bonomo et al., 2011 y Bonomo et al., 2019).

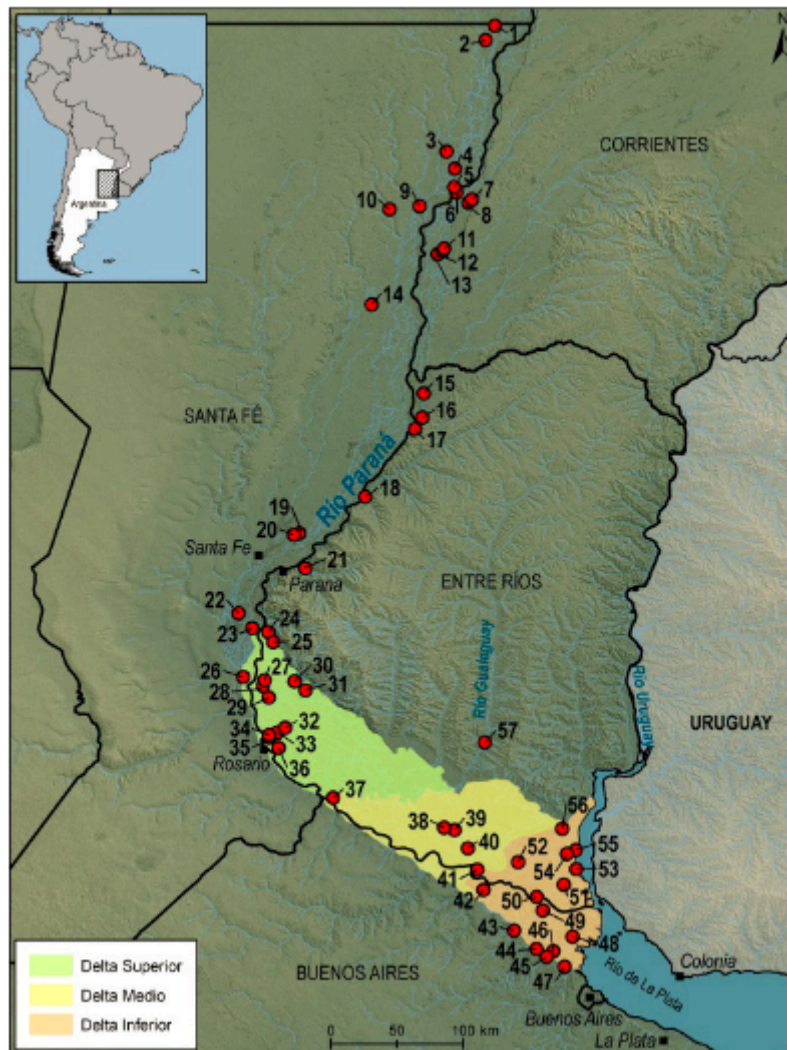


Figura A.1: Principales sitios arqueológicos de la zona del Delta del Paraná. Imagen tomada de Bonomo et al., 2019. La falta de sitios en el Delta Medio refieren a diferencias en los esfuerzos de excavación (Bonomo et al., 2011).

Tabla A.3: Especies vegetales nativas de la zona del Bajo Delta del Paraná (Alonso y Desmarchelier, 2015, Fracassi et al., 2014, Rompato et al., 2015).

Nombre científico	Nombre común	Distribución	Tipo	Crecimiento	Usos
-------------------	--------------	--------------	------	-------------	------

