



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**Ritmos de actividad en hormigas  
cortadoras de hojas *Acromyrmex  
lundii*: efecto del fotoperiodo y ciclo  
térmico en su variación anual**

Guillermo KATZENSTEIN ALONSO

Magíster en Ciencias Agrarias  
opción Ciencias Vegetales

Julio 2021

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Dra Verónica Valentinuzzi (Presidente), Dra Juliane Lopes (Vocal), y Dra Mariane Nickele (Vocal), el 26 de agosto de 2021. Autor: Ing. Agr. Guillermo Katzenstein Alonso. Director Dr. Martín Bollazzi Sosa, Co-director Dr. Gonzalo Martínez Crosa.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor Martín Bollazzi por ser un gran director y sobretodo excelente persona.

A mi Co-director Gonzalo Martínez por estar siempre a disposición.

A Daniela Römer por enseñarme a utilizar el software estadístico ActogramJ y el SigmaPlot, así como analizar los datos de actividad de los monitores.

A Danila Balbi por la colaboración en el cuidado de las colonias de laboratorio y el armado de los monitores de actividad y los mates.

A Julián Sabattini por el apoyo brindado, las salidas de campo y la amistad generada.

A toda la cátedra de entomología, por el gran ambiente de trabajo y compañerismo.

A mi esposa Vanessa y a nuestros gatos Tita y Pepe. A mi familia y amigos.

## TABLA DE CONTENIDO

	página
<b>PÁGINA DE APROBACIÓN.....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VI</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 LA FORESTACIÓN Y LAS HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 PROBLEMÁTICA DE ESTUDIO, UN CONTROL INEFICAZ.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 ¿CÓMO INCREMENTAR LA EFICACIA DEL CONTROL DE HCH?.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 RITMOS BIOLÓGICOS Y CICLOS AMBIENTALES.....</b>	<b>5</b>
<b>1.5 FACTORES ENDÓGENOS Y EXÓGENOS EN LA REGULACIÓN DE LOS PATRONES DE FORRAJEO EN INSECTOS SOCIALES.....</b>	<b>6</b>
<b>1.5.1 <u>Factores endógenos y patrones de forrajeo en HCH</u>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.5.2 <u>Factores exógenos y patrones de forrajeo en HCH</u>.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5.2.1 Ritmos anuales de actividad.....</b>	<b>9</b>
<b>1.5.2.2 Ritmos diarios de actividad.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.2.3 Temperatura y humedad relativa.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5.2.4 Fotoperiodo.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5.3 <u>¿Existe un factor regulador superior?</u>.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>

1.7 OBJETIVOS.....	14
1.7.1 <u>Objetivo general</u> .....	14
1.7.1.1 Objetivos específicos.....	14
<b>2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....	16
2.1 ESPECIE DE ESTUDIO.....	17
2.2 COLECTA DE OBRERAS.....	18
2.3 CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	19
2.4 MONITORES DE ACTIVIDAD.....	21
2.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	23
2.6 ANÁLISIS DE DATOS.....	24
<b>3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b> .....	28
3.1 RITMICIDAD.....	28
3.2 DÍA VS NOCHE.....	32
3.3 PATRÓN ESTACIONAL DE ACTIVIDAD.....	40
<b>4. <u>CONCLUSIONES</u></b> .....	45
<b>5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	46
<b>6. <u>ANEXOS</u></b> .....	55
6.1 PODER DE LA RITMICIDAD.....	55
6.2 ACTIVITY RHYTHMS IN LEAF CUTTER ANTS ACROMYRMEX LUNDII: EFFECT OF THE PHOTOPERIOD.....	58

## RESUMEN

En las plantaciones forestales se aplican cebos tóxicos para el control de hormigas cortadoras de hojas (HCH) sin tener en cuenta si la aplicación coincide con las épocas del año en las cuales las colonias forrajean, único momento en el cual el cebo es efectivo. La determinación de cuáles serían los momentos adecuados del año para hacer los controles de HCH se debe realizar considerando que las variaciones intra-anales en los patrones de forrajeo están controladas por factores endógenos (los ritmos circadianos de actividad regulados por marcadores internos) y factores exógenos ambientales sincronizadores de estos ritmos endógenos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar cómo influyen los factores endógenos y exógenos en el nivel de actividad diario exhibido por HCH del género *Acromyrmex* durante el ciclo anual. Durante los experimentos se trabajó con dos poblaciones de obreras de *Acromyrmex lundii* provenientes del campo y laboratorio. Las obreras de campo, como esperado, estaban expuestas a las condiciones naturales de fotoperiodo y ciclo térmico diario, mientras que las obreras provenientes de laboratorio fueron expuestas desde su nacimiento a temperatura controlada de 25 °C y fotoperiodo natural. El ritmo diario de actividad individual se comparó en laboratorio entre estas dos poblaciones, y para las 4 estaciones del año, en un test con un ciclo diario de luz natural siguiendo el fotoperiodo anual (Light-Dark, LD) y en un test con oscuridad 24 h (Dark-Dark, DD), ambos a 25 °C. En este trabajo demostramos que existe un factor regulador superior, el fotoperiodo; y que la variación anual en el ciclo diario de luz regula el ciclo anual de actividad en las HCH, independientemente de las variaciones en la temperatura. Se prueba la existencia de un reloj circadiano endógeno que controla patrones de actividad en HCH, las cuales demostraron ser intrínsecamente diurnas. En verano habría que evaluar si sería recomendable realizar un control de HCH mediante una validación a campo.

**Palabras clave:** *Acromyrmex lundii*, laboratorio, campo, LD, DD

## **Activity rhythms in leaf cutter ants *Acromyrmex lundii*: effect of the photoperiod and daily thermal cycle in its annual variation**

### **SUMMARY**

In forest plantations, toxic baits are applied to control leaf cutter ants (LCA) regardless of whether the application coincides with the times of the year in which the colonies forage, the only moment in which the bait is effective. Determination of which would be the appropriate times of the year to carry out LCA controls should consider that annual variations in foraging patterns are controlled by endogenous foraging regulation factors (circadian activity rhythms regulated by internal markers) and exogenous environmental factors that synchronize these endogenous rhythms. The objective of this work was to study how endogenous and exogenous factors influence daily activity levels of LCA of the genus *Acromyrmex* along the annual cycle. We worked with two populations of *Acromyrmex lundii*, workers from the field and lab. The field workers were initially natural conditions of photoperiod and daily thermal cycle, and the lab workers were under controlled temperature of 25 °C and natural photoperiod. The individual daily rhythm of activity of these two populations was compared in the laboratory during the 4 yearly seasons. These populations were subdivided in two groups. One was submitted to the natural annual photoperiod (Light-Dark, LD) and the second group to constant darkness 24 h (Dark-Dark, DD). Ambient temperature in both cases was maintained constant at 25 °C. The data suggest that there is a higher regulatory factor, the photoperiod; and that the annual variation in the daily cycle of light regulates the annual rhythm of activity in LCA, independently of the variations in ambient temperature. The existence of an endogenous circadian clock that controls activity patterns in LCA, which proved to be intrinsically diurnal, is supported by the present data. In summer, it would be necessary to evaluate whether it would be advisable to carry out a LCA control through field validation.

**Keywords:** *Acromyrmex lundii*, lab, field, LD, DD

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 LA FORESTACIÓN Y LAS HORMIGAS CORTADORAS DE HOJAS**

Las plantaciones forestales totalizaron en 2018 más de 1.150.000 ha; de esta forma, los bosques artificiales que antes ocupaban poco más del 1 % del territorio nacional ahora cubren un 6,5 % (SPF, 2018). Para mitigar los impactos que estas plantaciones acarrearán y para mejorar el acceso a mercados europeos, más del 80 % de los bosques plantados son certificados (SPF, 2018). Los procesos de certificación establecen prescripciones y prácticas socialmente aceptables, económicamente viables y ambientalmente equilibradas, desde la silvicultura a la cosecha, e incluyen a la protección forestal mediante el establecimiento de prohibiciones y derogaciones de uso de plaguicidas (Mermot y van Hoff, 2010). En la actualidad, el sector forestal enfrenta una serie de problemas relacionados con plagas introducidas y autóctonas que hacen imperiosa la necesidad de estudiar su biología y formas de manejo en el área de protección forestal. Pero a pesar de que dos nuevas plagas primarias de *Eucalyptus* han ingresado a Sudamérica, *Thaumastocoris peregrinus* y *Leptocybe invasa*, estando la primera presente en Uruguay desde 2008 (Martínez y Bianchi, 2010) y la segunda desde 2013 (Jorge et al., 2016), las hormigas cortadoras de hojas (HCH) constituyen la plaga que puede causar mayores daños económicos al sector forestal.

Todas las especies forestales cultivadas en Sudamérica son atacadas por las HCH del género *Atta* Fabricius 1805 y *Acromyrmex* Mayr 1865 (Forti y Boaretto, 1997), las cuales son los herbívoros nativos dominantes en la zona neotropical y se consideran un componente fundamental de la conformación de los diferentes ecosistemas de Sudamérica (McNaughton et al. 1993, Cherrett 1989). Durante el forrajeo, las obreras cortan material vegetal para cultivar un hongo simbiote del que se alimenta toda la colonia (Weber, 1972). Debido a este particular hábito de alimentación, las HCH causan serios perjuicios al sector agrícola y forestal y son consideradas la plaga agrícola más importante de la zona neotropical (Cherrett, 1986). Las pérdidas para cualquier tipo de cultivo recién implantado pueden ascender



hasta el 100 % (Fowler et al., 1990). Cálculos realizados estiman que se pierden entre el 14 y el 14,5 % de árboles por hectárea en el caso de *Eucalyptus* y *Pinus*, llegándose a pérdidas del 40 % de árboles recién plantados (Montoya-Lerma et al. 2012, Pérez et al. 2011, Forti y Boaretto 1997). Dado que las especies forestales son comercialmente seleccionadas, entre otros factores por su alta tasa de crecimiento, comúnmente poseen una menor concentración de defensas químicas y físicas que especies de crecimiento lento (Farji-Brener 2001, Vasconcelos y Cherrett 1995). Además, como la mayoría de las especies forestales no son nativas del Neotrópico, no coevolucionaron con las HCH y de esta manera no desarrollaron defensas específicas contra este tipo de hormigas que producen un alto impacto por defoliación (Montoya-Lerma et al., 2012). Esto vuelve a las especies forestales especialmente sensibles al ataque de las HCH, las cuales ocasionan pérdidas económicas para las empresas forestales tanto por los daños resultantes de la defoliación como por los costos de su control. Se estima que el 75 % del presupuesto total para el manejo de plagas se utiliza en el control de las HCH (Vilela, 1986). Los daños producto de la defoliación afectan a la resistencia de las plantas y las vuelven más susceptibles al ataque de otros insectos, lo que incrementa el riesgo de mortalidad (Cantarelli et al., 2008).

Las HCH, además de causar perjuicios por las pérdidas de árboles en plantación y replantación, pueden impactar negativamente en la fase de comercialización hasta el consumidor final al poner en riesgo el mantenimiento de la certificación forestal bajo los criterios especificados por la *Forest Stewardship Council* (FSC). La alternativa sería abandonar la certificación FSC y no modificar la forma de control. Sin embargo la pérdida del certificado FSC implica la renuncia a vender a precios diferenciales a sus mercados fundamentalmente europeos. De esta forma, para las empresas certificadas por el FSC que actualmente operan en Uruguay no existe la posibilidad de abandonar el control de hormigas, ya que la presencia de tan sólo un hormiguero adulto de alguna especie del género *Acromyrmex* por hectárea implicaría la pérdida potencial de aproximadamente el 10 % de los árboles plantados al término de las primeras semanas (Bollazzi, 2012). Por tanto, en el año 2015 se obtuvo la autorización por parte del FSC para continuar utilizando el

ingrediente activo Fipronil, la cual fue otorgada hasta agosto de 2020 (FSC, 2015), aplazada hasta 2022 debido a la crisis sanitaria mundial (Martín Bollazzi, comunicación personal, 15 de marzo de 2021). Una nueva derogación de la prohibición del uso del ingrediente activo Fipronil formulado como cebo tóxico al 0,3 %, puede ser obtenida si las empresas demuestran que se están implementando medidas para reducir la cantidad de cebo utilizado. Sin embargo, para Uruguay, y en general para la región sur de Sudamérica, el conocimiento de las HCH se restringe a las especies presentes y a escasos estudios de bioecología y manejo de hormigas cortadoras (Pérez et al., 2011) que permitan establecer estrategias de manejo tendientes a reducir la cantidad de cebo sin afectar la eficacia del control (Bollazzi 2012, Forti y Boaretto 1997, Fowler et al. 1990).

## **1.2 PROBLEMÁTICA DE ESTUDIO, UN CONTROL INEFICAZ**

Las aplicaciones de cebo realizadas durante el control de hormigas son excesivas y deben ser reducidas. Esto se debe principalmente al método de aplicación y a la falta de información respecto a cuáles serían las mejores épocas de control, lo que lleva a una necesidad de repetir las aplicaciones redundando en un uso excesivo de cebo por hectárea (Zanuncio et al. 2016, FSC 2015).

En primera instancia la aplicación resulta en una excesiva disposición de cebo a campo porque ésta se realiza de forma sistemática sin localizar los hormigueros (Bollazzi 2013, Zanetti et al. 2003). En general se aplican dosis de 5-10 g en el suelo, en un marco de 5 x 5 m (Reis et al. 2016, Zanetti et al. 2002). Por razones económicas y operativas, el método de aplicación sistemático no puede ser modificado. Entonces, la eficacia del control dependerá en primera instancia de que las HCH encuentren el cebo depositado en el campo y lo transporten al nido, donde comienza a actuar el ingrediente activo eliminando a la colonia. Dado que un porcentaje de colonias no son controladas durante el primer control resulta necesario realizar nuevas aplicaciones, lo que redundo en un uso excesivo de cebo (Della-Lucia et al. 2013, Montoya-Lerma et al. 2012).

Otro factor que perjudica la efectividad del control es la escasez de información respecto a las épocas adecuadas para realizarlo. La primera aplicación de cebo se realiza en cualquier época, marcada solamente por la necesidad de controlar al momento de la plantación, sin considerar cuáles son los meses en que la mayoría de las colonias de la población a controlar se encuentran forrajeando (Zanuncio et al. 2016, Zanetti et al. 2014, Della-Lucia et al. 2013, Montoya-Lerma et al. 2012). Así, en una población de HCH a controlar existen colonias que están visibles para el control, las que forrajean, y un porcentaje de colonias que permanecen invisibles, las que no forrajean. La maximización de la eficacia del control reduciendo la cantidad de cebo aplicado por hectárea se lograría evitando nuevas aplicaciones producto de la baja efectividad en el control inicial.

Un mayor nivel de efectividad durante el primer control sería posible si la aplicación del cebo ocurre cuando la gran mayoría de los hormigueros se encuentran forrajeando. La relación entre el porcentaje de colonias que forrajean y las que no forrajean va depender de la época del año, ya que las HCH presentan un ciclo anual que se refleja en los niveles de forrajeo que exhiben (Nobua Behrmann et al. 2017, Caldato et al. 2016, Giesel et al. 2013, Bollazzi y Roces 2002, Pilati et al. 1997, Farji-Brener 1993).

### **1.3 ¿CÓMO INCREMENTAR LA EFICACIA DEL CONTROL DE HCH?**

Para evitar las pérdidas de árboles al momento de la plantación es necesario maximizar la eficacia del control pero al mismo tiempo reducir la cantidad de cebo aplicado por hectárea en cada turno plantación-cosecha. Una forma de lograr este objetivo sería determinar las épocas del ciclo anual en la cual la mayoría de las colonias forrajean y agendar las aplicaciones en ese período.

Las variaciones anuales en los patrones de forrajeo están controladas por factores endógenos, es decir, los ritmos circadianos de actividad regulados por marcadores internos, y factores exógenos ambientales como el fotoperiodo y la temperatura, sincronizadores de los factores endógenos. De la comprensión del peso relativo que estos grupos de factores tienen sobre la regulación de los patrones de

forrajeo en cada época del año es que se puede decidir entre recomendar una determinada época de control con la ayuda de monitoreos de actividad o proceder con controles calendario.

#### **1.4 RITMOS BIOLÓGICOS Y CICLOS AMBIENTALES**

Los ritmos biológicos se caracterizan por la repetición temporal de un evento biológico a intervalos regulares y predecibles. Los ritmos biológicos diarios, anuales y lunares, los ritmos de las mareas, entre otros, son fuertemente asociados con ciclos ambientales que se repiten en el mismo período. Precisamente por la coincidencia temporal que existe entre algunos ritmos biológicos y ciclos ambientales, es intuitivo pensar que estos ritmos son fenómenos pasivos, que surgen de reacciones directas al entorno cíclico. Según esta concepción, un animal nocturno entra en actividad porque percibe alguna pista ambiental que indica la llegada de la noche. Sin embargo, la mayoría de los ritmos diarios estudiados hasta la fecha se mantienen incluso cuando se miden en condiciones constantes de laboratorio, donde se eliminan los ciclos ambientales; es decir, estos ritmos diarios son fenómenos endógenos generados internamente. Además, cuando un organismo se mantiene en condiciones constantes sus ritmos comienzan a presentar su propio período, diferente de 24 horas, cuyo valor depende de la especie estudiada (Pittendrigh y Daan, 1976). Es por esto que estos ritmos se conocen como ritmos circadianos (del latín: circa = "alrededor", dies = día). La condición en que un ritmo circadiano expresa su propio período, independientemente de las variables ambientales, se denomina libre curso.

El día de 24 h y las estaciones del año, aparte de los previsibles ciclos fóticos que representan (alternancia día-noche y cambios fotoperiódicos anuales, respectivamente) generan también una serie de otros ciclos ambientales abióticos (temperatura, presión atmosférica, etc.) y bióticos (ciclos de disponibilidad de alimento, de depredación, social; Moore-Ede et al., 1984). Así, los organismos se han adaptado a tales ciclos ambientales incorporando sus propios ritmos endógenos que, si bien acompañan, son independientes de los ciclos ambientales (Pittendrigh, 1961). Este ajuste entre los ritmos endógenos y los ciclos ambientales es posible por la

sensibilidad de los relojes biológicos a las claves ambientales periódicas específicas para cada especie resultando en la sincronización entre organismo y ambiente externo. De este modo, funciones y comportamientos se manifiestan en los momentos en que la situación ambiental es la más adecuada para su expresión. De forma general, el ciclo claro-oscuro diario es el principal sincronizador de los ritmos circadianos (Aschoff, 1960) y las variaciones fotoperiódicas son la principal clave sincronizadora de los ritmos estacionales (Goldman et al., 2004).

El proceso de sincronización puede ocurrir a través de dos mecanismos: arrastramiento o enmascaramiento. En el caso del arrastramiento, el ciclo ambiental (“*zeitgeber*”: del alemán, *Zeit*: tiempo y *geber*: donador, o sea donador de tiempo; Saunders, 2002) actúa directamente sobre el oscilador circadiano, que pasa a oscilar con el mismo periodo del ciclo y, por lo tanto, el ritmo generado por el oscilador también manifiesta el mismo periodo. En el caso del enmascaramiento, el ritmo ambiental actúa directamente sobre el ritmo observado, sin afectar al oscilador propiamente dicho (Marques et al., 2003). En general, los dos procesos actúan simultáneamente durante la sincronización siendo que el enmascaramiento le da un ajuste fino y de reacción inmediata al proceso.

La mayor parte de las especies estudiadas hasta ahora presentan algún tipo de organización temporal; entender la misma es esencial para conocer una especie integralmente. Los insectos presentan ritmos en una amplia variedad de procesos comportamentales y fisiológicos (Saunders, 1982).

## **1.5 FACTORES ENDÓGENOS Y EXÓGENOS EN LA REGULACIÓN DE LOS PATRONES DE FORRAJE EN INSECTOS SOCIALES**

Durante el forrajeo, los insectos sociales abandonan el nido coordinadamente para coleccionar y transportar alimento hacia allí. La disponibilidad de forraje varía estacionalmente y los rangos de actividad también están limitados por factores climáticos. La coordinación tanto del inicio como de la terminación del forrajeo es vital. Los insectos sociales presentan como adaptación ritmos diarios y anuales de actividad que les permiten sincronizar el forrajeo (Tschinkel, 2011).