<i>Acacia caven</i>	Espinillo Aromito, espinillo, aromo, aromito, espinillo negro, espinillo Santa Fe, espinillo de bañado, churqui, caven	Mayormente en Predelta y norte del Delta Antiguo	Árbol o arbusto	Caduca	Apícola, medicinal
<i>Aeschynomene montevidensis</i>	Algodonillo	Mayor frecuencia en Delta Antiguo y Bajo Delta	Arbusto	Perenne	Apícola
<i>Allophylus edulis</i>	Chal Chal	Totalidad	Árbol	Perenne	Apícola, ornamental, carbón, comestible
<i>Althernant heraphiloxeroides</i>	Lagunilla	Totalidad	Hierba	Perenne	Apícola
<i>Aspilia silphioides</i>	Margarita de campo	Totalidad. Mayor abundancia en Delta antiguo	Hierba	Perenne	Apícola
<i>Baccharis spp.</i>	Chilca, carqueja, carquejilla,	Totalidad, prevaleciendo una	Hierbas o arbustos	Perennes	Apícola, elaboración de

	chirca melosa (Paraguay), carqueja crespa (Uruguay).	especie sobre otra según la región			cerveza (reemplazo del lúpulo) y hojas como jabón para lavado de ropa.
<i>Bidens laevis</i>	Amor seco	Delta antiguo y Bajo Delta	Hierba	Anual	Alimentación (humana), apícola, forrajera de aves y conejos, medicinal, fermentación de bebidas alcohólicas
<i>Blepharoc alyx Salicifolius</i>	Anacahuita , horco molle, palo barroso (Argentina) ,arrayán, arrayán de las islas (Uruguay). murto, muerta, camboím,	Bajo Delta y Martín García	Árbol	Perenne	Apícola, ornamental, medicinal

	guabirona, batinga (Brasil).				
<i>Cephalanthus glabratus</i>	Sarandí colorado		Arbusto	Caduca	Medicinal
<i>Citharexylum montevidense</i>	Espina bañado Taruma, Sarandí colorado		Árbol	Perenne	Ornamental
<i>Cleome spp.</i>	Flor hedionda	Delta antiguo y Bajo Delta	Hierbas/subarbo- stos	Caduca/Perenne	Apícola
<i>Cortaderia selloana</i>	Cortadera Plumacho	Predelta y Bajo Delta	Hierba	Perenne	Apícola
<i>Daphnopsis racemosa</i>	Envira		Arbusto	Perenne	Corteza para atar calzado, cuchillos y puntas de flecha
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	Cucharero	Delta antiguo y Bajo Delta	Hierba	Perenne	Apícola
<i>Eichhornia crassipes</i>	Camalote Aguapáy	Totalidad	Hierba	Perenne	Apícola, biorremediación, forrajera,

					compos t, medicin al, refresca nte
<i>Erythrina crista-galli</i>	Seibo, Ceibo, Zuinandí	Predelta y Bajo Delta hacia Río de la Plata (1ra y 2da sección de islas)	Árbol	Caduca	Apícola, medicin al, madera liviana, orname ntal, tintura textil
<i>Ludwigia elegans</i>	Duraznillo de agua Verdolaga	Totalidad	Hierba	Perenne	Apícola
<i>Mikania spp.</i>	Guaco	Totalidad	Enredad era	Perenne	Apícola, medicin al
<i>Mimosa pigra</i>	Carpincher a	Totalidad, especialmen te en Delta antiguo	Arbusto	Perenne	Apícola, orname ntal
<i>Myrsine laetevirens</i>	Canelón		Árbol	Perenne	Madera amarille nta.
<i>Ocotea acutifolia</i>	Laurel criollo		Árbol	Perenne	Orname ntal, carpinte

					ría y muebler ía, aceites esencial es
<i>Oxalis sp.</i>	Oxális Vinagrillo	Bajo Delta	Hierba	Perenne	Apícola
<i>Pluchea sagittalis</i>	Lucera	Totalidad. Particularm ente Delta antiguo	Hierba	Perenne	Apícola, licos aperitivo ,medicin al
<i>Polygonun spp.</i>	Caá-tay	Totalidad, abundantes en Delta antiguo	Hierbas	Perennes	Apícola
<i>Pontederia lanceolata</i>	Camalote	Totalidad	Hierba	Perenne	Apícola
<i>Pouteria salicifolia</i>	Matajojo		Árbol	Perenne	Madera dura
<i>Prosopis sp.</i>	Algarrobo	Predelta y Bajo Delta	Árbol	Perenne	Apícola, aliment ación (human a y de ganado), bebidas, medicin al, leña, carbón, muebler

					ía, estabiliz ación de suelos, orname ntal, fijación de nitrógen o
<i>Sagittaria montevide nsis</i>	Saeta Pata de loro	Totalidad	Hierba	Perenne	Apícola
<i>Salix humboldt ana</i>	Sauce	Totalidad	Árbol	Caduca	Apícola, madera, medicin al.
<i>Sapium haematos permum</i>	Curupí		Árbol	Perenne	Madera fácil de tallar en carpinte ría y muebler ía
<i>Scutia buxifolia</i>	Coronillo		Árbol	Perenne	Orname ntal, madera para postes y leña, oviposici ón de maripos a

					Morpho ephistro phus
<i>Sebastiania brasiliensis</i>	Blanquillo, lecherón, blanquillo, árbol de leche, palo de leche, leche leche, mata ura		Árbol	Perenne	Medicin al
<i>Senecio bonariensis</i>	Margarita de bañado	Totalidad	Hierba	Perenne	Apícola
<i>Senna corymbosa</i>	Sen del campo, Rama negra		Arbusto	Perenne	Apícola, medicin al, orname ntal
<i>Sesbania punicea</i>	Acacia mansa Seibillo	Totalidad	Árbol	Perenne	Apícola, orname ntal
<i>Solidago chilensis</i>	Vara de oro, vara de oro, vara amarilla, vara de San José, romerillo amarillo, romerillo dorado, penachillo,	Bajo Delta	Hierba	Perenne	Apícola, medicin al

	punta de lanza, saucillo, yerba de los indios, yerba lanceta				
<i>Syagrus romanzoffi ana</i>	Pindó		Palmera	Perenne	Orname ntal, aliment ación humana (fruto) y de ganado
<i>Terminalia australis</i>	Palo amarillo		Árbol	Caduca	Madera, medicin al
<i>Tessaria intergrifoli a</i>	Aliso de río	Totalidad. Mayormente en islas del Delta antiguo	Árbol	Perenne	Apícola
<i>Verbena bonariensi s</i>	Verbena	Totalidad	Hierba	Perenne	Apícola

Control de discos

Al comparar el diámetro de los discos de Anacahuita y Sen del Campo generados por la perforadora (Figura 2) se analizaron con una prueba de T y resultaron en un $p= 0,2230$, ns. Por otro lado, al comprar el diámetro de la perforadora con una prueba de T se obtuvo un

p valor= 0,1056, ns. Por lo tanto, podemos asumir que los discos utilizados para los experimentos son equivalentes en su diámetro para ambas especies analizadas.

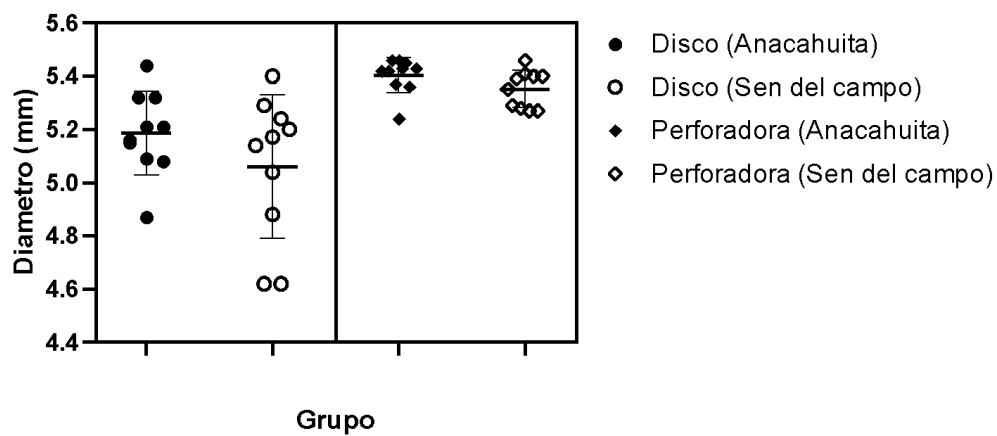


Figura A.2: Diámetro medidos en milímetros para las aberturas izquierda y derecha de una perforadora pequeña y los discos generados por ésta.