Los cambios en los niveles de actividad a lo largo del año en los insectos sociales están regulados por factores endógenos, como ritmos circadianos de actividad generados por relojes biológicos internos. Estos ritmos, generados internamente son sincronizados por las estaciones del año siendo los ciclos de temperatura así como el fotoperiodo los factores más relevantes (Saunders, 2002). Estos cambios actúan como moduladores de los patrones de forrajeo regulando el inicio, la terminación y la intensidad del forrajeo, y son conocidos como marcadores de actividad o *Zeitgeber*, también llamados sincronizadores. En insectos sociales, los *Zeitgeber* o sincronizadores de un ritmo de actividad (de origen endógeno) pueden ser varios tipos de ciclos ambientales siendo los ciclos de temperatura como el de luz-oscuridad los más relevantes. Se distinguen dos grupos de factores reguladores de la actividad de forrajeo: por un lado los endógenos internos al individuo, y por el otro los exógenos sincronizadores de los ritmos endógenos a las condiciones ambientales, los cuales varían con la época del año (Bloch, 2009).

### **1.5.1 Factores endógenos y patrones de forrajeo en HCH**

Al día de hoy existe escasa literatura sobre el efecto de los factores endógenos en los patrones de forrajeo en HCH. Sin embargo, en un trabajo realizado por Constantino et al. (2021), en donde se estudió la variación diaria en la actividad de forrajeo de 6 colonias de laboratorio de la HCH *Atta sexdens* en condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y un ciclo luz-oscuridad, se observó que las obreras que fueron marcadas siendo activas durante la fase diurna o durante la fase nocturna, repitieron el mismo comportamiento a lo largo de los 5 días de observación. Este resultado podría sugerir que la actividad diaria de forrajeo está controlada por un reloj interno sincronizado por el ciclo luz-oscuridad.

Por otro lado, para hormigas del género *Camponotus* Mayr 1861 se sabe que los ritmos circadianos de actividad efectivamente se regulan gracias a la presencia de un reloj endógeno que controla patrones de actividad (Kay et al. 2018, Mildner y Roces 2017).

Estudios en numerosas especies de hormigas dan cuenta de la existencia de un ritmo circadiano fuertemente marcado en la actividad locomotora de obreras aisladas, evidencia de la existencia de un reloj endógeno (Sharma et al.2004, North 1987, McCluskey 1965).

Kay et al. (2018) y Mildner y Roces (2017) reportaron la existencia de un reloj circadiano endógeno en las obreras de *Camponotus floridanus* y *C. rufipes* respectivamente, que se manifiesta en un ritmo circadiano en la actividad locomotora de las obreras en condiciones de oscuridad constante. Adicionalmente estos autores demostraron que estas especies son intrínsecamente nocturnas, ya que manifestaron una mayor actividad locomotora durante la noche subjetiva en condiciones de oscuridad constante. Finalmente, las obreras de *C. floridanus* y *C. rufipes* sincronizaron marcadamente sus ritmos de actividad al ser expuestas a un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, evidenciando así la importancia del ciclo diario de luz en la regulación del reloj circadiano (Kay et al. 2018, Mildner y Roces 2017).

Existe una ausencia de conocimiento respecto al efecto de los factores endógenos sobre la actividad de forrajeo en el ciclo anual para las HCH. Al momento hay una carencia de este tipo de estudios y el trabajo de laboratorio es crucial para el conocimiento de dichos factores. Por ello, en este trabajo de investigación, vamos a estudiar la influencia de los factores endógenos en la regulación de los ritmos diarios y anuales de actividad en las forrajeadoras de las HCH.

### **1.5.2 Factores exógenos y patrones de forrajeo en HCH**

Las condiciones meteorológicas son consideradas esenciales en la determinación de los patrones de actividad de forrajeo tanto en HCH (Hölldobler y Wilson 2010, Amante 1967) como en otras especies de hormigas (Hölldobler y Wilson, 1990).

### 1.5.2.1 Ritmos anuales de actividad

La actividad de forrajeo de *Acromyrmex crassispinus* y *Acromyrmex subterraneus subterraneus* en el sur de Brasil (Nickele et al., 2016) se intensificó durante la estación de primavera y verano respectivamente. Similarmente en el desierto del Monte en Argentina, *Acromyrmex lobicornis* y *Acromyrmex striatus* presentaron una mayor actividad de forrajeo durante la estación de primavera y verano (Nobua-Behrmann et al., 2017). En ambientes tropicales donde se reconocen dos estaciones (seca y húmeda), Caldato et al. (2016) reportaron forrajeo de *Atta capiguara* en ambas estaciones, pero con una mayor actividad en la estación húmeda. Según los autores, estos resultados podrían estar explicados por la mayor disponibilidad de recursos durante la estación húmeda, dado que la vegetación presenta un mayor porcentaje de hojas jóvenes y tiernas preferidas por las HCH. Por otro lado, en la hormiga cortadora de gramíneas *Atta bisphaerica* exclusiva de la región tropical de Brasil se identificaron tres fases diferentes que podrían estar vinculadas al cambio estacional en el régimen de lluvias local (Lopes et al., 2016). La primera fase correspondió al inicio de la temporada de lluvias y se caracterizó por una baja actividad de forrajeo, así como un bajo esfuerzo de excavación y construcción de caminos de forrajeo. La segunda fase, que comenzó en febrero y se extendió hasta el final de la temporada húmeda a fines de marzo, se caracterizó por un intenso esfuerzo de excavación y construcción de caminos, lo que resultó en una expansión de las redes de forrajeo. Finalmente, en la tercera fase, que correspondió al inicio de la estación seca, la excavación de túneles y la construcción de caminos se estabilizó o disminuyó mientras que la actividad de forrajeo siguió aumentando. En otro estudio de la actividad anual en HCH, Fowler y Robinson (1979), reportaron que los niveles de actividad en *Atta sexdens* en un hábitat subtropical del Paraguay son mayores durante los meses cálidos.



### 1.5.2.2 Ritmos diarios de actividad

La mayoría de los estudios sobre los factores que afectan las tasas de forrajeo en HCH se focalizan en especies que viven en ecosistemas tropicales (Nobua Behrmann et al., 2017). Los patrones de actividad en las especies tropicales *Atta cephalotes*, *A. sexdens*, *Atta laevigata* y *Atta colombica* están mayormente regulados por los regímenes de precipitaciones y la disponibilidad de recursos (Farji-Brener 2001, Vasconcelos 1990, Rockwood 1975, Lewis et al. 1974b). Por su parte Hodgson (1955) reportó que el patrón de forrajeo se ve modificado por las lluvias, pudiendo extenderse hacia la noche. Caldato et al. (2016) y Hodgson (1955) reportaron que las precipitaciones cuando llegan a ser intensas detienen completamente la actividad de forrajeo de las HCH.

En climas templados, los patrones de actividad de las HCH son claramente dependientes de la variación de la temperatura de acuerdo con cada estación en el ciclo anual donde es común observar modificaciones de los patrones de actividad de diurnos a vespertinos o nocturnos en los meses de mayores temperaturas (Mehlhop y Scott 1983, Brown et al 1979, Mintzer 1979, Gamboa 1976, Whitford y Ettershank 1975). Según Wetterer (1990) el cambio del patrón a nocturno durante el verano permitiría evitar el estrés por calor y la deshidratación que las HCH podrían sufrir durante el día. Existen algunos trabajos que evidencian lo reportado por Wetterer (1990); por ejemplo, en el desierto de Sonora la especie *Atta mexicana* es diurna en invierno y primavera, y cambia a nocturna en el verano (Mintzer, 1979). Similarmente, la actividad de forrajeo en *A. sexdens* y *A. cephalotes* es mayormente diurna durante el invierno y nocturna durante el verano en Paraguay (Fowler y Robinson, 1979) y Costa Rica (Wetterer, 1990). El pasaje de un forrajeo nocturno a un forrajeo diurno durante los meses fríos ha sido reportado también para otras especies de HCH (Gamboa 1975, Rockwood 1975, Lewis et al. 1974a, b). Para las especies de *Acromyrmex*, estudios reportaron que *A. versicolor versicolor* es nocturna durante los meses calientes del verano, pero pasa a ser diurna a partir del otoño en Tempe, Arizona (Gamboa, 1976). Similarmente la actividad de forrajeo de *A. crassispinus* fue reportada durante la fase diurna en abril en Paraguay (Fowler y

Robinson, 1979). La actividad de forrajeo en *A. lobicornis* es diurna durante otoño e invierno y nocturna durante primavera y verano, mientras que *A. striatus* al contrario de lo reportado por Wetterer (1990), siempre es diurna pero realiza un patrón de forrajeo bimodal en primavera y verano con un pico de actividad en la mañana y otro pico en la tarde, mientras que en otoño la actividad de forrajeo se concentra durante las horas más calientes del día (Nobua-Behrmann et al., 2017). Por otro lado, la actividad de forrajeo anual de *A. subterraneus subterraneus* fue exclusivamente nocturna en Viçosa, MG, Brasil (Maciel et al., 1995), mientras que *A. balzani* (Mendes et al., 1992) y *A. laticeps nigrosetosus* (Araújo et al., 1998) fueron principalmente nocturnas en Minas Gerais, Brasil.

### **1.5.2.3 Temperatura y humedad relativa**

La temperatura del aire y la humedad relativa generalmente son reportadas como los factores principales en la determinación de los ritmos de actividad de forrajeo (Hölldobler y Wilson 2010, Amante 1967). De los factores exógenos estudiados por Marschner et al. (1993) -temperatura del suelo y humedad relativa del aire- el primero tuvo una mayor influencia en la actividad anual y en la tasa de corte de *A. striatus*. De la misma forma, según Fowler (1978) la tasa de corte de *A. crassispinus* exhibe una mayor correlación con la temperatura que con la humedad relativa. Similarmente, según Nobua Behrmann et al. (2017) la actividad de forrajeo responde a los cambios diarios y estacionales en la temperatura del suelo, el cual constituye el factor exógeno más importante en la regulación del comportamiento de las HCH. De acuerdo con estos autores la temperatura es un buen predictor del *timing* o la medida del tiempo en la activación de las colonias (inicio y fin) y en la intensidad de la actividad (cantidad de obreras forrajeando). Otros autores como Gamboa (1976) sostienen que la actividad de corte de *A. versicolor* está muy influenciada por la temperatura, que, asociada con la humedad relativa y otros factores, puede conducir a un aumento o disminución de la actividad de corte. De acuerdo con Caldato et al. (2016), el patrón de actividad de forrajeo de *Atta*

*capiguara* depende significativamente tanto de la temperatura del aire como de la humedad relativa.

#### **1.5.2.4 Fotoperiodo**

A pesar de que Nobua-Behrmann et al. (2017) sostiene que la luz o la radiación directa no sería un factor importante en la regulación de la actividad de las HCH, Caldato et al. (2016) sostienen por el contrario que es probable que la variación en otros factores exógenos como el fotoperiodo (Amor et al. 2011, Narendra et al. 2010, Hodgson 1955), y factores endógenos como los requerimientos nutricionales de la colonia influyen en los niveles de actividad de las HCH, así como las variaciones diarias y estacionales de la temperatura y la humedad relativa frecuentemente estudiadas.

Weber (1941) sugiere que la actividad de forrajeo está determinada por la intensidad de la luz, mientras que Rockwood (1975) mantiene una postura clásica sobre la base de estudios prolongados y sostiene que la actividad de forrajeo es estacional y se ve afectada por diversos factores abióticos como la temperatura y las precipitaciones. Lutz (1929) observó inactividad en colonias de *A. cephalotes* antes de la salida y después de la puesta del sol y concluyó que la luz es la variable ambiental que inicia y finaliza la actividad diaria. Sin embargo, en otros trabajos (Weber 1946, 1941, Walcott 1933) se reportó a la misma especie en un hábitat similar siendo activa durante la noche.

El conocimiento de los efectos del fotoperiodo en HCH es escaso, y solamente podemos referirnos a un trabajo realizado por Hodgson (1955). Según el autor, el fotoperiodo sería el factor principal en la regulación de los patrones de forrajeo. A partir de un estudio de la actividad de obreras de un nido de *A. cephalotes* de una duración menor a un mes y tomando dos días de ese periodo como los más representativos, sugirió que la cantidad de luz que llega al suelo es el único factor medido que muestra una correlación con cualquier parte del ciclo de forrajeo. El inicio y el fin de la actividad de forrajeo estaría regulado por la intensidad lumínica que llega al nido y a los caminos de forrajeo. Adicionalmente reportó que las

hormigas no abandonaban el nido hasta que la luz lo alcanzara en una determinada intensidad, sugiriendo que el egreso inicial de la colonia por parte de las obreras ocurriría en respuesta a una determinada intensidad lumínica.

El movimiento de las obreras hacia los orificios de salida del nido antes del amanecer indicaría un ritmo diurno endógeno, aparte de los efectos de la luz o cualquier otro factor exógeno que pudiese estar operando fuera del hormiguero (Hodgson, 1955). Según el autor, la actividad endógena de las hormigas sería suficiente para salir del hormiguero, pero parecería que la salida de las obreras en oscuridad sería menos acelerada en comparación a cuando las hormigas reciben luz.

Hasta el momento casi todos los trabajos de investigación acerca de los patrones de forrajeo en HCH han sido producto de estudios realizados exclusivamente a nivel de campo en ambientes naturales (Nobua-Behrmann et al. 2017, Caldato et al. 2016, Nickele et al. 2016, Viana et al. 2004, Pilati et al. 1997, Farji-Brener 1993, Marschner et al. 1993, Pintera y Zorrilla 1981, Fowler y Robinson 1979, Hodgson 1955) y urbanos (Jofre y Medina, 2012).

De esta manera, los trabajos de investigación sobre la variación diaria y anual de actividad en las HCH han sido correlacionados casi exclusivamente con los parámetros ambientales temperatura y humedad relativa (Nobua-Behrmann et al. 2017, Caldato et al. 2016, Nickele et al. 2016, Viana et al. 2004, Marschner et al. 1993, Fowler y Robinson 1979). No obstante, el factor exógeno del fotoperiodo, no ha sido estudiado experimentalmente, a pesar de que se reconoce a partir de un artículo que trabaja con una sola colonia y sin réplicas, como el factor principal en la regulación de los patrones de forrajeo en las HCH (Hodgson, 1955).

Así pues, existe una brecha de conocimiento acerca del efecto de otros factores exógenos como el fotoperiodo en las HCH, que debería estudiarse *in vitro*.

### **1.5.3 ¿Existe un factor regulador superior?**

Tradicionalmente, las predicciones respecto a la actividad de forrajeo de las HCH han intentado ser explicadas por factores exógenos medioambientales de origen climático como la temperatura y la humedad relativa (Nobua-Behrmann et al. 2017,

Caldato et al. 2016, Nickele et al. 2016, Viana et al. 2004, Pilati et al. 1997, Farji-Brener 1993, Marschner et al. 1993, Pintera y Zorrilla 1981, Fowler y Robinson 1979). En este trabajo buscamos determinar si existe un factor regulador superior, el fotoperiodo, o sea: determinar si la variación anual en el ciclo diario de luz regula el ciclo anual de actividad en las HCH independientemente de las variaciones en la temperatura.

## **1.6 HIPÓTESIS**

1. Las hormigas cortadoras de hojas presentan un ritmo circadiano de actividad controlado por un reloj endógeno.
2. Las hormigas cortadoras de hojas son intrínsecamente diurnas.
3. El nivel de actividad de forrajeo varía estacionalmente.

## **1.7 OBJETIVOS**

### **1.7.1 Objetivo general**

Estudiar en hormigas cortadoras de hojas del género *Acromyrmex* cómo influyen los factores endógenos y los factores exógenos en el nivel de actividad diario exhibido durante el ciclo anual.

#### **1.7.1.1 Objetivos específicos**

1. Establecer si las obreras de *Acromyrmex lundii* exhiben un ritmo de actividad controlado por un reloj endógeno, y en qué medida éste es influenciado por los ciclos diarios de luz y térmico.
2. Determinar si las obreras de *Acromyrmex lundii* son intrínsecamente diurnas comparando los niveles de actividad día/noche.

3. Establecer si existen diferencias entre los niveles de actividad de obreras de *Acromyrmex lundii* entre las diferentes estaciones del año y determinar en qué medida están influenciadas por las variaciones inter estacionales en los ciclos diarios térmico y de luz (fotoperiodo).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Durante los experimentos se trabajó con dos poblaciones de obreras, provenientes ya sea de colonias de campo o de laboratorio, o sea que se diferenciaban en el tipo de ciclos ambientales a los que fueron expuestas previo a los registros en el Laboratorio. O sea, las obreras de campo fueron expuestas desde su nacimiento a condiciones naturales de fotoperiodo y ciclo térmico diario, es decir, experimentaron los ciclos diarios de temperatura y su variación anual, así como la variación natural en el ciclo diario de luz (fotoperiodo). Por otro lado las obreras de laboratorio fueron expuestas desde su nacimiento a temperatura controlada a 25 °C y fotoperiodo natural; en otras palabras la única variación que experimentaron fue la dada por el fotoperiodo en nuestra latitud a lo largo del año. En Laboratorio se comparó el ritmo diario de actividad individual de estas dos poblaciones expuestas a temperatura ambiental constante (25 °C). En los registros de actividad en Laboratorio, las hormigas fueron sacadas de su medio social y de otras variables ambientales como humedad, precipitaciones, etc. Cada población fue subdividida en dos grupos. Uno expuesto al ciclo luz-oscuridad natural siguiendo el fotoperiodo natural de las 4 estaciones (Light-Dark, LD) y un segundo grupo expuesto a oscuridad constante (Dark-Dark, DD). La comparación de los niveles de actividad diarios, entre las condiciones de LD y de DD de las obreras provenientes de campo y de laboratorio, durante las 4 estaciones del año permite determinar si las obreras exhiben ritmicidad (objetivo 1), en qué medida son intrínsecamente diurnas o nocturnas (objetivo 2) así como si presentan variación anual (objetivo 3) en función de su sincronización previa. Por otro lado conociéndose cuál es el efecto del fotoperiodo (obreras provenientes de laboratorio) o del fotoperiodo en conjunto con el ciclo térmico diario (obreras provenientes de campo) se puede discutir cuáles son algunos de los factores exógenos que podrían regular el ritmo de actividad.

## 2.1 ESPECIE DE ESTUDIO

Para este trabajo se utilizó una de las especies más representativas del género *Acromyrmex*, la especie *Acromyrmex lundii* (hormiga negra común) (Figura 1). Es una de las especies más abundantes en la región sur del país. Pueden atacar casi todas las especies cultivadas, cortar y llevarse desde hojas, flores e incluso frutos. Los nidos normalmente son subterráneos, de modo que se vuelven imperceptibles a simple vista, salvo por los caminos de forrajeo y los orificios de salida o entrada del nido (Figura 2).



**Figura 1.** *Acromyrmex lundii* de cuerpo entero en vista lateral y detalle de la cabeza. (Imagen Nobile, 2008).





**Figura 2.** Nido subterráneo de *Acromyrmex lundii*. El nido solo se evidencia por los caminos (flechas) que finalizan en los orificios de entrada (estrellas). Foto: M. Bollazzi.

## 2.2 COLECTA DE OBRERAS

Se utilizaron obreras de dos poblaciones: obreras provenientes del campo y obreras procedentes de laboratorio. Las obreras de campo provinieron del predio de la Facultad de Agronomía ( $34^{\circ} 50' 13''$  S /  $56^{\circ} 13' 16''$  W). Se identificó la especie de interés siguiendo la clave de Gonçalves (1961) y se localizaron y numeraron las colonias presentes en el parque de la Facultad para posteriormente colectar obreras sobre los caminos de forrajeo. Por otro lado se trabajó con obreras procedentes de tres colonias adultas criadas en laboratorio desde la reina fundadora durante 7 años, por lo que todas las obreras nacieron en laboratorio (Figura 3). La reina fundadora se colectó en las inmediaciones de Barker; departamento de Colonia ( $34^{\circ} 15' 45''$  S /  $57^{\circ} 27' 57''$  W).

Las obreras provenientes de campo y de laboratorio se diferenciaban por las condiciones a las que fueron expuestas previamente. Por un lado, las obreras de campo fueron expuestas desde su nacimiento a condiciones naturales de fotoperiodo y ciclo térmico diario, es decir, experimentaron cambios de temperatura a lo largo del año así como la variación fotoperiódica. Por otro lado las obreras de laboratorio fueron expuestas desde su nacimiento a temperatura controlada de  $25^{\circ}\text{C}$

(temperatura óptima) y fotoperiodo natural, por lo que la única variación que experimentaron fue la dada por el fotoperiodo en nuestra latitud a lo largo del año.

La colecta de obreras provenientes del campo se realizó cuando éstas se encontraban forrajeando por los caminos, en cada una de las estaciones antes de comenzar con los registros de actividad. Se utilizó una pinza blanda para evitar dañar los individuos. Para su transporte, se colocaron los insectos en frascos de plástico recubiertos con vaselina para evitar que pudiesen escapar. Para que la muestra de obreras de campo fuera representativa de la especie se intentó variar de colonia en cada colecta. En el caso de las obreras provenientes de laboratorio, en cada uno de los experimentos, se utilizaron hormigas de cada una de las tres colonias existentes. Así mismo, las obreras de laboratorio fueron colectadas en cada una de las estaciones antes de comenzar con los registros de actividad.