Se obtuvo la diferencia en módulo del porcentaje de consumo de hojas frescas de una misma especie contrastadas entre sí de manera dual. No se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados (Contraste de Friedman post ANOVA). Por lo tanto, se utilizó el promedio de las 6 colonias evaluadas (11,87) como la diferencia promedio esperada para un contraste al azar entre dos especies, es decir, un empate con puntajes 0,5 a cada especie.

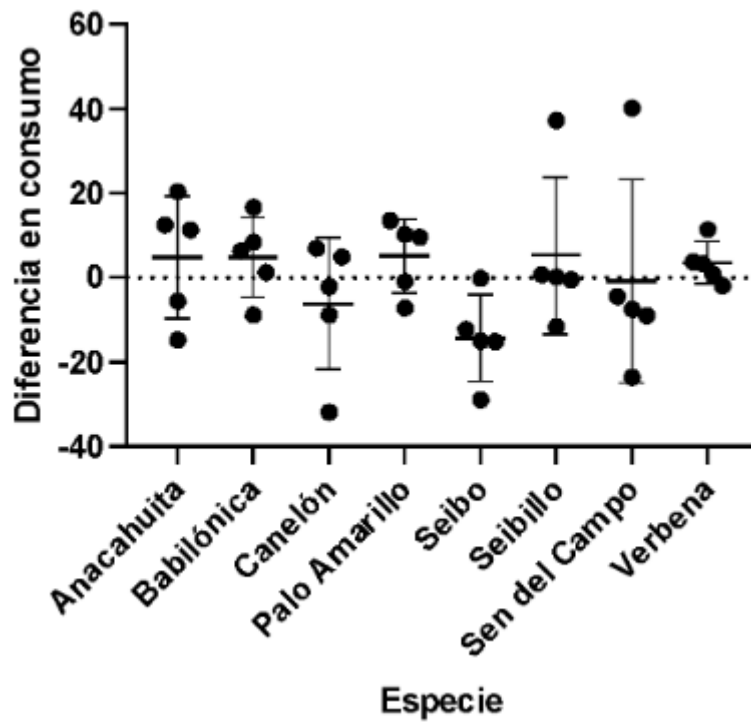


Figura A.3: Control de la preferencia para la jerarquía en el consumo de hojas de especies de plantas nativas. Presentaciones duales de hojas de una misma especie en 6 colonias.

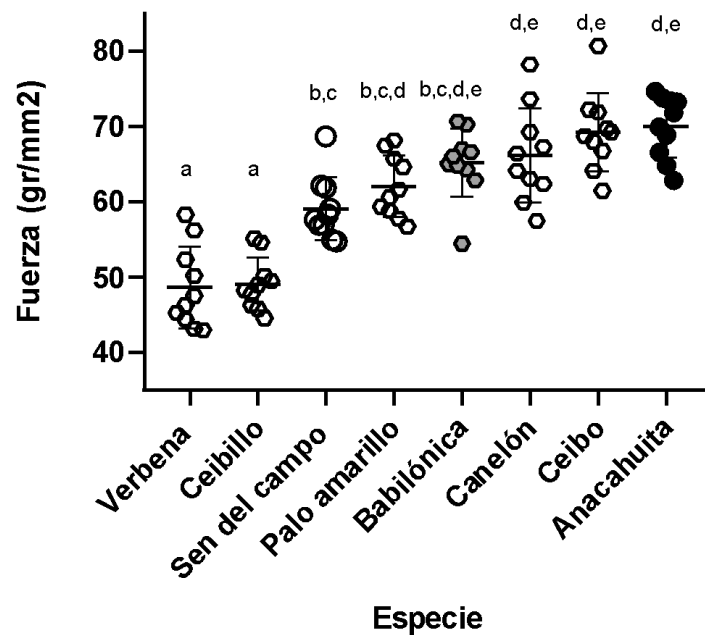
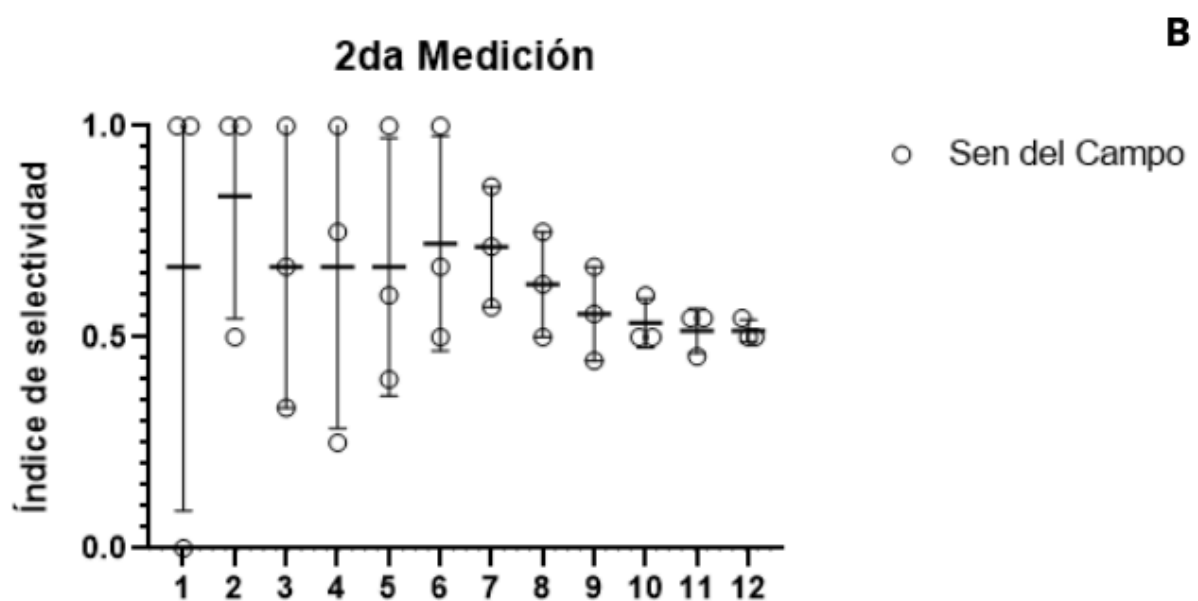
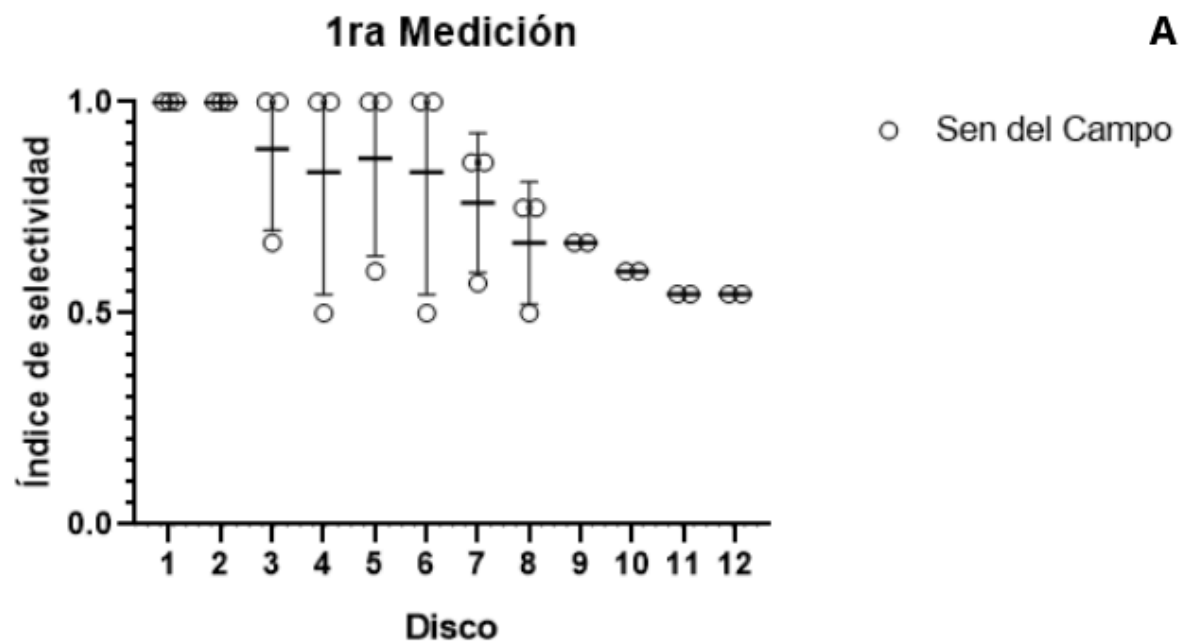