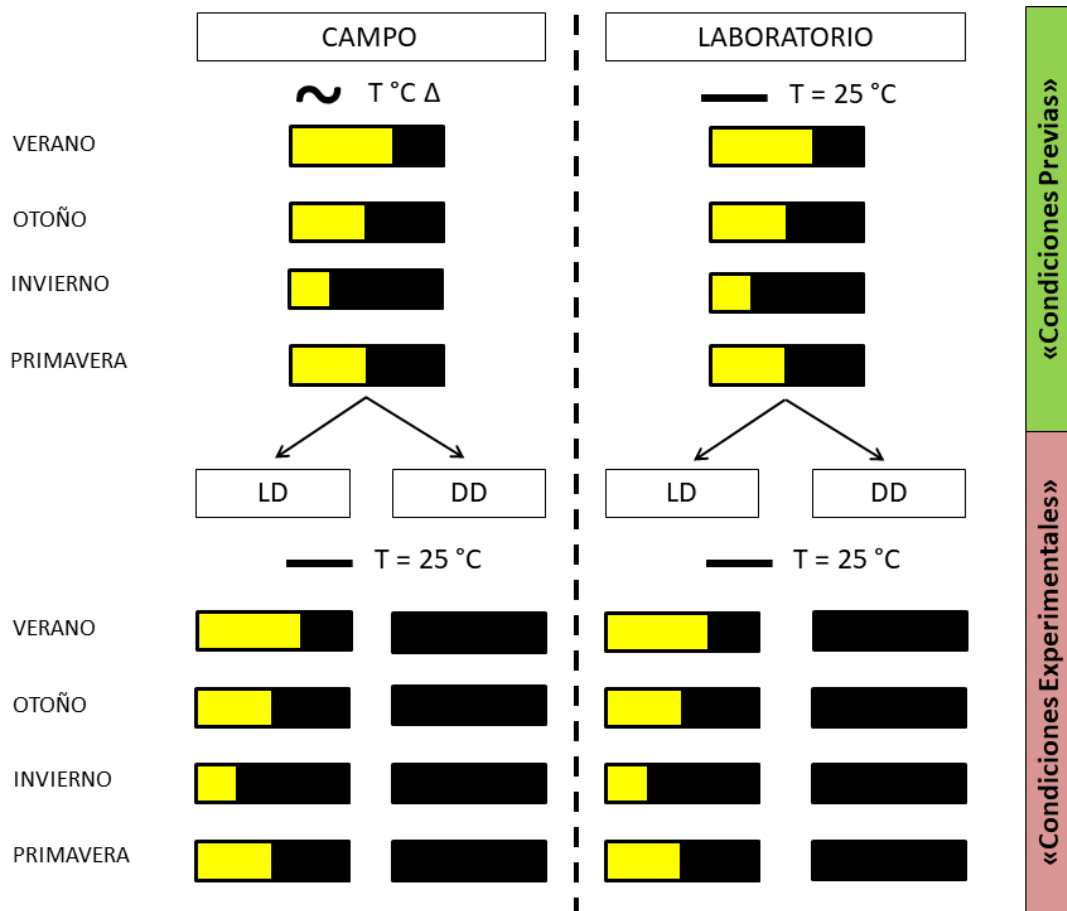


**Figura 3.** Colonias adultas de *Acromyrmex lundii* criadas en laboratorio desde la reina fundadora durante 7 años. Cátedra de Entomología. Foto: G. Katzenstein.

### 2.3 CONDICIONES EXPERIMENTALES

Los experimentos fueron llevados a cabo en condiciones de Laboratorio. Para estudiar los ritmos de actividad individual de las obreras –provenientes tanto de campo como de laboratorio- se acondicionaron dos laboratorios. En ambos casos la temperatura permaneció controlada a 25 °C. En un laboratorio se llevó a cabo el Test

con ciclo diario de luz natural (Light-Dark, LD), variable de acuerdo a la estación del año. Esto se consiguió simplemente por ventanas de vidrio presentes en el laboratorio. En el otro laboratorio se realizó el Test con oscuridad constante (Dark-Dark, DD). El laboratorio donde estaba el sistema de registro permaneció a oscuras durante la totalidad del proyecto de investigación. En ambas condiciones (LD y DD), se registraron los ritmos diarios de actividad de obreras provenientes del campo y del laboratorio en simultáneo durante las 4 estaciones del ciclo anual. De esta forma las obreras provenientes del campo expuestas a LD vieron modificado el ciclo térmico diario, no así el de luz. Mientras que para las obreras procedentes de laboratorio, el Test en LD ofició como un control, dado que no vieron modificado ningún factor exógeno (el ciclo térmico diario ni el fotoperiodo). Con respecto a la condición DD, las obreras provenientes de campo vieron modificado tanto el ciclo térmico diario como el ciclo diario de luz. En el caso de las obreras procedentes de laboratorio cuando colocadas en DD únicamente vieron modificado el ciclo diario de luz, no así la temperatura (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema del diseño experimental. Las barras representan el ciclo diario de luz experimentado por las obreras para cada caso. La parte amarilla representa la fase diurna (luz) y la parte negra la fase nocturna (oscuridad). En LD el ciclo luz/oscuridad varía de acuerdo con la estación del año, mientras que en DD la oscuridad permanece constante las 24 h. La temperatura experimentada por las hormigas en cada estadio experimental es representada en forma de onda sinusoidal (temperatura variable) o línea recta (temperatura constante).

## 2.4 MONITORES DE ACTIVIDAD

Para estudiar los ritmos diarios de actividad de las HCH se utilizaron los monitores de actividad TriKinetics ([www.trikinetics.com](http://www.trikinetics.com)). Estos monitores están especialmente capacitados para registrar la actividad individual de hasta 32 hormigas en simultáneo (Figura 5). Están equipados con una serie de sensores infrarrojos que

detectan el movimiento de las obreras. En cada cápsula de registro se coloca un tubo de ensayo con dos puntas que funcionan de alimentadores. En cada tubo se coloca únicamente una obrera. De esta manera, un monitor completo contendrá 32 hormigas.



**Figura 5.** Monitor de actividad TriKinetics con 32 cápsulas de registro. La actividad individual de las hormigas se registró de forma aislada del contexto social a través de sensores infrarrojos en el centro de los tubos de vidrio. Foto: S. Mildner.

Los monitores de actividad TriKinetics se conectan a una computadora y mediante el software DAMSystem308 se registra la actividad locomotora. Tan pronto se abre el programa, los monitores comienzan a registrar. El software necesita por única vez que el usuario determine el número de monitores a utilizar así como también, especificar el lapso entre cada registro de actividad. Los monitores están numerados para que sean identificados por el software. En este trabajo contamos con 4 monitores de actividad TriKinetics. Los monitores #1 y #2 permanecieron en el Test LD y fueron utilizados para registrar la actividad de obreras provenientes de laboratorio y campo respectivamente (Figura 6). Mientras que los monitores #3 y #4

permanecieron en el Test DD y fueron utilizados para registrar la actividad de obreras procedentes de laboratorio y de campo respectivamente. Por otro lado el lapso entre cada registro de actividad fue de 10 minutos.



**Figura 6.** Monitoreo de actividad bajo un ciclo diario de luz (LD). Un monitor con 32 obreras provenientes de laboratorio y otro monitor con 32 obreras provenientes de campo. Foto: G. Katzenstein.

## **2.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

La duración de cada monitoreo de actividad fue de 8 días, y se realizaron al menos 3 por estación durante el ciclo anual para obreras provenientes de campo y laboratorio en el test LD y DD. El procedimiento a seguir en cada monitoreo de actividad es igual en cada escenario (obreras de laboratorio en LD, obreras de campo en LD, obreras de laboratorio en DD y obreras de campo en DD) y es el siguiente:

Día 1:

1. Colectar 32 obreras.
2. Colocar cada una en el monitor de actividad Trikinetic.
3. Alimentar cada una de las obreras.
4. Iniciar registro de actividad (encender DAMsystem308).

Día 8: Fin registro de actividad (finalizar DAMsystem308).

Las obreras fueron alimentadas día por medio durante los 8 días del monitoreo de actividad. El alimento consistió en agua azucarada obtenida a partir de la dilución de 10 g de azúcar en 100 ml de agua. La dosis de agua azucarada suministrada a cada obrera fue de 0,1 ml, repartida en 0,05 ml en cada extremo del tubo de vidrio.

Para mantener la humedad relativa por encima del 70 % y evitar así la deshidratación y muerte de las hormigas, se mantuvo una toalla húmeda por debajo de los monitores y se colocó una caja de plástico transparente por encima de ellos durante el tiempo del monitoreo de actividad (Figura 6).

Una vez finalizado el monitoreo de actividad, el usuario debe darle finalizar al software DAMSystem308. Dentro de la carpeta del programa existe una carpeta donde se alojan los archivos de texto que se generan luego de cada monitoreo de actividad. A partir de un monitor de actividad se genera un archivo de texto con el registro de la actividad individual de cada una de las obreras.

## 2.6 ANÁLISIS DE DATOS

La variable medida en los experimentos fue la actividad diaria individual de obreras de *Acromyrmex lundii* expresada en actogramas (Figura 7). A partir de la actividad individual se determinó la existencia de ritmicidad, se comparó la actividad diurna con la actividad nocturna y se comparó el nivel de actividad entre estaciones en el ciclo anual. El primer día del monitoreo de actividad se consideró como un día de ajuste de las obreras a las condiciones experimentales, por lo que se descartó para el análisis de los datos. Para la determinación de ritmicidad se necesitaron los 7 días útiles, mientras que para la comparación entre actividad diurna y nocturna y la comparación del nivel de actividad entre estaciones, por convención se utilizó el día 2. En este estudio el n es el individuo, es decir una obrera, por tanto para que los datos sean confiables se necesitó de un n mínimo de 30 obreras tanto de laboratorio como de campo para cada test (LD y DD) en cada estación del año.

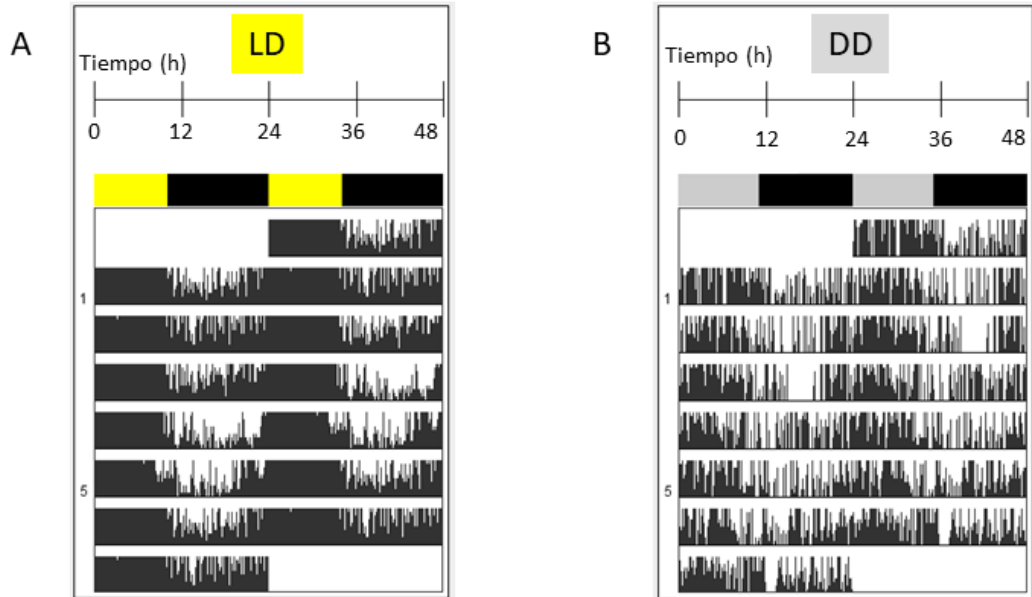
Para determinar la existencia de un ritmo diario de actividad en HCH se utilizó el software estadístico ActogramJ (<https://bene51.github.io/ActogramJ/>). Con éste, se

midió el periodo de cada individuo mediante el Lomb-Scargle-method ( $\alpha = 0,5$ ). De esta manera podemos saber si tienen un periodo cercano a 24 h, lo que indicaría un ritmo diario de actividad. Posteriormente para determinar en qué medida la ritmicidad es influenciada por los factores exógenos ciclo diario de luz (fotoperiodo) y ciclo térmico diario (temperatura), se realizó un Chi-cuadrado ( $X^2$  test,  $P = <0,001$ ) entre las obreras de laboratorio y las obreras de campo para cada test (LD y DD) en cada estación del año.

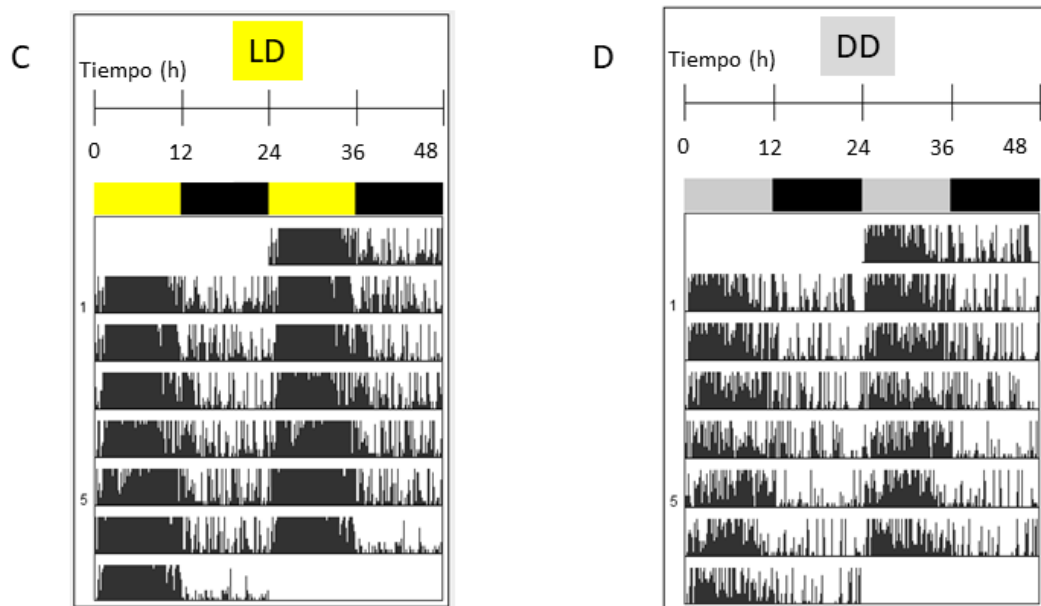
El ActogramJ permite visualizar actogramas de la actividad diaria de cada obrera monitoreada. En un actograma de un organismo rítmico se puede apreciar una fase de mayor actividad seguido de una fase de menor actividad -o viceversa según el hábito diurno o nocturno de la especie (Figura 7). En LD el ciclo completo tiene una duración de 24 h y eso se repite día tras día indicando una sincronización al ciclo luz-oscuridad al que está expuesto, mientras que en DD el ciclo tiene una duración aproximada a 24 h (ritmos circadianos).



## OBRERAS PROVENIENTES DEL LABORATORIO



## OBRERAS PROVENIENTES DEL CAMPO



**Figura 7.** Actogramas de ploteado duplo de obreras provenientes de laboratorio (panel superior) y de campo (panel inferior) expuestas a LD (panel izquierdo) y DD (panel derecho) durante los 7 días del monitoreo de actividad. En A y C se visualiza claramente un ritmo diario de actividad-inactividad, con la mayor concentración de

actividad ocurriendo durante la fase clara del ciclo día-noche. Las barras amarillas representan la fase diurna y las barras negras la fase nocturna. En B y D se visualiza claramente un ritmo circadiano de actividad, con la mayor concentración de actividad ocurriendo durante la fase diurna subjetiva. Las barras grises representan el día subjetivo y las barras negras la noche subjetiva.

Para determinar si las HCH son intrínsecamente diurnas o nocturnas, se compararon los niveles de actividad día/noche de obreras provenientes de laboratorio y obreras provenientes de campo para cada Test (LD y DD) en cada estación del año utilizando el test de Student para datos pareados en caso de que se constate una distribución normal de los datos, y utilizando el test de Wilcoxon Signed Rank Test ( $P = <0,001$ ) en caso de que el Test de Shapiro-Wilkinson determinara que las distribuciones no se ajustaban a la distribución normal.

Para determinar si el nivel de actividad de forrajeo varía estacionalmente, se compararon los niveles de actividad entre estaciones en el ciclo anual en obreras de laboratorio y obreras de campo para cada Test (LD y DD) mediante el test de Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, y el test post-hoc de Dunn ( $P = <0,001$ ).

Para determinar el poder de la ritmicidad, el cual compara dentro de cada día la diferencia entre el máximo y mínimo nivel de actividad registrado, se utilizó el software estadístico ActogramJ mediante el Lomb-Scargle-method ( $\alpha = 0,5$ ). Posteriormente para determinar si el poder de la ritmicidad varía estacionalmente, se compararon los niveles de poder entre estaciones en el ciclo anual en obreras de laboratorio y obreras de campo para cada Test (LD y DD) utilizando el software estadístico SigmaPlot mediante el test de Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks y el test post-hoc de Dunn ( $P = <0,001$ ).

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 RITMICIDAD**

Aproximadamente el 50 % del total de las obreras procedentes de laboratorio y mantenidas en DD exhibió un ritmo circadiano de actividad a lo largo del año (Figura 8). Lo mismo ocurrió con las obreras procedentes de campo cuando expuestas a oscuridad constante. Del total de obreras monitoreadas en cada estación, un porcentaje de aproximadamente 50 % exhibió un ritmo circadiano de actividad (Figura 8).

Estos valores de ritmicidad en obreras de laboratorio y obreras de campo son similares a los registrados en estudios anteriores realizados en una especie de hormiga no cortadora *Camponotus rufipes*, en donde aproximadamente el 50 % de las obreras exhibió un ritmo circadiano de actividad en DD (Mildner y Roces, 2017).

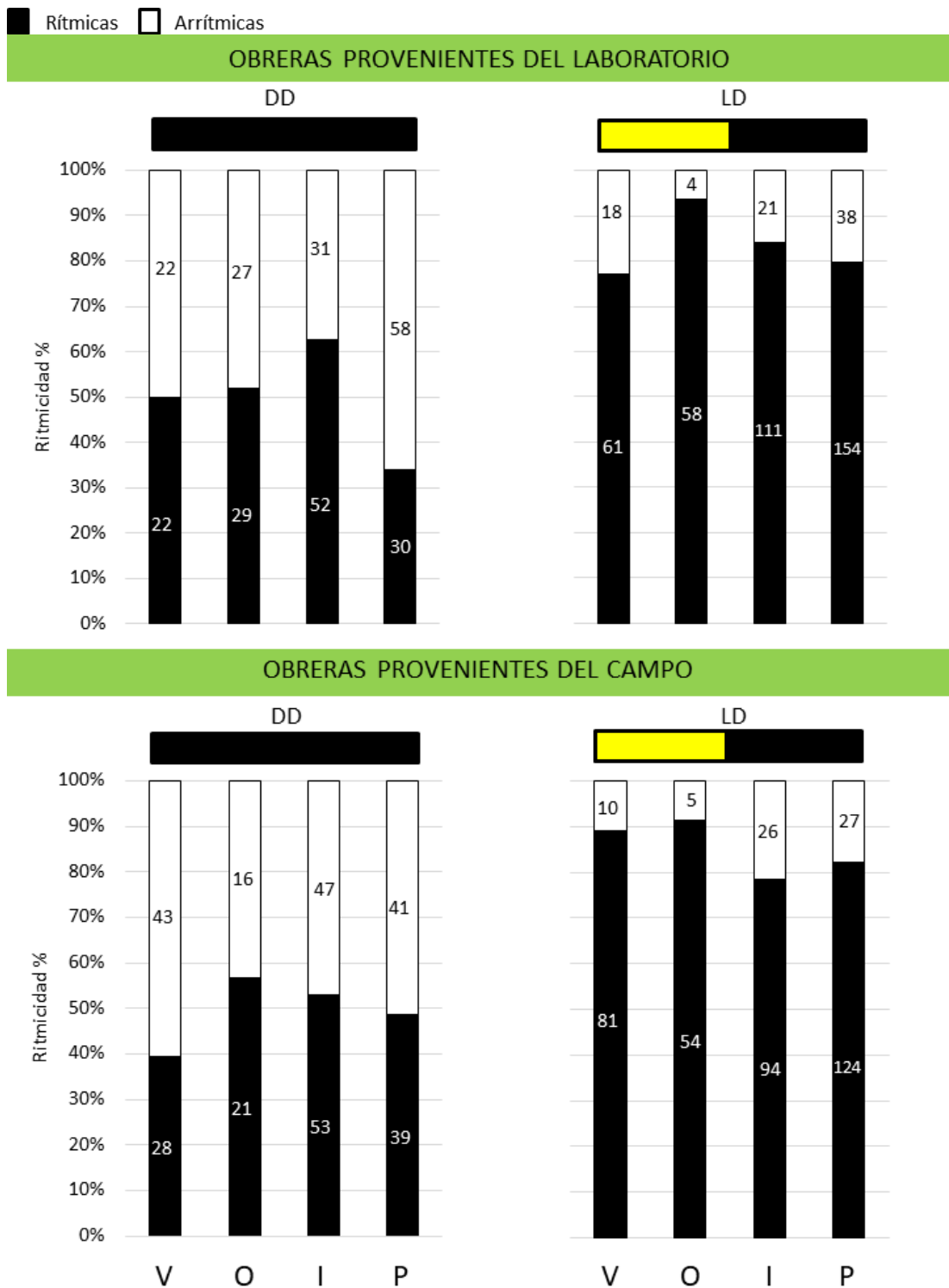
Las obreras procedentes de laboratorio y de campo presentan entonces un ritmo circadiano de actividad aún ante la ausencia de la señal externa más potente; el ciclo diario de luz (Saunders, 2002). Estos resultados estarían indicando la existencia de un reloj endógeno que controla patrones de actividad en las HCH. De esta manera se cumple con la primera parte del objetivo 1 y se responde la hipótesis 1.