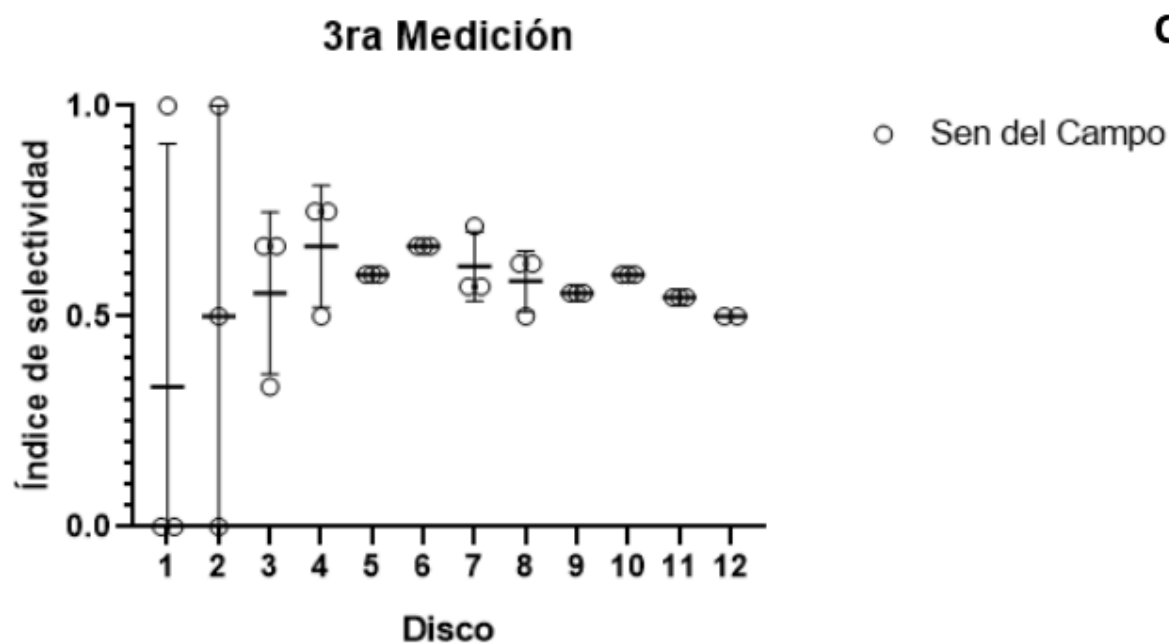
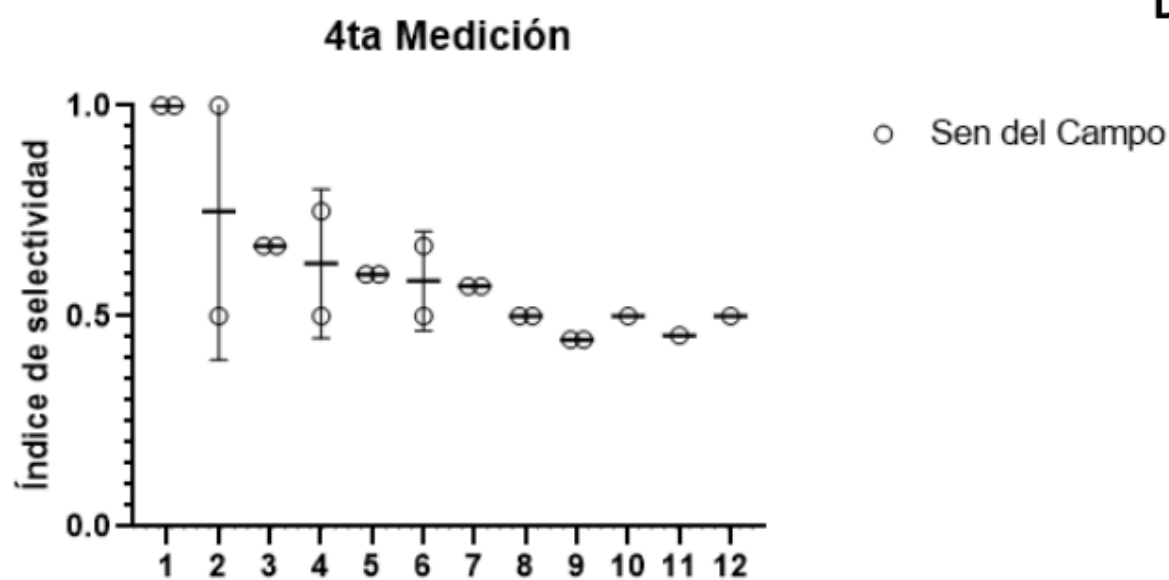


Figura A.4: Fuerza, medida como gr/mm2, en función las especies Verbena, Seibillo, Sen del campo (círculos blancos), Palo amarillo, Sauce americano,

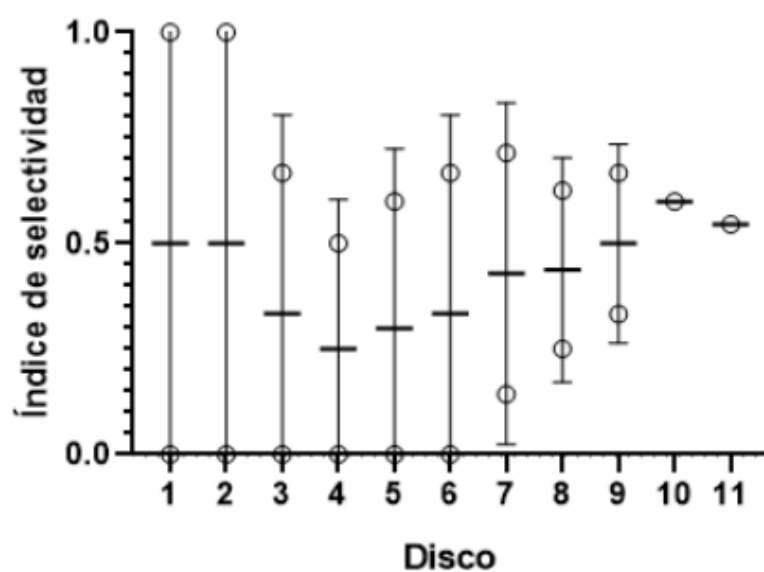
Canel'on, Ceibo y Anacahuita (círculos negros). $F=31,26$; $p\text{valor}<0,0001$. Se cumple con los supuestos: evaluación de Normalidad, Brown-Forsythe y Bartlett.