Resultados similares fueron reportados en numerosas hormigas no cortadoras, donde obreras aisladas exhibieron un ritmo circadiano fuertemente marcado en la actividad locomotora, evidenciando la existencia de un reloj endógeno (Sharma et al. 2004, North 1987, McCluskey 1965). Del mismo modo Kay et al. (2018) y Mildner y Roces (2017) reportaron la existencia de un reloj circadiano endógeno en las obreras de *Camponotus floridanus* y *C. rufipes*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las condiciones DD, sería de esperarse que, en LD un porcentaje mayor de obreras presentara un ritmo diario de actividad, puesto que, según Saunders (2002), el ciclo diario de luz constituye la señal ambiental más potente sincronizadora de los relojes biológicos endógenos. Efectivamente, en nuestro estudio más del 70 % de las obreras procedentes de laboratorio expuestas a las condiciones LD exhibieron un ritmo diario de actividad

en cada estación del año (Figura 8). En el caso de las obreras de campo expuestas a LD, los resultados fueron similares. Más del 80 % de las obreras de campo exhibieron ritmicidad en cada estación del año (Figura 8). Estos valores son similares a un estudio realizado por Mildner y Roces (2017) con la hormiga no cortadora *C. rufipes*. Los autores reportaron que del total de obreras expuestas a un ciclo luz-oscuridad LD (12:12), aproximadamente el 60 % exhibió un ritmo diario de actividad.

Bajo el efecto exógeno del ciclo diario de luz, la expresión de ritmicidad por parte de las HCH aumenta significativamente. Estos resultados evidenciarían la importancia del factor exógeno del ciclo claro-oscuro en la sincronización de los factores endógenos en HCH. La importancia del fotoperiodo en la regulación del reloj circadiano había sido reportada en hormigas no cortadoras del género *Camponotus* (Kay et al. 2018, Mildner y Roces 2017).



**Figura 8.** Porcentaje de individuos que expresaron ritmicidad en obreras provenientes del laboratorio (panel superior) y de campo (panel inferior) expuestas a condiciones de oscuridad constante (DD; paneles izquierdos) y a ciclos día-noche (LD; paneles derechos). Lomb-Scargle-method, significance level  $\alpha = 0,5$ ;

ActogramJ. Dentro de las barras negras y barras blancas se observa el valor absoluto del total de obreras que fueron rítmicas o arrítmicas respectivamente.

Para determinar en qué medida la ritmicidad es influenciada por los ciclos diarios de luz y de temperatura, se realizó un Chi-cuadrado (X2 test,  $p = 0,001$ ) entre las obreras de laboratorio y las obreras de campo para cada test (LD y DD) en cada estación del año. Los resultados no dieron diferencias significativas entre las obreras de campo y las obreras de laboratorio a pesar de los casos puntuales marcados en gris (Cuadro 1).

<b>Origen:</b>	<b>Laboratorio</b>		<b>Campo</b>		<b>Laboratorio</b>		<b>Campo</b>	
<b>Condiciones previas:</b>	Ciclo de luz		Ciclo de luz y térmico		Ciclo de luz		Ciclo de luz y térmico	
<b>Condiciones experimentales:</b>	DD				LD			
<b>Ritmicidad:</b>	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
<b>Verano</b>	50	50	39	61	77	23	89	11
<b>Otoño</b>	52	48	57	43	94	6	92	8
<b>Invierno</b>	63	37	53	47	84	16	78	22
<b>Primavera</b>	34	66	49	51	80	20	82	18

**Cuadro 1.** Porcentajes de ritmicidad de obreras provenientes del laboratorio y de campo en LD y DD. Chi-cuadrado entre las obreras de laboratorio y las obreras de campo para cada test (LD y DD) en cada estación del año. Dentro de un mismo Test DD o LD, las celdas marcadas (gris) presentaron diferencias significativas laboratorio vs campo, X2 test,  $p = 0,001$ .

De acuerdo con el análisis estadístico, no existieron diferencias entre las obreras de laboratorio y las obreras de campo a excepción de la estación de primavera en DD y verano en LD. Esto significa que, las diferencias experimentadas en el ciclo térmico diario durante las condiciones previas a las condiciones

experimentales entre las obreras provenientes del campo y las obreras procedentes de laboratorio no marcaron diferencias en la expresión de la ritmicidad. Por tanto el ciclo luz-oscuridad sería el factor exógeno más importante en la regulación de la ritmicidad. Con estos resultados se cumplió la segunda parte del objetivo 1.

Hasta el momento, únicamente contábamos con estudios puntuales que intentaban correlacionar los factores exógenos, temperatura y humedad relativa con la actividad de las HCH (Nobua-Behrmann et al. 2017, Caldato et al. 2016, Nickele et al. 2016, Viana et al. 2004, Marschner et al. 1993). De esta manera, no existía ningún trabajo que hubiese estudiado los factores endógenos involucrados en los ritmos circadianos de actividad en HCH. La única excepción de la que tenemos conocimiento es un trabajo reciente de Constantino et al. (2021), donde se observó que las obreras presentaron un ritmo diario de actividad en condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y un ciclo luz-oscuridad (12:12); a partir del cual se podría suponer que la actividad diaria de forrajeo estaría controlada por un reloj interno sincronizado por el ciclo luz-oscuridad.

En este trabajo se prueba la existencia de un reloj biológico endógeno que controla patrones de actividad en HCH. Las HCH presentan un ritmo circadiano de actividad y el ciclo luz-oscuridad es el factor exógeno más importante en la regulación de la ritmicidad, así como la señal externa más potente sincronizadora del reloj circadiano.

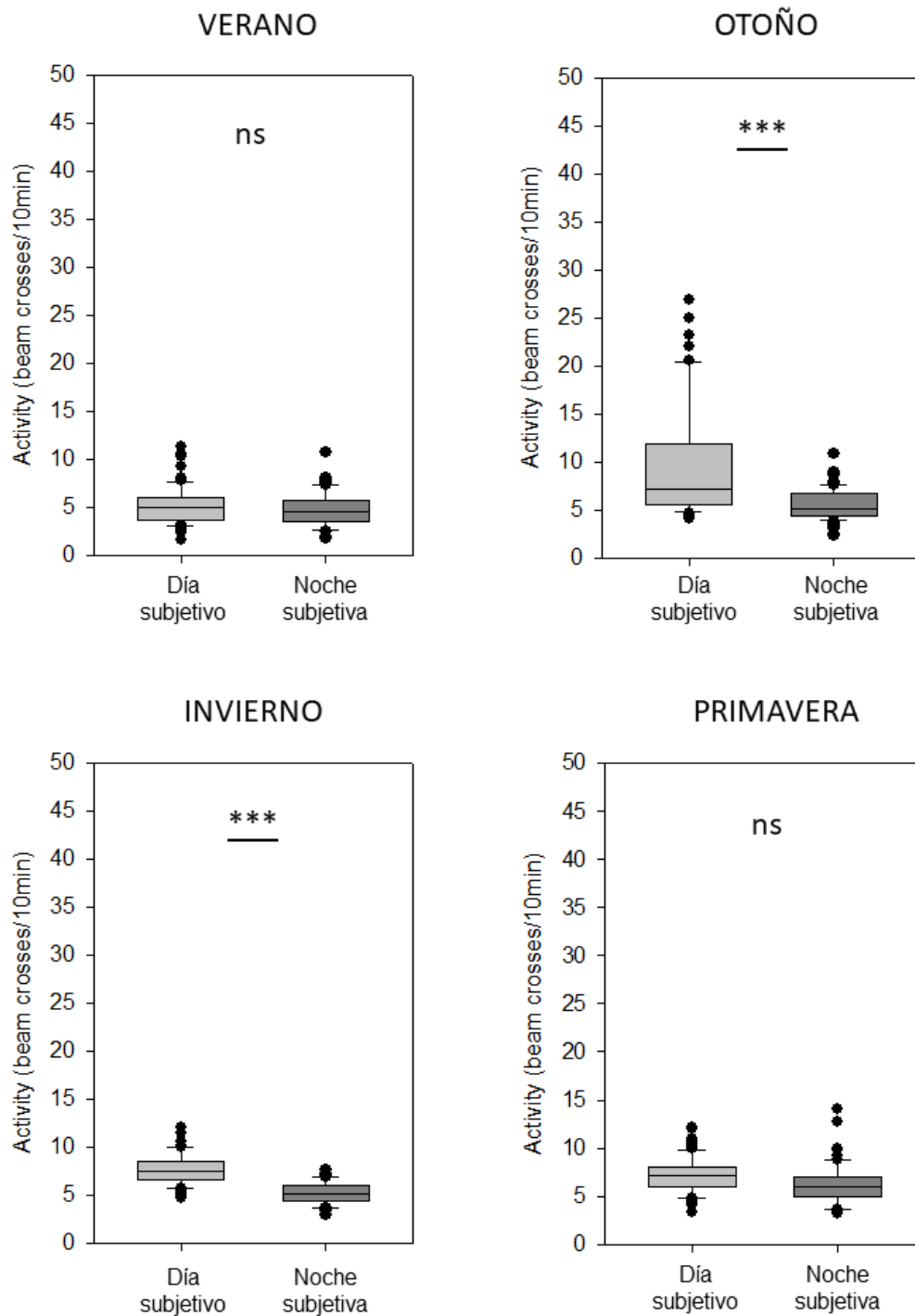
### **3.2 DÍA VS NOCHE**

Las obreras procedentes de laboratorio, en condiciones de DD fueron significativamente más activas durante el día subjetivo en otoño e invierno, con excepción de la estación de verano y primavera donde no hubo diferencias significativas entre el día subjetivo y la noche subjetiva (Figura 9). En ninguna estación existió una mayor actividad durante la noche subjetiva.

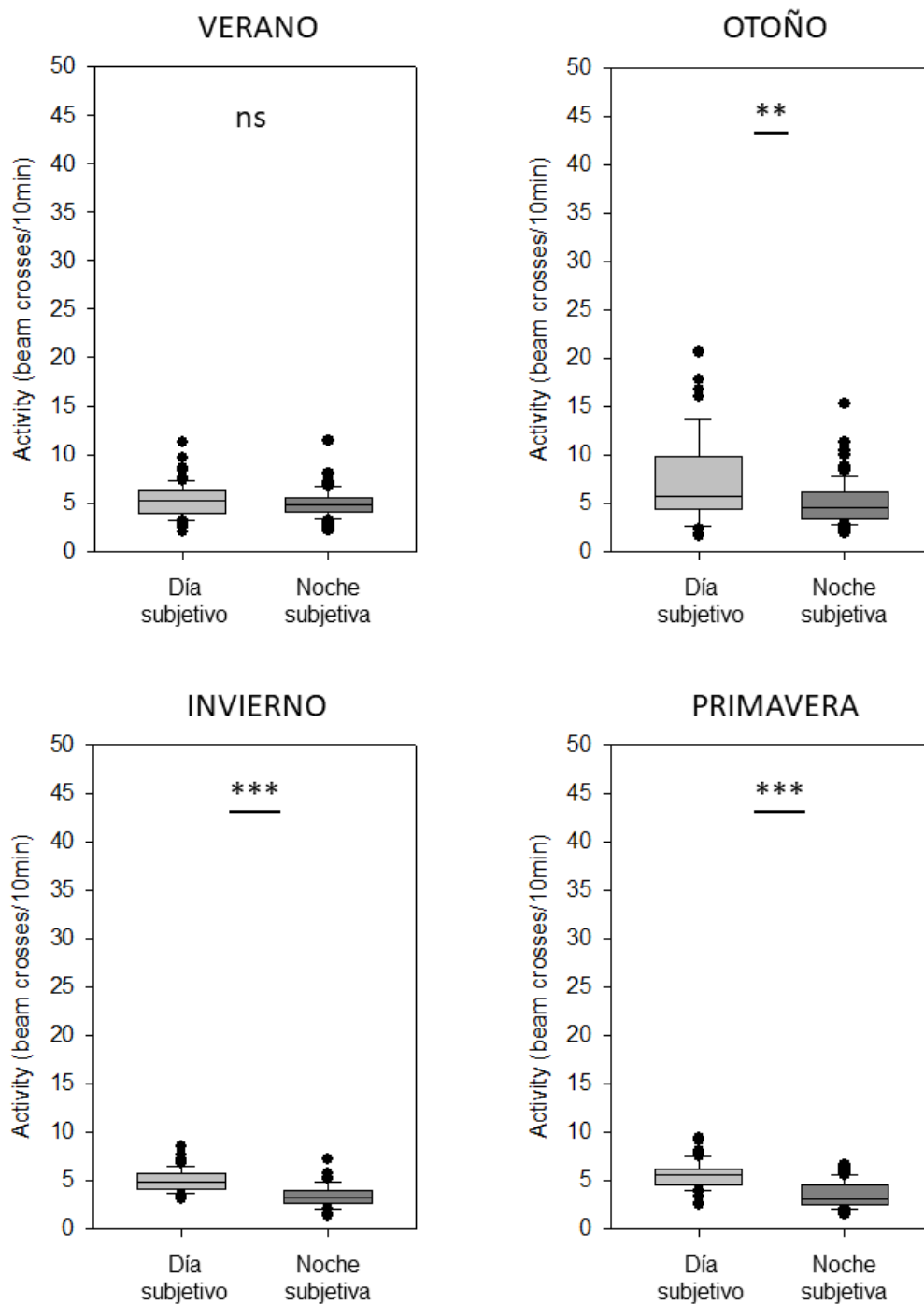
Lo mismo sucedió con las obreras provenientes de campo, y colocadas en DD. Las obreras de campo fueron más activas durante la fase que previamente había correspondido a la fase clara del LD en cada estación del año, con excepción del

verano donde no hubo diferencias significativas entre el día subjetivo y la noche subjetiva (Figura 10). En ninguna estación existió una mayor actividad durante la noche subjetiva.





**Figura 9.** Nivel de actividad (promedio) en día subjetivo y noche subjetiva. Test DD. Obreras provenientes del laboratorio. Wilcoxon Signed Rank Test, Verano:  $Z_{22} = -1,217$ ,  $P = 0,230$ ; Invierno:  $Z_{52} = -5,091$ ,  $P = <0,001$ ; Primavera:  $Z_{30} = -1,633$ ,  $P = 0,105$ . Otoño: Paired t-test,  $t_{29} = 5,198$ ,  $P = <0,001$ .



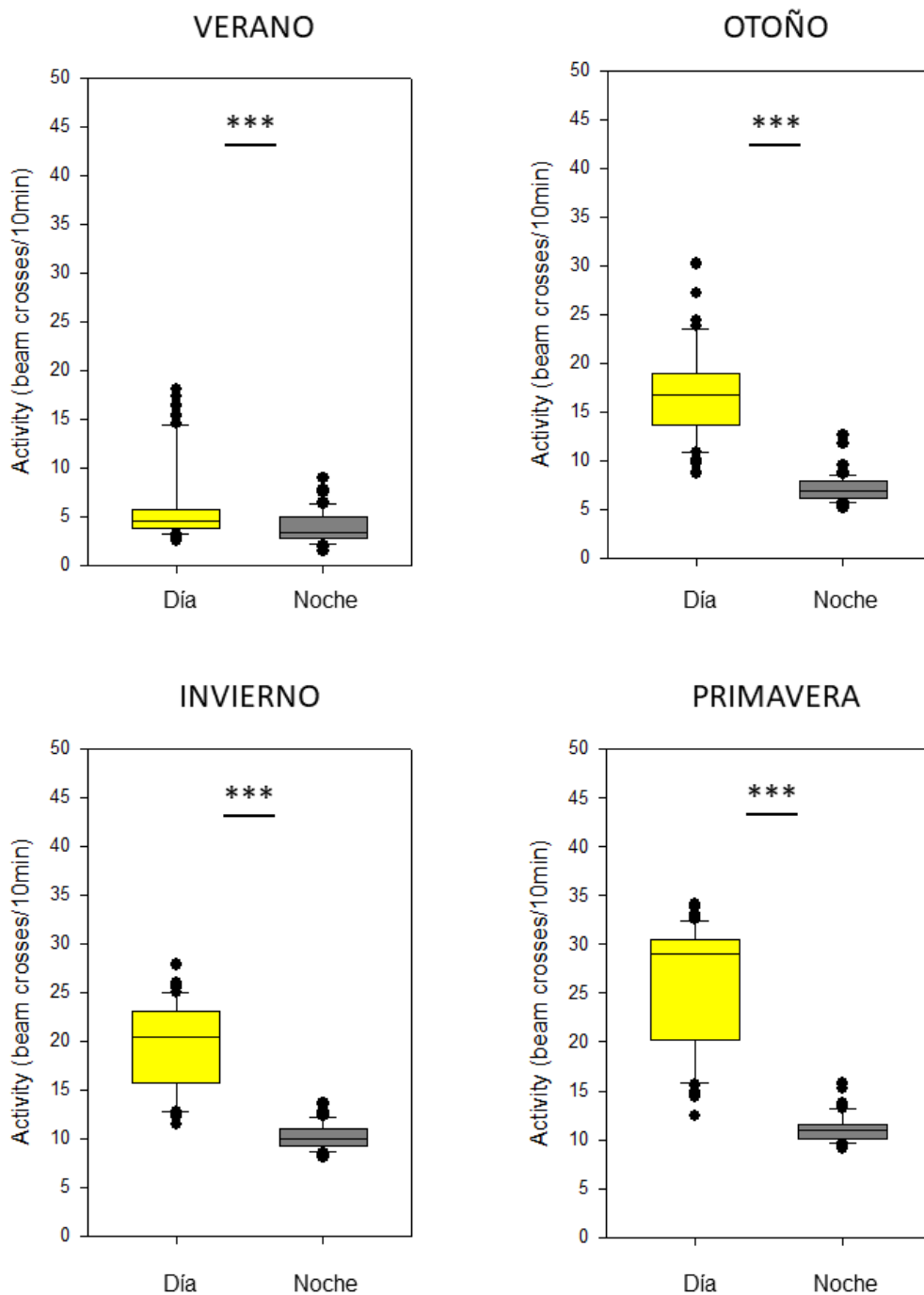
**Figura 10.** Nivel de actividad (promedio) en día subjetivo y noche subjetiva. Test DD. Obreras de provenientes decampo. Paired t-test, Verano:  $t_{28} = 0,823$ ,  $P = 0,418$ ; Otoño:  $t_{21} = 2,985$ ,  $P = 0,007$ ; Invierno:  $t_{53} = 4,762$ ,  $P = <0,001$ ; Primavera:  $t_{39} = 4,884$ ,  $P = <0,001$ .

Estos resultados tienen una gran relevancia dado que, sin estar percibiendo el ciclo diario de luz, las HCH manifestaron un mayor nivel de actividad en el día subjetivo, lo que las haría intrínsecamente diurnas. De esta manera, se cumplió con el objetivo 2 y se respondió la hipótesis 2. Así pues, en este trabajo se prueba por primera vez que el hábito diurno registrado en las HCH estaría controlado por factores endógenos.

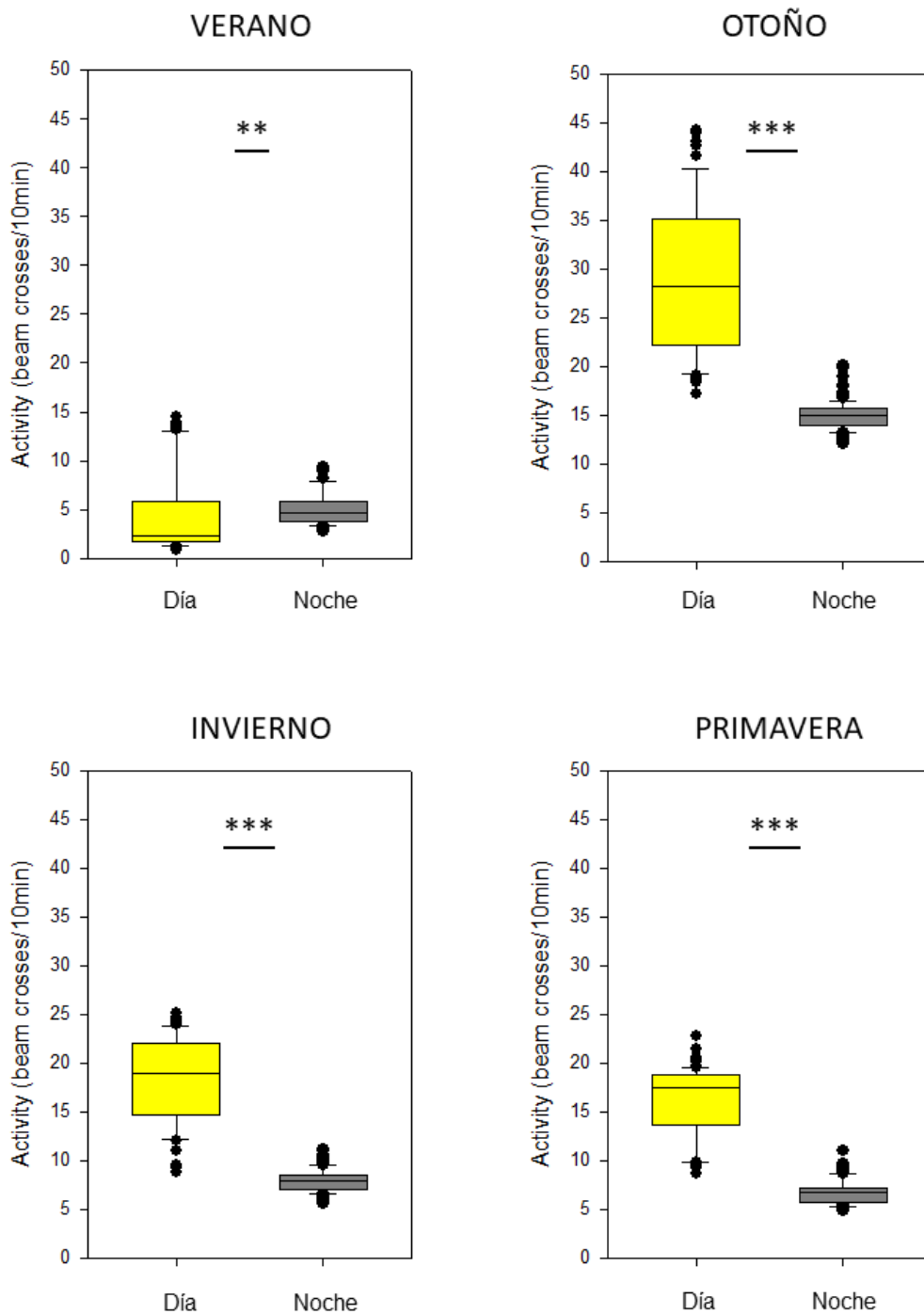
En estudios similares realizados en hormigas no cortadoras, Kay et al. (2018) y Mildner y Roces (2017) demostraron que las obreras de *Camponotus floridanus* y *C. rufipes* son intrínsecamente nocturnas al manifestar una mayor actividad locomotora durante la noche subjetiva en DD. A partir de un estudio de la actividad de obreras de un nido de *Atta cephalotes* de una duración menor a un mes y tomando dos días de ellos como los más representativos, Hodgson (1955) habría sugerido la existencia de un ritmo diurno inherente en las HCH al observar un movimiento de las obreras hacia los orificios de salida del nido antes del amanecer.

De acuerdo a los resultados en condiciones de oscuridad, las HCH serían intrínsecamente diurnas, por lo que sería de esperarse que cuando expuestas a LD, la actividad de las obreras fuera mayor durante la fase clara. Y es exactamente lo que sucedió con las obreras procedentes de laboratorio en el test LD. En cada estación del año se evidenciaron diferencias significativas entre el nivel de actividad de la fase diurna y el nivel de actividad de la fase nocturna, siendo las obreras, más activas durante el día a lo largo del ciclo anual (Figura 11).

Del mismo modo, las obreras provenientes de campo en el test LD fueron más activas durante la fase clara en todas las estaciones del año, a excepción del verano cuando el nivel de actividad promedio de la fase nocturna superó al de la fase diurna (Figura 12).



**Figura 11.** Nivel de actividad (promedio) diurno y nocturno. Test LD. Obreras provenientes de laboratorio. Wilcoxon Signed Rank Test, Verano:  $Z_{61} = -4,802$ ,  $P = <0,001$ ; Otoño:  $Z_{58} = -6,554$ ,  $P = <0,001$ ; Invierno:  $Z_{111} = -7,570$ ,  $P = <0,001$ ; Primavera:  $Z_{154} = -10,376$ ,  $P = <0,001$ .



**Figura 12.** Nivel de actividad (promedio) diurno y nocturno. Test LD. Obreras de campo. Wilcoxon Signed Rank Test, Verano:  $Z_{81} = 3,143$ ,  $P = 0,002$ ; Otoño:  $Z_{54} = -5,885$ ,  $P = <0,001$ ; Invierno:  $Z_{94} = -8,522$ ,  $P = <0,001$ ; Primavera:  $Z_{124} = -8,038$ ,  $P = <0,001$ .

Bajo el estímulo exógeno del ciclo luz-oscuridad (Test LD), tanto en obreras provenientes de laboratorio como en obreras provenientes de campo, las diferencias entre los niveles de actividad diurna y nocturna fueron más marcadas que cuando en oscuridad constante en el ciclo anual (Figura 9, 10, 11 y 12), a excepción de la estación de verano.

En este caso, el ciclo térmico diario experimentado durante las condiciones previas a las condiciones experimentales en las obreras provenientes de campo podría anular el efecto del ciclo diario de luz provocando que las forrajeadoras pasen a ser nocturnas en verano, cuando siempre son diurnas. Posiblemente sea una estrategia de supervivencia para evitar las altas temperaturas registradas durante la fase diurna del día. A pesar de que en Laboratorio estaban en condiciones de temperatura constante, la fase clara en la estación de verano provocaría una disminución de la actividad de las obreras provenientes de campo durante el día.

Así pues, el factor exógeno de la temperatura podría provocar una contraposición con el hábito diurno intrínseco de las HCH, pasando a ser nocturnas durante la estación de verano. Varios trabajos en HCH realizados en ambientes naturales (Mehlhop y Scott 1983, Brown et al 1979, Mintzer 1979, Gamboa 1976, Whitford y Ettershank 1975) sugirieron que, en climas templados, los patrones de actividad de las HCH son claramente dependientes de la variación de la temperatura de acuerdo con cada estación en el ciclo anual donde es común modificar los patrones de actividad de diurnos a vespertinos o nocturnos en los meses de mayores temperaturas. Según Wetterer (1990), en verano las obreras son más activas durante la noche para evitar el estrés por calor y la deshidratación que podrían sufrir por las altas temperaturas ocurridas durante la fase diurna del día.

En un trabajo similar, obreras de *C. floridanus* y *C. rufipes* sincronizaron marcadamente sus ritmos de actividad al ser expuestas a un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, evidenciando así, la importancia del ciclo diario de luz en la regulación del reloj circadiano (Kay et al. 2018, Mildner y Roces 2017). Similarmente obreras de *A. sexdens* que fueron marcadas siendo activas durante la fase diurna o durante la fase nocturna, repitieron el mismo comportamiento a lo largo de los 5 días de observación en condiciones controladas de temperatura, humedad

relativa y un ciclo luz-oscuridad (12:12) (Constantino et al., 2021). De esta manera, el ciclo diario de luz parece ser el factor exógeno más importante en la sincronización de los ritmos diarios de actividad.

De acuerdo a los resultados, en este trabajo se prueba por primera vez que las HCH serían intrínsecamente diurnas. Así pues, el hábito diurno estaría controlado por factores endógenos, sincronizados por el ciclo luz-oscuridad, el factor exógeno más importante en los ritmos circadianos de actividad (variación diaria) de las HCH.

### **3.3 PATRÓN ESTACIONAL DE ACTIVIDAD**

Las obreras procedentes de laboratorio expuestas a oscuridad constante, exhibieron un nivel de actividad base sin diferencias significativas entre estaciones en el ciclo anual (Figura 13). Resultados similares fueron obtenidos en las obreras procedentes de campo en el test DD (Figura 13).

Estos resultados demostrarían que la actividad de las HCH está controlada por factores exógenos. Si en DD, la actividad no es diferente entre las estaciones, significa que es un nivel basal, en el que no hay ningún factor endógeno que provoque que una estación se diferencie mostrando mayores niveles de actividad. O sea que, todo dependería del factor exógeno del fotoperiodo.

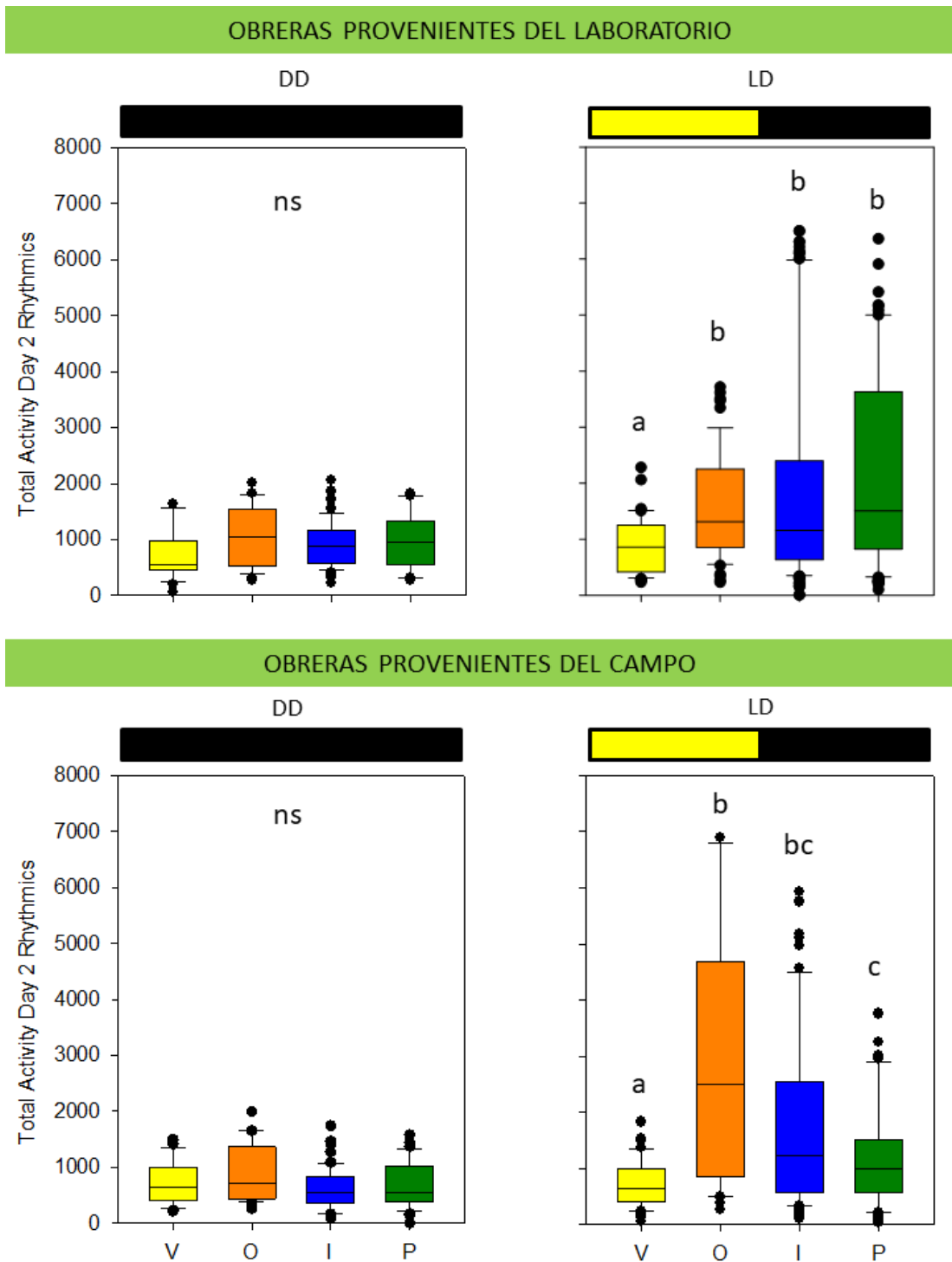
A partir de un estudio de la actividad de obreras de un nido de *Atta cephalotes* realizado por Hodgson (1955), el autor había sugerido la existencia de una actividad inherente en las HCH, sosteniendo que la misma sería suficiente para salir del hormiguero, pero parecería que la salida de las obreras en oscuridad sería menos acelerada en comparación a cuando las hormigas perciben luz.

En el test con ciclo diario de luz (LD), las obreras provenientes de laboratorio exhibieron diferencias significativas en el ciclo anual. La estación de verano registró un nivel de actividad menor que el resto del año. En verano los niveles de actividad fueron bajos y similares a los registrados cuando expuestas a las condiciones DD (Figura 13).

En las obreras procedentes de campo expuestas a las condiciones de LD los resultados fueron similares (Figura 13). Se observaron diferencias significativas en

los niveles de actividad entre estaciones. La estación de verano se diferenci6 significativamente del resto del a6o, registrando los menores valores de actividad en el ciclo anual, similares a los valores registrados cuando fueron expuestas a DD. Si bien no existieron grandes diferencias en el resto del a6o, existiría una leve tendencia hacia una mayor actividad durante la estación de oto6o. Con estos resultados se cumpli6 con el objetivo 3 y se respondi6 la hip6tesis 3.





**Figura 13.** Actividad total acumulada en el ciclo anual, de obreras rítmicas en el día 2 del monitoreo. Obreras provenientes de laboratorio (panel superior) y obreras provenientes del campo (panel inferior), expuestas a oscuridad constante (DD)

(izquierda) y expuestas a ciclos luz-oscuridad (LD) (derecha). Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Dunn's post-hoc test ( $P = <0,001$ ).

Dado que los resultados cuando las hormigas estaban expuestas a un ciclo luz-oscuridad fueron similares entre las obreras provenientes de laboratorio y aquellas provenientes del campo con condiciones previas diferentes en el ciclo térmico diario no así en el fotoperiodo, el patrón estacional de actividad puede ser explicado exclusivamente por el factor exógeno fotoperiodo. En ambos casos (individuos provenientes del laboratorio y del campo) el nivel de actividad durante la estación de verano fue bajo y menor que en el resto del año, algo *a priori* inesperado. El nivel de actividad en DD es igual en todas las estaciones del año. Las diferencias se expresan solo bajo LD, es decir, cuando perciben el ciclo diario de luz. Estos resultados tienen una gran relevancia dado que demuestran el papel protagónico del factor exógeno medioambiental del fotoperiodo en la regulación de los ritmos anuales de actividad en las HCH. De esta manera se cumple con la segunda parte del objetivo 3.

Como sostiene Tschinkel (2011), la principal adaptación al forrajeo que presentan los insectos sociales es la existencia de ciclos diarios y anuales de actividad, lo que les permite sincronizar con las épocas de mayores recursos ambientales y los momentos del día que ofrecen los mejores rangos de actividad, y no forrajear indiscriminadamente durante todo el día, ni todo su ciclo anual como quedó demostrado en las HCH. No obstante, el nivel de actividad registrado por las obreras de *A. lundii* durante la estación de verano fue menor que en el resto del año, algo *a priori* inesperado teniendo en cuenta que en el verano hay una mayor oferta de material vegetal en comparación con el invierno.

Tradicionalmente, las predicciones respecto a la actividad de forrajeo de las cortadoras han intentado ser explicadas por factores exógenos medioambientales de origen climático como la temperatura y la humedad relativa (Nobua-Behrmann et al. 2017, Caldato et al. 2016, Nickele et al. 2016, Viana et al. 2004, Pilati et al. 1997, Farji-Brener 1993, Marschner et al. 1993, Pintera y Zorrilla 1981, Fowler y Robinson 1979). No obstante, el fotoperiodo, no había sido estudiado experimentalmente hasta este trabajo, a pesar de que se reconoce a partir de un artículo que trabaja con una

sola colonia y sin réplicas como el factor principal en la regulación de los patrones de forrajeo en las HCH (Hodgson, 1955).

En este trabajo demostramos por primera vez que existe un factor regulador superior, el fotoperiodo; y que la variación anual en el ciclo diario de luz regula el ciclo anual de actividad en las HCH, independientemente de las variaciones en la temperatura.

Ya que efectivamente el fotoperiodo es el factor exógeno con mayor peso en la regulación de los ritmos diarios y anuales de actividad en las HCH, se recomendaría planificar controles calendario para el manejo de las HCH. Dado que el fotoperiodo no es variable como la temperatura, podríamos saber con exactitud en que meses del año las HCH presentarían mayor actividad de forrajeo (otoño, invierno y primavera) y en qué meses se encontrarían inactivas (verano). De esta manera, se podrían establecer estrategias de manejo tendientes a reducir la cantidad de cebo sin afectar la eficacia del control, aplicando durante los meses de mayor actividad, desde otoño a primavera, donde todo el cebo aplicado sería levantado por las obreras, sin necesidad de reaplicar. En verano habría que evaluar si sería recomendable realizar un control de HCH mediante una validación a campo.

Los resultados obtenidos al analizar el poder de la ritmicidad fueron idénticos a los observados en el nivel anual de actividad y se presentan en el Anexo I.

#### **4. CONCLUSIONES**

Se prueba que las HCH presentan un ritmo circadiano de actividad controlado por un reloj endógeno y el ciclo luz-oscuridad es el factor exógeno más importante en la regulación de la ritmicidad.

Consecuentemente se prueba que las HCH serían intrínsecamente diurnas. Así pues, el hábito diurno estaría controlado por factores endógenos, sincronizados por el ciclo día-noche, el factor exógeno más importante en los ritmos circadianos de actividad (variación diaria) de las HCH.

Por último, los niveles de actividad de forrajeo en HCH varían estacionalmente. Se demuestra que existe un factor regulador superior, el fotoperiodo; y que la variación anual en el ciclo diario de luz regula el ciclo anual de actividad en las HCH, independientemente de las variaciones en la temperatura. De acuerdo con los resultados, se recomienda planificar controles calendario para el manejo de las HCH. En verano habría que evaluar si sería recomendable realizar un control de HCH mediante una validación a campo.

## **5. BIBLIOGRAFÍA**

- Araújo M, Della-Lucia TMC, Picanço MC, Anjos N, Vilela EF. 1998. Polimorfismo e transporte de cargas em *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*. 41 (2-4): 443-446.
- Amante E. 1967. A formiga saúva *Atta capiguara*, praga das pastagens. *O Biológico*. 33 (6): 113-120.
- Amor F, Patrocinio O, Cerdá X, Boulay R. 2011. Solar Elevation Triggers Foraging Activity in a Thermophilic Ant. *Ethology*. 117 (11): 1031-1039. doi: 10.1111/j.1439-0310.2011.01955.x.
- Aschoff J, 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 25: 11-28. doi:10.1101/SQB.1960.025.01.004
- Bloch GJ. 2009. Plasticity in the circadian clock and the temporal organization of insect societies. En: Gadau J, Fewell J. (Eds.). *Organization of Insect Societies - From genome to sociocomplexity*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 402-432.
- Bollazzi M. 2013. Descripción y metodología de los transectos. Segunda parte: tamaño y número de transectos. Informe de consultoría particular. [Datos sin publicar].
- Bollazzi M. 2012. Manejo de *Acromyrmex* en plantaciones forestales en el sur de Sudamérica. In: XXIV Congreso Brasileiro de Entomología, Curitiba, Brasil.
- Bollazzi M, Roces F. 2002. Thermal preference for fungus culturing and brood location by workers of the thatching grass-cutting ant *Acromyrmex heyeri*, (May). *Insectes Sociaux*. 49 (2): 153-157. doi: 10.1007/s00040-002-8295-x.
- Brown JH, Reichman OJ, Davidson DW. 1979. Granivory in Desert Ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 10 (1): 201-227. doi: 10.1146/annurev.es.10.110179.001221.