C**D**

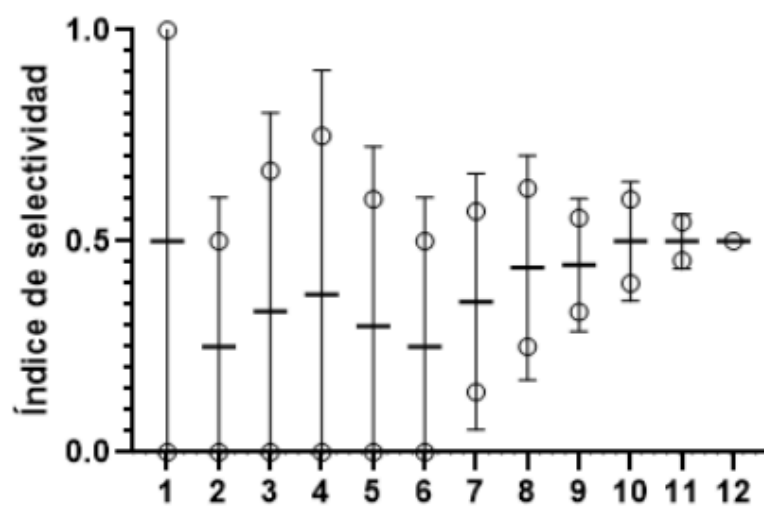
5ta Medición

E



6ta Medición

F



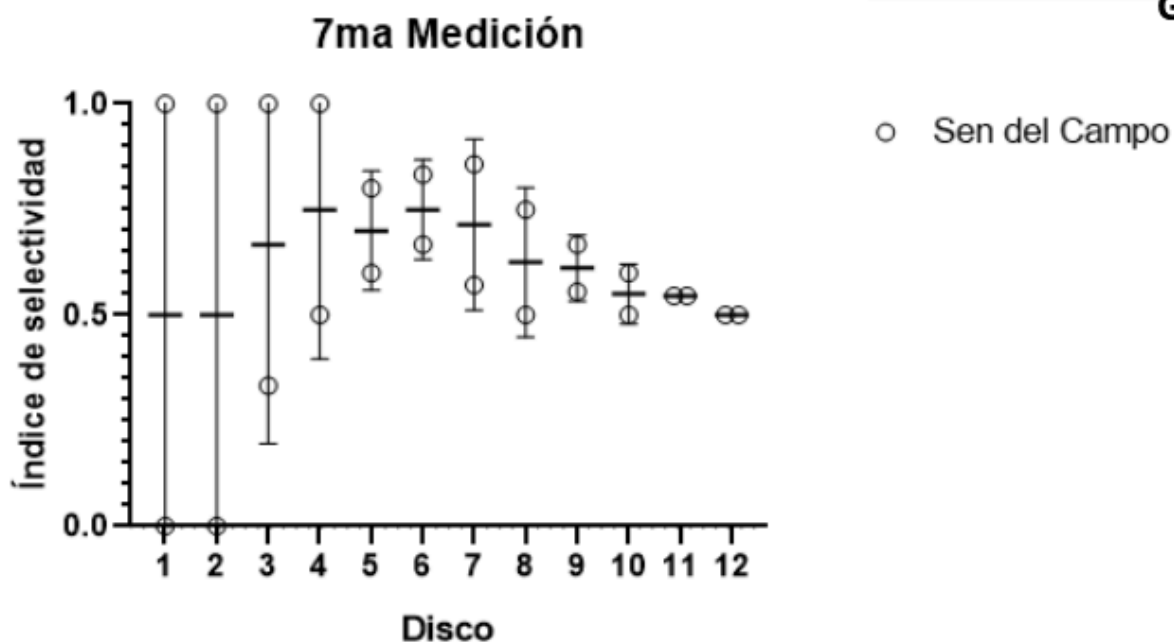


Figura A.5: Índice de selectividad calculado en base a la ecuación 1 (capítulo 3) en función de los discos recolectados de Sen del campo y Anacahuíta: A) 1era medición (inicial); B) 2da medición (1era etapa de alimentación con Anacahuíta); C) 3ra medición (2da etapa de alimentación con Anacahuíta); D) 4ta medición (final luego de exposición a Anacahuíta); E) 5ta medición (1era etapa de alimentación con Sen del campo); F) 6ta medición (2da etapa de alimentación con Sen del campo); G) 7ma medición (final luego de exposición a Sen del campo).

Ayelén Nally

Fernando Locatelli

Patricia Fernández