- Caldato N, Forti LC, Bouchebti S, Lopes JFS, Fourcassié V. 2016. Foraging activity pattern and herbivory rates of the grass-cutting ant *Atta capiguara*. *Insectes Sociaux*. 63 (3): 421-428. doi: 10.1007/s00040-016-0479-x.
- Cantarelli EB, Costa EC, Pezzutti R, da Silva Oliveira LDS. 2008. Quantificação das perdas no desenvolvimento de *Pinus taeda* após o ataque de formigas cortadeiras. *Ciência Florestal*. 18 (1): 39-45. doi: 10.5902/19805098509.
- Cherrett JM. 1989. Leaf-cutting ants. En: Lieth H, Werger MJA. (Eds.). *Tropical Rain Forest Ecosystems - Biogeographical and Ecological Studies*, vol 2. *Ecosystems of the World 14B*. Amsterdam: Elsevier Science. 473-488.
- Cherrett JM. 1986. History of the Leaf-Cutting Ant Problem. En: Lofgren CS, Vander Meer RK. (Eds.). *Fire Ants and Leaf-Cutting Ants - Biology and Management*. Boulder: CRC Press. 18.
- Constantino PB, Valentinuzzi VS, Helene AF. 2021. Division of labor in work shifts by leaf-cutting ants. *Scientific Reports*. 11 (1): 1-9. doi: 10.1038/s41598-021-88005-0.
- Della-Lucia TMC, Gandra LC, Guedes RNC. 2013. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Management Science*. 70 (1): 14-23. doi: 10.1002/ps.3660.
- Farji-Brener AG. 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 (1): 169-177. doi: 10.1034/j.1600-0706.2001.920120.x.
- Farji-Brener AG. 1993. Influencia de la estacionalidad sobre los ritmos forrajeros de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) en una sabana tropical. *Revista de Biología Tropical*. 41: 897-899.
- Forti LC, Boaretto MAC. 1997. Formigas cortadeiras: biologia, ecologia, danos e controle. Botucatu: Departamento de Defesa Fitossanitária, Universidade Estadual Paulista. 61 p.
- Fowler HG, Bernardi JVE, Delabie JC, Forti LC, Pereira da Silva V. 1990. Major Ant Problems of South America. En: Vander Meer RK, Jaffé K. (Eds.). *Applied Myrmecology: A World Perspective*. Boulder: Westview Press. 3-14.

- Fowler HG, Robinson SW. 1979. Foraging by *Atta sexdens* (Formicidae: Attini): seasonal patterns, caste and efficiency. *Ecological Entomology*. 4 (3): 239-247. doi: 10.1111/j.1365-2311.1979.tb00581.x.
- Fowler HG. 1978. Environmental correlates of the foraging of *Acromyrmex crassispinus*. *Ciência e cultura*. 31 (8): 879-882.
- FSC (Forest Stewardship Council). 2015. Principios y criterios del FSC para el manejo forestal responsable. FSC-STD-01-001 V5-2 ES [En línea]. 14 julio de 2016. <https://ic.fsc.org/en/document-center>.
- Gamboa GJ. 1976. Effects of Temperature on the Surface Activity of the Desert Leaf-cutter Ant, *Acromyrmex versicolor versicolor* (Pergande) (Hymenoptera: Formicidae). *The American Midland Naturalist*. 95 (2): 485-491. doi: 10.2307/2424417.
- Gamboa GJ. 1975. Foraging and leaf-cutting of the desert gardening ant *Acromyrmex versicolor versicolor* (Pergande) (Hymenoptera: Formicidae). *Oecologia*. 20 (1): 103-110. doi: 10.1007/BF00364324.
- Giesel A, Boff MIC, Boff P. 2013. Seasonal Activity and Foraging Preferences of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens piriventris* (Santschi) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical Entomology*. 42 (6): 552-557. doi: 10.1007/s13744-013-0160-2.
- Goldman B, Gwinner E, Karsch FJ, Saunders D, Zucker I, Ball G. 2003. Circannual rhythms and photoperiodism. En Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. (Eds.). *Chronobiology, biological time keeping*. Sinauer, Sunderland, MA, EUA. 118 p.
- Gonçalves CR. 1961. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). *Studia Entomologica*. 4 (1-4): 113-180.
- Hodgson ES. 1955. An Ecological Study of the Behavior of the Leaf-Cutting Ant *Atta cephalotes*. *Ecology*. 36 (2): 293-304. doi: 10.2307/1933235.
- Hölldobler B, Wilson EO. 2010. *The Leaf Cutter Ants: Civilization by Instinct.*, New York, London: W. W. Norton & Company. 160.
- Hölldobler B, Wilson EO. 1990. *The Ants*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 712.

- Jofre LE, Medina AI. 2012. Patrones de actividad forrajera y tamaño de nido de *Acromyrmex lobicornis* (Hymenoptera: Formicidae) en una zona urbana de San Luis, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 71 (1-2): 37- 44.
- Jorge C, Martínez G, Gómez D, Bollazzi M. 2016. First record of the eucalypt gall-wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) from Uruguay. *Bosque*. 37 (3): 631-636. doi: 10.4067/S0717-92002016000300020.
- Kay J, Menegazzi P, Mildner S, Roces F, Helfrich-Förster C. 2018. The Circadian Clock of the Ant *Camponotus floridanus* is Localized in Dorsal and Lateral Neurons of the Brain. *Journal of Biological Rhythms*. 33 (3): 255-271. doi: 10.1177/0748730418764738.
- Lewis T, Pollard GV, Dibley GC. 1974a. Rhythmic Foraging in the Leaf-Cutting Ant *Atta cephalotes* (L.) (Formicidae: Attini). *Journal of Animal Ecology*. 43 (1): 129-141. doi: 10.2307/3162.
- Lewis T, Pollard GV, Dibley GC. 1974b. Micro-Environmental Factors Affecting Diel Patterns of Foraging in the Leaf-Cutting Ant *Atta cephalotes* (L.) (Formicidae: Attini). *Journal of Animal Ecology*. 43 (1): 143-153. doi: 10.2307/3163.
- Lopes JF, Brugger MS, Menezes RB, Camargo RS, Forti LC, Fourcassié V. 2016. Spatio-Temporal Dynamics of Foraging Networks in the Grass-Cutting Ant *Atta bisphaerica* Forel, 1908 (Formicidae, Attini). *Plos One*. 11 (1): e0146613. doi: 10.1371/0146613.
- Lutz FE. 1929. Observations on leaf-cutting ants. *American Museum Novitates* no. 388.
- Maciel MAF, Della Lucia TMC, Araújo MS, Oliveira MA. 1995. Ritmo diário de atividade forrageadora da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 24 (2): 371-378. doi: 10.37486/0301-8059.v24i2.1038.
- Marques MD, Golombek D, Moreno C. 2003. “Adaptación Temporal”. En: Marques N, Menna-Barreto L (Eds.). *Cronobiologia: princípios e aplicações*. São Paulo: EDUSP Editora de la Universidad de San Pablo. 55-98.



- Marschner J, Machado V, Diehl-Fleig E. 1993. Variação anual na atividade de corte de *Acromyrmex striatus* (Formicidae, Attini). *Acta Biologica Leopoldensia*. 15 (1): 77-86.
- Martínez G, Bianchi M. 2010. Primer registro para Uruguay de la chinche del eucalipto, *Thaumastocoris peregrinus* Carpintero y Dellapé, 2006 (Heteroptera: Thaumastocoridae). *Agrociencia (Uruguay)*. 14 (1): 15-18.
- McCluskey ES. 1965. Circadian Rhythms in Male Ants of Five Diverse Species. *Science*. 150 (3699): 1037-1039. doi: 10.1126/science.150.3699.1037.
- McNaughton SJ, Sala OE, Oesterheld M. 1993. Comparative Ecology of African and South American Arid to Subhumid Ecosystems. En: Goldblatt P. (Eds.). *Biological relationships between Africa and South America*. New Haven: Yale University Press. 548-567.
- Mehlhop P, Scott N. 1983. Temporal patterns of seed use and availability in a guild of desert ants. *Ecological Entomology*. 8 (1): 69-95. doi: 10.1111/j.1365-2311.1983.tb00484.x.
- Mendes WBA, Freire JAH, Loureiro MC, Nogueira SB, Vilela EF, Della Lucia TMC. 1992. Aspectos ecológicos de *Acromyrmex* (*Moellerius*) *balzani* (Emery, 1980) (Formicidae: Attini) no município de São Geraldo, Minas Gerais. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 21 (2): 155-168. doi: 10.37486/0301-8059.v21i2.778.
- Mermot C, van Hoff E. 2010. Estrategias para el Financiamiento del Manejo Forestal Sostenible (SFM). Informe analítico preparado para Indufor para el Foro de las Naciones Unidas sobre los Bosques. Estudio de caso de país: Uruguay. 61 p.
- Mildner S, Roces F. 2017. Plasticity of Daily Behavioral Rhythms in Foragers and Nurses of the Ant *Camponotus rufipes*: Influence of Social Context and Feeding Times. *Plos One*. 12 (1): e0169244. doi: 10.1371/journal.pone.0169244.
- Mintzer A. 1979. Foraging activity of the Mexican leafcutting ant *Atta mexicana* (F. Smith), in a Sonoran desert habitat (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*. 26 (4): 364-372. doi: 10.1007/BF02223555.

- 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 (3): 225-247. doi: 10.1080/09670874.2012.663946.
- Moore-Ede M, Sulzman FM, Fuller CA. 1984. *The Clocks That Time Us: Physiology of the Circadian Timing System*. Commonwealth Fund Publications. Harvard University Press. 464 p.
- Narendra A, Reid SF, Hemmi JM. 2010. The twilight zone: ambient light levels trigger activity in primitive ants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 277 (1687): 1531-1538. doi: 10.1098/rspb.2009.2324.
- Nickele MA, Reis Filho W, Pie MR, Penteadó SRC. 2016. Daily foraging activity of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) leaf-cutting ants. *Sociobiology*. 63 (1): 645-650. doi: 10.13102/sociobiology.v63i1.902.
- Nobile A. 2008. *Ant Web* [En línea]. 15 de mayo de 2019. <https://www.antweb.org>
- Nobua Behrmann B, Lopez de Casenave J, Milesi FA, Farji-Brener AG. 2017. Coexisting in harsh environments: temperature-based foraging patterns of two desert leafcutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini). *Myrmecological News*. 25: 41-49.
- North RD. 1987. Circadian rhythm of locomotor activity in individual workers of the wood ant *Formica rufa*. *Physiological Entomology*. 12 (4): 445-454. doi: 10.1111/j.1365-3032.1987.tb00771.x.
- Pérez SP, Corley JC, Farji-Brener AG. 2011. Potential impact of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis* on conifer plantations in northern Patagonia, Argentina. *Agricultural and Forest Entomology*. 13 (2): 191-196. doi: 10.1111/j.1461-9563.2010.00515.x.
- Pilati A, Quirán EM, Estelrich HD. 1997. Actividad forrajera de *Acromyrmex lobicornis* Emery (Hymenoptera: Formicidae) en un pastizal natural semiárido de la provincia de La Pampa (Argentina). *Ecología Austral*. 7 (2): 49-56.

- Pintera A, Zorrilla MA. 1981. Circadian and seasonal changes in the foraging activity of the Cuban leaf-cutting ant, *Atta insularis* (Hymenoptera, Formicidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*. 78 (5): 311-317.
- Pittendrigh CS, Daan S. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: I. The stability and lability of spontaneous frequency. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. 106: 223-252.
- Pittendrigh CS. 1961. On Temporal Organization in Living Systems. Harvey Lectures Ser. 56: 93-125.
- Reis MA, Rodrigues Cunha JPA, Zanetti R, Fernandes BV, Rodrigues Reis JM. 2016. Mechanized systematic application of granuleted ants baits in eucalyptus plantations in maintenance phase. *CERNE*. 21 (3): 423-428. doi: 10.1590/01047760201521031331.
- Rockwood LL. 1975. The Effect of Seasonality on Foraging of Two Species of Leaf-Cutting Ants (*Atta*) in Guanacaste Province, Costa Rica. *Biotropica*. 7 (3): 176- 193. doi: 10.2307/2989622.
- Saunders DS. 2002. Insect clocks. En: Steel CGH, Vafopoulou X, Lewis RD. (Eds.). Amsterdam: Elsevier Science. 576.
- Saunders DS. 1982. Photoperiodic induction of pupal diapause in *Sarcophaga argyrostoma*: temperature effects on circadian resonance. *Journal of Insect Physiology*. 28 (4): 305-310. doi:10.1016/0022-1910(82)90041-5.
- Sharma VK, Lone SR, Mathew D, Goel A, Chandrashekar MK. 2004. Possible Evidence for Shift Work Schedules in the Media Workers of the Ant Species *Camponotus compressus*. *Chronobiology International*. 21 (2): 297-308. doi: 10.1081/CBI-120037817.
- SPF (Sociedad de Productores Forestales). 2018. [En línea]. 15 de marzo de 2020. <http://www.spf.com.uy/#uruguay-forestal>.
- Tschinkel WR. 2011. The Organization of Foraging in the Fire Ant, *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Science*. 11 (1): 26. doi: 10.1673/031.011.0126.
- Vasconcelos HL, Cherrett JM. 1995. Changes in leaf-cutting ant populations (Formicidae: Attini) after the clearing of mature forest in Brazilian Amazonia.

- Studies on Neotropical Fauna and Environment. 30 (2): 107-113. doi: 10.1080/01650529509360947.
- Vasconcelos HL. 1990. Foraging activity of two species of leaf-cutting ants (*Atta*) in a primary forest of the Central Amazon. *Insectes Sociaux*. 37 (2): 131-145. doi: 10.1007/BF02224026.
- Viana LR, Santos JC, Arruda LJ, Santos GP, Fernandes GW. 2004. Foraging Patterns of the Leaf-Cutter Ant *Atta laevigata* (Smith) (Myrmicinae: Attini) in an Area of Cerrado Vegetation. *Neotropical Entomology*. 33 (3): 391-393. doi: 10.1590/S1519-566X2004000300019.
- Vilela EF. 1986. Status of Leaf-Cutting Ant Control in Forest Plantations in Brazil. En: Lofgren CS, Vander Meer RK. (Eds.). *Fire Ants and Leaf-cutting Ants: Biology and Management*. New York: CRC Press. 399-408.
- Walcott GN. 1933. *An Economic Entomology of the West Indies*. San Juan: The Entomological Society of Puerto Rico. 688.
- Weber NA. 1972. Gardening Ants: the Attines. *Science*. 178 (4063): 856. doi: 10.1126/science.178.4063.856.
- Weber NA. 1946. The biology of the fungus-growing ants. Part IX. The British Guiana species. *Annual Review of Entomology*. 17: 114-172.
- Weber NA. 1941. The biology of the fungus-growing ants. Part VII. The Barro Colorado Island, Canal Zone, species. *Annual Review of Entomology*. 12: 93- 130.
- Wetterer JK. 1990. Diel changes in forager size, activity, and load selectivity in a tropical leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. *Ecological Entomology*. 15 (1): 97-104. doi: 10.1111/j.1365-2311.1990.tb00788.x.
- Whitford W, Ettershank G. 1975. Factors Affecting Foraging Activity in Chihuahuan Desert Harvester Ants. *Environmental Entomology*. 4 (5): 689-696. doi: 10.1093/ee/4.5.689.
- Zanetti R, Zanuncio JC, Santos JC, Paiva da Silva WL, Ribeiro GT, Lemes PG. 2014. An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations. *Forests*. 5 (3): 439- 454. doi: 10.3390/f5030439.

- Zanetti R, Zanuncio JC, Vilela EF, Leite HG, Jaffé K, Oliveira AC. 2003. Level of Economic Damage for Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Eucalyptus Plantations in Brazil. *Sociobiology*. 42 (2): 433–442.
- Zanetti R, Carvalho GA, Santos A, Souza Silva A, Godoy MS. 2002. Manejo integrado de formigas cortadeiras. Universidade Federal de Lavras [En línea]. Brazil, MG, pp.16. 25 de mayo, 2015.  
<http://www.den.ufla.br/index.php/graduacao/get103-manejo-integrado-de-pragas-florestais>.
- Zanuncio JC, Lemes PG, Antunes LR, Maia JLS, Mendes JEP, Tanganelli KM, Salvador JF, Serrão JE. 2016. The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. *Annals of Forest Science*. 73 (2): 205-214. doi: 10.1007/s13595-016-0548-3.

## **6. ANEXOS**

### **6.1 PODER DE LA RITMICIDAD**

Se evaluó el poder de la ritmicidad tanto en obreras de laboratorio como obreras de campo en LD y DD, el cual compara dentro de cada día la diferencia entre el máximo y mínimo nivel de actividad registrado.

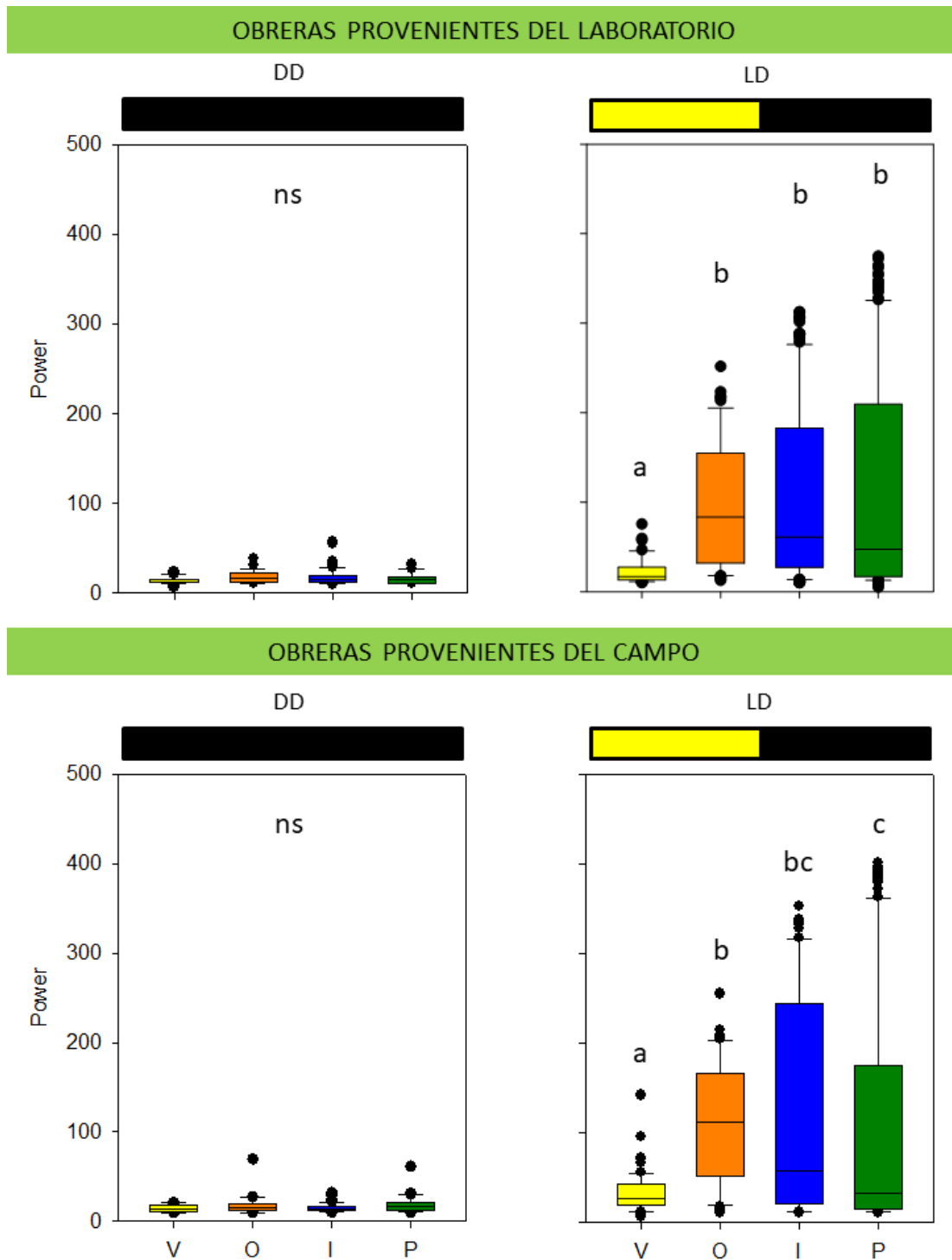
Las obreras provenientes de laboratorio cuando mantenidas en DD no evidenciaron diferencias significativas respecto al poder en el ciclo anual (Figura 14). Resultados similares ocurrieron con las obreras procedentes de campo. En oscuridad constante se observa un nivel base en el poder de la ritmicidad.

Estos resultados concuerdan con los niveles de actividad registrados en DD. Las HCH mantienen un nivel de actividad base sin diferencias en el ciclo anual en ausencia del ciclo luz-oscuridad, observándose así un nivel base en el poder de la ritmicidad sin diferencias en el ciclo anual.

Estos resultados demostrarían que la actividad de las HCH está controlada por factores exógenos. Si en DD, el poder de la ritmicidad no es diferente entre las estaciones, significa que es un nivel basal, en el que no hay ningún factor endógeno que provoque que una estación se diferencie mostrando mayores niveles de poder. O sea que, todo dependería del factor exógeno del fotoperiodo.

A partir de un estudio de la actividad de obreras sobre los caminos de forrajeo de un nido de *Atta cephalotes*, Hodgson (1955) sugirió la existencia de una actividad inherente en las HCH, sosteniendo que la misma sería suficiente para salir del hormiguero, pero parecería que la salida de las obreras en oscuridad sería menos acelerada en comparación a cuando las hormigas reciben luz.

En condiciones de LD, el poder de la ritmicidad en obreras provenientes de laboratorio se diferenció significativamente en el ciclo anual del mismo modo que sucedió con las obreras procedentes de campo (Figura 14). La estación de verano registró los menores niveles de poder en el ciclo anual, con valores similares a los registrados en DD.



**Figura 14.** Poder de la ritmicidad. Obreras provenientes de laboratorio (panel superior) y obreras provenientes del campo (panel inferior), expuestas a oscuridad constante (DD) (izquierda) y expuestas a ciclos luz-oscuridad (derecha). Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Dunn's post-hoc test ( $P = <0,001$ ).

Dado que los resultados en LD fueron similares en ambas poblaciones (procedentes de laboratorio y de campo) con condiciones previas diferentes en el ciclo térmico diario no así en el fotoperiodo, el poder de la ritmicidad puede ser explicado exclusivamente por el factor exógeno fotoperiodo.

A pesar de que el factor exógeno del fotoperiodo no ha sido estudiado experimentalmente, y la actividad de forrajeo ha intentado ser explicada por los factores exógenos temperatura y humedad relativa (Nobua-Behrmann et al. 2017, Caldato et al. 2016, Nickele et al. 2016, Viana et al. 2004, Pilati et al. 1997, Farji-Brener 1993, Marschner et al. 1993, Pintera y Zorrilla 1981, Fowler y Robinson 1979), según Hodgson (1955), el fotoperiodo sería el factor principal en la regulación de los patrones de forrajeo en HCH.

Estos resultados guardan una estrecha relación con la variación anual en los niveles de actividad. De la misma forma que sucedió en el patrón estacional de actividad, la estación de verano registró los menores niveles de poder en el ciclo anual cuando expuestas a LD. Existe una baja magnitud entre la máxima actividad y la mínima actividad, y esto se refleja en un bajo nivel de actividad (Figura 13, Test LD). En otoño, invierno y primavera, el poder de la ritmicidad es alto y mayor que en verano, lo mismo que sucede con los niveles de actividad registrados en dichas estaciones (Figura 13, Test LD).

Así pues, estos resultados indicarían que el fotoperiodo sería efectivamente el factor exógeno más importante en la regulación de los patrones de forrajeo en HCH.





## Activity rhythms in leaf cutter ants *Acromyrmex lundii*: effect of the photoperiod

### Ritmos de actividad en las hormigas cortadoras de hojas *Acromyrmex lundii*: efecto del fotoperiodo

### Ritmos de atividade em formigas cortadoras *Acromyrmex lundii*: efeito do fotoperíodo

Katzenstein, G<sup>1</sup>; Martínez, G<sup>2</sup>; Bollazzi, M<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Protección Vegetal, Montevideo, Uruguay.

<sup>2</sup>INIA, Laboratorio de Entomología, Tacuarembó, Uruguay.

#### Editor

Name Surname  
Organization, city,  
country.  
ORCID  
<https://orcid.org/0000-0000-0000-0000>

#### Correspondence

Name Surname,  
e-mail

**Received** dd month  
yyyy

**Accepted** dd month  
yyyy

**Published** dd month  
yyyy

#### Citation

Katzenstein G, Martínez G, Bollazzi M.  
Activity rhythms in leaf cutter ants *Acromyrmex lundii*: effect of the photoperiod. Agrocienza Uruguay [Internet]. yyyy [cited dd mmm yyyy];v(i):artículo. Available from: <http://agrocienzauruguay.ojs/index.php/agrocienza/article/view/xx>



## Abstract

The determination of which would be the appropriate times of the year to carry out leaf cutter ants (LCA) controls should be carried out considering that the intra-annual variations in foraging patterns are controlled by endogenous foraging regulation factors (circadian activity rhythms regulated by internal markers) and exogenous environmental factors synchronizing these endogenous rhythms. The objective of this work was to study how endogenous and exogenous factors influence the level of daily activity exhibited by LCA of the genus *Acromyrmex* during the annual cycle. During the experiments we worked with two populations of *Acromyrmex lundii*, workers from the field and lab. The field workers were "entrained" under natural conditions of photoperiod and daily thermal cycle, and the lab workers were "entrained" from birth at a controlled temperature of 25 °C and natural photoperiod. The daily rhythm of individual activity was compared in the laboratory between these two populations, and for the 4 seasons of the year, in a test with a daily cycle of natural light following the annual photoperiod (Light-Dark, LD) and in a test with darkness 24h (Dark-Dark, DD), both at 25 °C. In this work we show that there is a higher regulatory factor, the photoperiod; and that the annual variation in the daily cycle of light regulates the annual cycle of activity in LCA, independently of the variations in temperature. The existence of an endogenous circadian clock that controls activity patterns in LCA, which proved to be intrinsically diurnal, is proven.

**Keywords:** *Acromyrmex lundii*, lab, field, LD, DD

## Resumen

La determinación de cuáles serían los momentos adecuados del año para hacer los controles de hormigas cortadoras de hojas (HCH) se debe realizar considerando que las variaciones intra-anales en los patrones de forrajeo están controladas por factores endógenos de regulación del forrajeo (ritmos circadianos de actividad regulados por marcadores internos) y factores exógenos ambientales sincronizadores de estos ritmos endógenos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar cómo influyen los factores endógenos y exógenos en el nivel de actividad diario exhibido por HCH del género *Acromyrmex* durante el ciclo anual. Durante los experimentos se trabajó con dos poblaciones de obreras de *Acromyrmex lundii* provenientes del campo y laboratorio. Las obreras de campo fueron "entrenadas" bajo condiciones naturales de fotoperiodo y ciclo térmico diario, y las obreras de laboratorio fueron "entrenadas" desde su nacimiento a temperatura controlada a 25°C y fotoperiodo natural. El ritmo diario de actividad individual se comparó en laboratorio entre estas dos poblaciones, y para las 4 estaciones del año, en un test con un ciclo diario de luz natural siguiendo el fotoperiodo anual (Light-Dark, LD) y en un test con oscuridad 24h (Dark-Dark, DD), ambos a 25°C. En este trabajo demostramos que existe un factor regulador superior, el fotoperiodo; y que la variación anual en el ciclo diario de luz regula el ciclo anual de actividad en las HCH, independientemente de las variaciones en la temperatura. Se prueba la existencia de un reloj circadiano endógeno que controla patrones de actividad en HCH, las cuales demostraron ser intrínsecamente diurnas.

**Palabras clave:** *Acromyrmex lundii*, laboratorio, campo, LD, DD



## Resumo

A determinação de quais seriam as épocas do ano adequadas para a realização do controle da formiga cortadeira de folhas (FCF) deve ser realizada considerando que as variações intra- anuais nos padrões de forrageamento são controladas por fatores endógenos de regulação de forrageamento (ritmos circadianos de atividade regulados por marcadores internos) e fatores ambientais exógenos que sincronizam esses ritmos endógenos. O objetivo deste trabalho foi estudar como fatores endógenos e exógenos influenciam o nível de atividade diária exibido por FCF do gênero *Acromyrmex* durante o ciclo anual. Durante os experimentos, trabalhamos com duas populações de trabalhadores do *Acromyrmex lundii* do campo e do laboratório. Os trabalhadores de campo foram "treinados" em condições naturais de fotoperíodo e ciclo térmico diário, e os trabalhadores de laboratório foram "treinados" desde o nascimento a uma temperatura controlada de 25 ° C e fotoperíodo natural. O ritmo diário de atividade individual foi comparado em laboratório entre essas duas populações, e para as 4 estações do ano, em um teste com um ciclo diário de luz natural seguindo o fotoperíodo anual (Light-Dark, LD) e em um teste com escuridão 24 h (Dark-Dark, DD), ambos a 25 ° C. Neste trabalho mostramos que existe um fator regulatório superior, o fotoperíodo; e que a variação anual do ciclo diário de luz regula o ciclo anual de atividade no FCF, independentemente das variações de temperatura. Está comprovada a existência de um relógio circadiano endógeno que controla os padrões de atividade do FCF, que se mostrou intrinsecamente diurno.

**Palavras-chave:** *Acromyrmex lundii*, laboratório, campo, LD, DD.

## 1. Introduction

Changes in activity levels throughout the year in social insects are regulated by endogenous factors, such as circadian activity rhythms controlled by internal markers, but synchronized by seasonal changes in climatic and environmental conditions, such as temperature and photoperiod<sup>(1)</sup>.

To date, there is little literature on the effect of endogenous factors on foraging patterns in leaf cutter ants (LCA). However, in a work carried out by Constantino and others<sup>(2)</sup>, where the daily variation in the foraging activity of 6 laboratory colonies of LCA *Atta sexdens* was studied under controlled conditions of temperature, relative humidity and photoperiod, it was

observed that the workers that were marked being active during the diurnal phase or during the night phase, they repeated the same behavior throughout the 5 days of observation. This result could suggest that daily foraging activity is controlled by an internal clock synchronized by the photoperiod.

On the other hand, for ants of the genus *Camponotus* Mayr 1861 it is known that the circadian rhythms of activity are effectively regulated thanks to the presence of an endogenous clock that controls activity patterns<sup>(3)(4)</sup>.

Weather conditions are considered essential in determining foraging activity patterns both in LCA<sup>(5)(6)</sup> and in other ant species<sup>(7)</sup>.



In temperate climates, the LCA activity patterns are clearly dependent on the variation in temperature according to each season in the annual cycle, where it is common to observe modifications of the activity patterns from day to evening or night in the months of higher temperatures<sup>(8)(9)(10)(11)(12)</sup>. According to Wetterer<sup>(13)</sup> the change of the pattern to nocturnal during the summer would allow to avoid the heat stress and the dehydration that the LCA could suffer during the day.

To date, almost all the research work on foraging patterns in LCA has been the product of studies carried out exclusively at the field level in natural environments<sup>(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)</sup> and urban<sup>(24)</sup>. In this way, research works on the annual rhythms (annual variation) and circadian rhythms (daily variation) of LCA activity have been correlated almost exclusively with the environmental parameters of temperature and relative humidity<sup>(14)(15)(16)(17)(20)(22)</sup>. However, exogenous factors, such as the photoperiod, have not been studied experimentally, although it has long been recognized as the main factor in regulating foraging patterns in LCA<sup>(23)</sup>.

Thus, there is a gap in knowledge about the effect of other exogenous factors such as the photoperiod on LCA, which should be studied *in vitro*.

In this work we seek to determine if there is a higher regulatory factor, the photoperiod, that is, to determine if the annual variation in the daily light cycle regulates the annual cycle of activity in LCA regardless of variations in temperature.

According to the review, the hypothesis is that LCA have a circadian rhythm of activi-

ty controlled by an endogenous clock, are intrinsically diurnal and their level of foraging activity varies seasonally. According to the hypothesis, the general objective is to study in LCA of the genus *Acromyrmex* how endogenous and exogenous factors influence the level of daily activity exhibited during the annual cycle.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Study species

For this work, one of the most representative species of the genus *Acromyrmex*, the species *Acromyrmex lundii* (common black ant), was used. It is one of the most abundant species in the southern region of the country. They can attack almost all cultivated species, cut and carry from leaves, flowers and even fruits. Nests are normally underground, so they are invisible to the naked eye, except for foraging trails and nest entry or exit holes.

### 2.2 Collection of workers

Workers from two sources were used: field workers and lab workers. The field workers came from the campus of the Facultad de Agronomía (34 ° 50 '13 "S / 56 ° 13' 16" W). The species of interest was identified following the Gonçalves key<sup>(25)</sup> and the colonies present in the University park were located and numbered to later collect workers on the foraging trails. On the other hand, we worked with workers from three adult colonies raised in the lab since the founding queen for 7 years, so all the workers were born in the lab. The founding queen was collected in the vicinity of Barker; Colonia department (34 ° 15 '45' 'S / 57 ° 27' 57 " W).



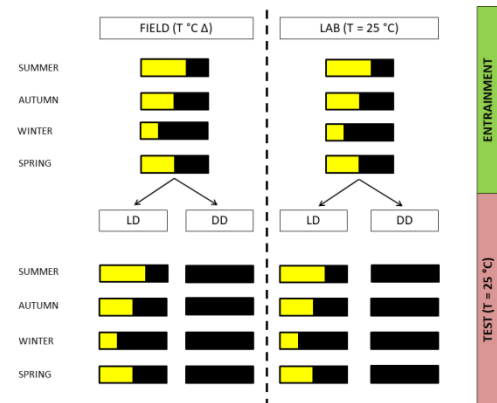
Field and lab workers differ in their entrainment. On the one hand, the field workers were entrained from birth under natural conditions of photoperiod and daily thermal cycle, that is, they experienced temperature changes throughout the year as well as natural variation in the daily light cycle. On the other hand, the lab workers were entrained from birth at a controlled temperature of 25 °C (optimal temperature) and natural photoperiod, so the only variation they experienced was that given by the photoperiod in our latitude along the year.

The collection of field workers was carried out when they were foraging on the trails. A soft clamp was used to avoid damaging the individuals and plastic jars coated with vaseline on the walls so that the collected workers could not escape. In order for the sample of field workers to be representative of the species, it was tried to vary from colony in each collection during the experiments. In the case of lab workers, workers from each of the three existing colonies were used in each experiment.

### 2.3 Experimental conditions

The experiments were carried out under laboratory conditions (Figure 1). Two laboratories were set up to study the endogenous activity rhythms of the workers (both the field and lab workers). In both cases the temperature remained controlled at 25 °C. In one laboratory was carried out the Test with a daily cycle of natural light (Light-Dark, LD), variable according to the season of the year. In the other laboratory was carried out the Test with 24 h darkness (Dark-Dark, DD). In both Tests (LD and DD) the daily activity rhythms of field and lab workers were studied simultane-

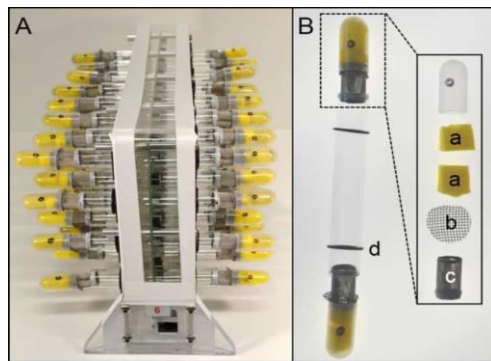
ously during the 4 seasons of the annual cycle.



**Figure 1.** Scheme of the experimental design. The bars represent the daily light cycle experienced by the workers for each case. The yellow bar represents the daytime (light) phase and the black bar the nighttime (dark) phase. In LD, the light / dark cycle varies according to the season of the year, while in DD the darkness remains constant 24 h.

### 2.4 Activity monitors

The TriKinetics activity monitors ([www.trikinetics.com](http://www.trikinetics.com)) were used to study the daily activity rhythms of the LCA. These monitors are specially trained to record the individual activity of up to 32 ants simultaneously (Figure 2). They are equipped with a series of infrared sensors that detect the movement of the workers. A test tube with two tips that function as feeders is placed in each recording capsule. Only one worker is placed in each tube. In this way, a complete monitor will contain 32 ants. Four TriKinetics activity monitors were available for this study. TriKinetics activity monitors are connected to a computer and locomotive activity is recorded using the DAMSystem308 software. The time between each activity record was 10 minutes.



**Figure 2.** (A) TriKinetics activity monitor with 32 recording capsules. (B) Test tube with feeders attached at both ends. Photo: G. Katzenstein.

### 2.5 Experimental procedure

The duration of each activity monitoring was 8 days, and at least 3 were carried out per season during the annual cycle for field and lab workers in the LD and DD tests. The workers were fed every other day during the 8 days of activity monitoring. The food consisted of sugar water obtained from dilution of 10 g of sugar in 100 ml of water. The dose of sugar water supplied to each worker was 0.1 ml, distributed in 0.05 ml at each end of the glass tube. To keep the relative humidity above 70% and thus avoid dehydration and death of the ants, a damp towel was kept under the monitors and a plastic box was placed above them during the time of the activity monitoring. After the activity monitoring is finished, the user must stop the DAMSystem308 software. Inside the software there is a folder where text files are generated after each activity monitoring. From an activity monitor, a text file is generated with the record of the individual activity of the workers.

### 2.6 Data analysis

The variable measured in the experiments was the daily activity of individual workers of *Acromyrmex lundii*. From individual activity, the existence of rhythmicity was determined, daytime activity was compared with nighttime activity, and the level of activity between seasons in the annual cycle was compared. The first day of activity monitoring was considered as a day of adjustment of the workers to the experimental conditions, so it was discarded for the data analysis. For the determination of rhythmicity, the 7 days were needed, while for the comparison between day and night activity and the comparison of the level of activity between seasons, by convention day 2 was used. In this study,  $n$  is the individual, that is, a worker, therefore, for the data to be reliable, a minimum  $n$  of 30 lab and field workers were needed for each test (LD and DD) in each season of the year. To determine the existence of a circadian rhythm of activity in LCA, the statistical software ActogramJ (<https://bene51.github.io/ActogramJ/>) was used. With this, the period length of each worker was measured using the Lomb-Scargle-method ( $\alpha = 0.5$ ). In this way we can know if they have a period length close to 24 h, which would indicate a circadian rhythm of activity. Subsequently, to determine to what extent rhythmicity is influenced by exogenous photoperiod and temperature factors, a Chi-square ( $X^2$  test,  $P = <0.001$ ) was performed between lab and field workers for each test (LD and DD) in each season of the year. To determine if LCA are intrinsically diurnal or nocturnal, the day / night activity levels of lab and field workers were compared for each Test (LD and DD) in each season of the

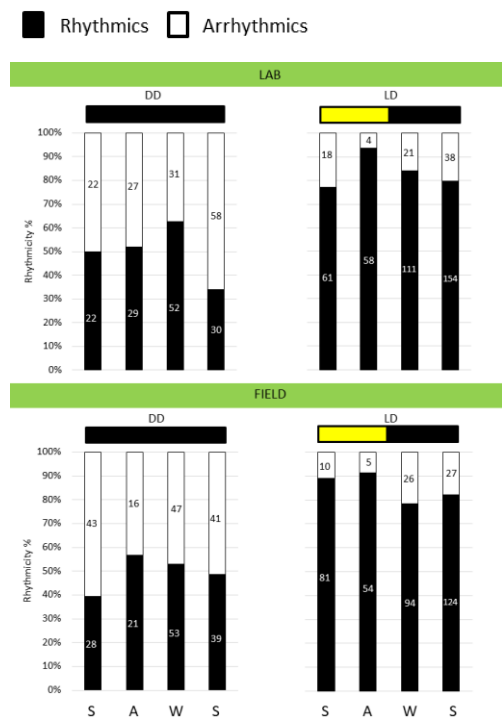


year using the statistical software SigmaPlot by Paired t-test or Wilcoxon Signed Rank Test ( $P = <0.001$ ). To determine if the level of foraging activity varies seasonally, the levels of activity between seasons in the annual cycle in lab and field workers were compared for each Test (LD and DD) using the statistical software SigmaPlot by the Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks and Dunn's post-hoc test ( $P = <0.001$ ).

### 3. Results

#### 3.1 Rhythmicity

Approximately 50 % of all workers from the lab in the 24 h dark test (DD) exhibited a circadian rhythm of activity throughout the year (Figure 3). The same occurred with the workers from the field in the 24 h dark test (DD). Of the total of workers experienced in each season, approximately 50% exhibited a circadian rhythm of activity (Figure 3). More than 70% of the workers from the lab in the daily light cycle test (LD) exhibited a circadian rhythm of activity in each season of the year (Figure 3). In the case of field workers in the daily light cycle test (LD), the results were similar. More than 80% of field workers exhibited rhythmicity in each season of the year (Figure 3). To determine to what extent rhythmicity is influenced by exogenous photoperiod and temperature factors, a Chi-square ( $X^2$  test,  $p = 0.001$ ) was performed between lab and field workers for each test (LD and DD) in every season of the year. The results did not give significant differences between field workers and laboratory workers despite the specific cases marked in gray (Table 1).



**Figure 3.** Percentage of rhythmicity in lab and field workers in the 24 h dark test (DD) and in the daily light cycle test (LD). Lomb-Scargle-method, significance level  $\alpha = 0,5$ ; ActogramJ.

Origin:	LAB		FIELD		LAB		FIELD	
Entrainment:	Light cycle		Light and thermal cycle		Light cycle		Light and thermal cycle	
Test:	DD				LD			
Rhythmicity:	yes	no	yes	no	yes	no	yes	no
Summer	50	50	39	61	77	23	89	11
Autumn	52	48	57	43	94	6	92	8
Winter	63	37	53	47	84	16	78	22
Spring	34	66	49	51	80	20	82	18

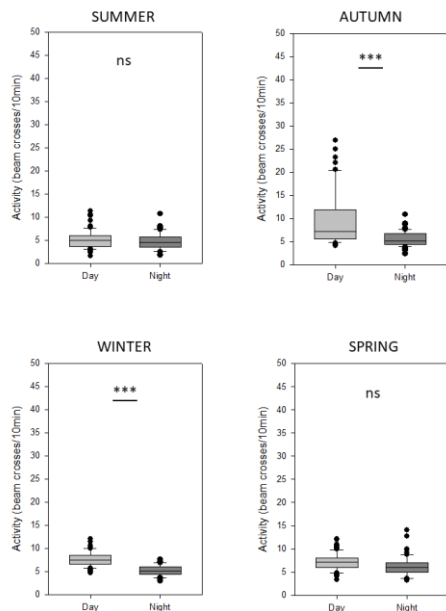
**Table 1.** Chi-square between laboratory workers and field workers for each test (LD and DD) in each season of the year. Within the same DD or LD Test, the marked cells (gray) showed significant differences between lab and field,  $X^2$  test,  $p = 0.001$ .

#### 3.2 Day vs night

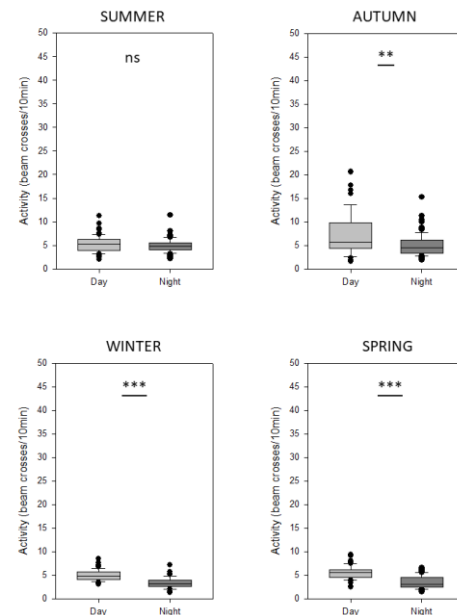
Workers from lab in the 24 h dark test (DD) were significantly more active during the



daytime phase in autumn and winter, with the exception of the summer and spring season, where there were no significant differences in the average diurnal activity level and nocturnal (Figure 4). The same happened with workers from field in the 24 h dark test (DD). Field workers were more active during the daytime phase in each season of the year, with the exception of the summer where there were no significant differences between the daytime and nighttime phases (Figure 5).



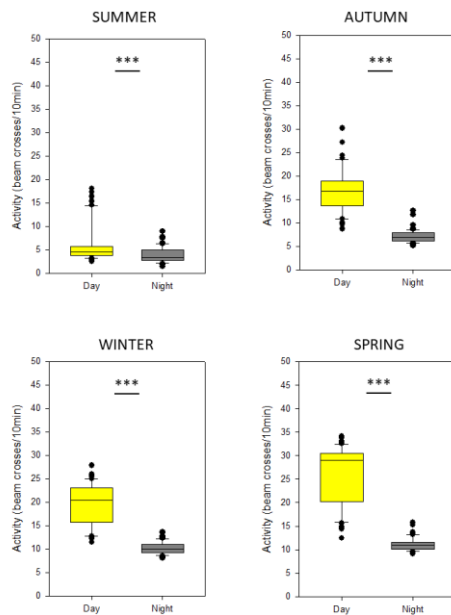
**Figure 4.** Activity level (average) day and night. Test DD. Lab workers. Wilcoxon Signed Rank Test ( $P = <0,001$ ).



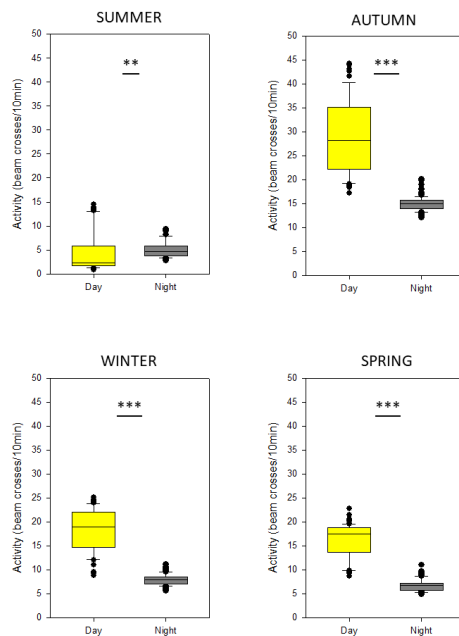
**Figure 5.** Activity level (average) day and night. Test DD. Field workers. Paired t-test ( $P = <0,001$ ).

Lab workers in the daily light cycle test (LD) showed significant differences between the level of activity in the daytime phase and the level of activity in the nighttime phase, with the workers being more active during the daytime phase throughout the annual cycle (Figure 6). Similarly, workers from the field in the daily light cycle test (LD) were more active during the daytime phase in all seasons of the year, with the exception of summer where field workers were more active during the nighttime phase (Figure 7).





**Figure 6.** Activity level (average) day and night. Test LD. Lab workers. Wilcoxon Signed Rank Test ( $P = <0,001$ ).

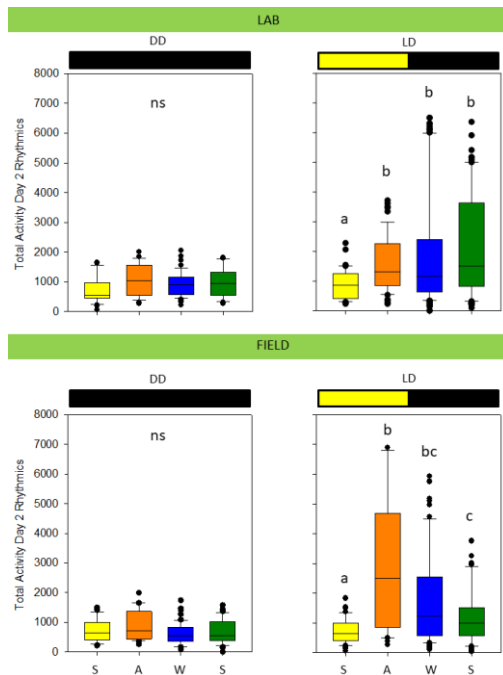


**Figure 7.** Activity level (average) day and night. Test LD. Field workers. Wilcoxon Signed Rank Test ( $P = <0,001$ ).

### 3.3 Seasonal pattern of activity

Lab workers in the 24 h dark test (DD), exhibited a base activity level without significant differences between seasons in the annual cycle (Figure 8). Similar results were obtained in the workers from the field in the test with constant darkness (DD) (Figure 8).

In the daily light cycle test (LD), lab workers exhibited significant differences in the annual cycle. Summer season registered lower level of activity than the rest of the year. In summer, the activity levels were low and similar to those recorded in the 24 h dark test (DD) (Figure 8). The results in the daily light cycle test (LD) were similar in field workers. Significant differences were observed in activity levels between seasons. Summer season was significantly different from the rest of the year, registering the lowest activity levels in the annual cycle, similar to the values recorded in the 24 h dark test (DD). Although there were no major differences in the rest of the year, there would be a slight trend towards greater activity during the autumn.



**Figure 8.** Total activity accumulated in the annual cycle. Lab workers and field workers in Test with 24 h dark (DD) and in Test with daily light cycle (LD). Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Dunn's post-hoc test ( $P = <0,001$ ).

## 4. Discussion

### 4.1 Rhythmicity

The rhythmicity values in the DD test in lab workers and field workers are similar to those recorded in previous studies carried out in a species of non-cutting ant *Camponotus rufipes*, where approximately 50 % of the workers exhibited a circadian rhythm of activity in the 24 h dark test (DD)<sup>(4)</sup>. Lab and field workers then present a circadian rhythm of activity even in the absence of the most powerful external signal; the daily cycle of light<sup>(1)</sup>. These results would indicate the existence of an endogenous clock that controls activity patterns in LCA. Similar results were reported in numerous non-cutter ants, where

isolated workers exhibited a strongly marked circadian rhythm in locomotor activity, evidencing the existence of an endogenous clock<sup>(26)(27)(28)</sup>. Similarly, Kay and others<sup>(3)</sup> and Mildner and Roces<sup>(4)</sup> reported the existence of an endogenous circadian clock in the workers of *Camponotus floridanus* and *C. rufipes*. According to the results obtained in the 24 h dark test (DD), it would be expected that, in the daily light cycle test (LD), a higher percentage of workers would present a circadian rhythm of activity, since, according to Saunders<sup>(1)</sup>, the daily light cycle constitutes the most powerful environmental signal synchronizing endogenous biological clocks. And it is exactly what happened in this study. The rhythmicity values in the LD test in lab workers and field workers were similar to a study carried out by Mildner and Roces<sup>(4)</sup> with the non-cutting ant *C. rufipes*. The authors reported that of the total number of workers experienced in the LD test (12:12), approximately 60% exhibited a circadian rhythm of activity. Under the exogenous effect of the daily light cycle, the expression of rhythmicity by LCA increases significantly. These results would show the importance of the exogenous factor of the photoperiod in the synchronization of endogenous factors in LCA. The importance of the photoperiod in regulating the circadian clock had been reported in non-cutter ants of the genus *Camponotus*<sup>(3)(4)</sup>. According to the statistical analysis, there were no differences between lab workers and field workers except for the spring season in DD and summer in LD. The differences experienced in the daily thermal cycle during the entrainment between field workers and lab workers did not mark differences in the expression of rhythmicity. Therefore, the photoperiod would be the most important exogenous factor in the regulation of rhythmicity. So far, we only had specific



studies that attempted to correlate exogenous factors, temperature and relative humidity with the activity in LCA<sup>(14)(15)(16)(17)(20)</sup>. Thus, there was no work that had studied the endogenous factors involved in the circadian rhythms of activity in LCA. The only exception that we are aware of is a recent work by Constantino and others<sup>(2)</sup>, where it was observed that the workers presented a circadian rhythm of activity under controlled conditions of temperature, relative humidity and photoperiod (12:12); from which it could be assumed that the daily foraging activity is controlled by an internal clock synchronized by the photoperiod. In this work, the existence of an endogenous biological clock that controls activity patterns in LCA is proven. LCA present a circadian rhythm of activity and the photoperiod is the most important exogenous factor in the regulation of rhythmicity, as well as the most powerful external signal synchronizing the circadian clock.

#### 4.2 Day vs night

The LCA showed a diurnal habit, without perceiving the daily cycle of light, which makes them intrinsically diurnal. Thus, this work proves for the first time that the diurnal habit recorded in LCA would be controlled by endogenous factors. In similar studies with a non-cutter ants, Kay and others<sup>(3)</sup> and Mildner and Roces<sup>(4)</sup> showed that workers of *Camponotus floridanus* and *C. rufipes* are intrinsically nocturnal as they show greater locomotor activity during the nocturnal phase in a 24 h dark Test (DD). Based on a study of the activity of an *Atta cephalotes* nest lasting less than a month and taking two days of them as the most representative, Hodgson<sup>(23)</sup> would have suggested the existence of an inherent diurnal rhythm in the LCA by observing a movement of the workers towards the exit

holes of the nest before dawn. According to the results in the test with 24 h dark (DD), LCA are intrinsically diurnal, so it would be expected that in the test with daily light cycle (LD), the activity of the workers would be greater during the day phase. And this is exactly what happened with the lab and field workers in the daily light cycle test (LD). Under the exogenous stimulus of the light-dark cycle (Test LD), both in lab workers and in field workers, the differences between the levels of diurnal and nocturnal activity were more marked than in DD in the annual cycle, except for summer. In this case, the daily thermal cycle experienced during the entrainment in field workers could cancel out the effect of the daily light cycle, causing foragers to become nocturnal in summer, when they are always diurnal. It is possibly a survival strategy to avoid the high temperatures recorded during the daytime phase of the day. Thus, the exogenous factor of temperature could cause a contraposition with the intrinsic diurnal habit of LCA, becoming nocturnal during summer. Several works on LCA carried out in natural environments (Mehlhop and Scott<sup>(8)</sup>, Brown and others<sup>(9)</sup>, Mintzer<sup>(10)</sup>, Gamboa<sup>(11)</sup>, Whitford and Ettershank<sup>(12)</sup>) suggested that, in temperate climates, LCA activity patterns are clearly dependent on variation of the temperature according to each season in the annual cycle where it is common to modify the activity patterns from daytime to evening or nighttime in the months of higher temperatures. According to Wetterer<sup>(13)</sup>, in summer the workers are more active at night to avoid heat stress and dehydration that they could suffer from the high temperatures that occur during the daytime phase of the day. In a similar study, workers of *C. floridanus* and *C.*



*rufipes* markedly synchronized their activity rhythms when exposed to a cycle of 12 h of light and 12 h of darkness, thus evidencing the importance of the photoperiod in regulating the circadian clock<sup>(3)(4)</sup>. Similarly workers of *A. sexdens* that were marked being active during the daytime phase or during the nighttime phase, repeated the same behavior throughout the 5 days of observation under controlled conditions of temperature, relative humidity and photoperiod (12:12)<sup>(2)</sup>. In this way, the photoperiod seems to be the most important exogenous factor in the synchronization of the daily rhythms of activity. According to the results, this work proves for the first time that LCA are intrinsically diurnal. Thus, the daytime habit would be controlled by endogenous factors, synchronized by the photoperiod, the most important exogenous factor in the circadian rhythms of activity (daily variation) of LCA.

#### 4.3 Seasonal pattern of activity

According to the results, the activity of the LCA is controlled by exogenous factors. If in DD, the activity is not different between seasons, it means that it is a basal level, in which there is no endogenous factor that causes a season to differ showing higher levels of activity. In other words, everything would depend on the exogenous factor of the photoperiod. From a study of the activity of workers in an *Atta cephalotes* nest carried out by Hodgson<sup>(23)</sup>, the author had suggested the existence of an inherent activity in LCA, arguing that it would be sufficient to leave the nest, but it would seem that the exit of the workers in darkness would be less accelerated compared to when the ants perceive light. Given that the results in the daily light cycle test (LD) were similar in lab workers and field workers with different entrainment in the daily

thermal cycle, but not in the photoperiod, the seasonal pattern of activity can be explained exclusively by the exogenous factor photoperiod. In both cases (lab and field) the level of activity during the summer was low and lower than in the rest of the year, something a priori unexpected. The level of activity in DD is the same in all seasons of the year. Differences are expressed only under LD, that is, when they perceive the daily light cycle. These results are highly relevant since they demonstrate the leading role of the exogenous environmental factor of the photoperiod in the regulation of annual activity rhythms in LCA. As Tschinkel<sup>(29)</sup> argues, the main adaptation to foraging that social insects present is the existence of daily and annual cycles of activity, which allows them to synchronize with the times of greatest environmental resources and the times of the day that offer the best ranges of activity, and not forage indiscriminately throughout the day, nor its entire annual cycle as demonstrated in the LCA. However, the level of activity registered by *A. lundii* workers during summer was lower than in the rest of the year, something a priori unexpected considering that in summer there is a greater supply of plant material compared to winter. Traditionally, predictions regarding foraging activity of LCA have tried to be explained by exogenous environmental factors of climatic origin such as temperature and relative humidity<sup>(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)</sup>. However, the photoperiod had not been experimentally studied until this work, although it has long been recognized as the main factor in the regulation of foraging patterns in LCA<sup>(23)</sup>. In this work we show for the first time that there is a higher regulatory factor, the photoperiod; and that the annual variation in the daily cycle of light regulates the annual cycle of activity in LCA, independently of the variations in temperature.



Since effectively the photoperiod is the exogenous factor with the greatest weight in regulating the daily and annual rhythms of activity in LCA, it would be recommended to plan calendar controls for the management of LCA. Given that photoperiod is not variable like temperature, we could know exactly in which months of the year LCA have the highest foraging activity (autumn, winter and spring) and in which months they are inactive (summer). In this way, management strategies could be established to reduce the amount of bait without affecting the effectiveness of the control, applying during the months of greatest activity, from autumn to spring, where all the bait applied would be lifted by the workers, without need to reapply. And on the other hand, avoid applying during summer, since LCA remain inactive, otherwise, the bait would remain in the ground without being lifted, which would result not only in an economic waste but in an ineffective and polluting management.

## 5. Conclusions

LCA are shown to have a circadian rhythm of activity controlled by an endogenous clock and photoperiod is the most important exogenous factor in the regulation of rhythmicity. Consequently, LCA are shown to be intrinsically diurnal. Thus, the daytime habit would be controlled by endogenous factors, synchronized by the photoperiod, the most important exogenous factor in the circadian rhythms of activity (daily variation) of LCA. Lastly, foraging activity levels in LCA vary seasonally. It is shown that there is a higher regulatory factor, the photoperiod; and that the annual variation in the daily cycle of light regulates the annual cycle of activity in LCA, independently of the variations in

temperature. According to the results, it is recommended to plan calendar controls for the management of LCA. In summer it would not be advisable to carry out an ant control.

## Author contribution statement

MB, GK conceptualization. GK data collection, GK, MB data analysis, GK, MB first draft, MB, GM fundings, GK, MB, GM text editing and final draft.

## Transparency of data

- Available data: The entire data set that supports the results of this study was published in the article itself.

## References

1. Saunders DS. Insect clocks. In: Steel CGH, Vafopoulou X, Lewis RD, editors. Amsterdam: Elsevier Science; 2002. 576p.
2. Constantino PB, Valentinuzzi VS, Helene AF. Division of labor in work shifts by leaf-cutting ants. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-9.
3. Kay J, Menegazzi P, Mildner S, Roces F, Helfrich-Förster C. The circadian clock of the ant *Camponotus floridanus* is localized in dorsal and lateral neurons of the brain. *J Biol Rhythms.* 2018;33(3):255-271.
4. Mildner S, Roces F. Plasticity of daily behavioral rhythms in foragers and nurses of the ant *Camponotus rufipes*: influence of social context and feeding times. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169244.



5. Hölldobler B, Wilson EO. The Leaf Cutter Ants: Civilization by Instinct. New York, London: W. W. Norton & Company; 2010. 160p.
6. Amante E. A formiga saúva *Atta capiguara*, praga das pastagens. O Biol. 1967;33(6):113-120.
7. Hölldobler B, Wilson EO. The Ants. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press; 1990. 712p.
8. Mehlhop P, Scott N. Temporal patterns of seed use and availability in a guild of desert ants. Ecol Entomol. 1983;8(1):69-95.
9. Brown JH, Reichman OJ, Davidson DW. Granivory in desert ecosystems. Annu Rev Ecol Evol Syst. 1979;10(1):201-227.
10. Mintzer A. Foraging activity of the Mexican leafcutting ant *Atta mexicana* (F. Smith), in a Sonoran desert habitat (Hymenoptera, Formicidae). Insectes Soc. 1979;26(4):364-372.
11. Gamboa GJ. Effects of temperature on the surface activity of the desert leaf-cutter ant, *Acromyrmex versicolor versicolor* (Pergande) (Hymenoptera: Formicidae). Am Midl Nat. 1976;95(2):485-491.
12. Whitford W, Ettershank G. Factors affecting foraging activity in Chihuahuan desert harvester ants. Environ Entomol. 1975;4(5):689-696.
13. Wetterer JK. Diel changes in forager size, activity, and load selectivity in a tropical leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. Ecol Entomol. 1990;15(1):97-104.
14. Nobua Behrmann B, Lopez de Casenave J, Milesi FA, Farji-Brener AG. Coexisting in harsh environments: temperature-based foraging patterns of two desert leafcutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini). Myrmecol News. 2017;25:41-49.
15. Caldato N, Forti LC, Bouchebti S, Lopes JFS, Fourcassié V. Foraging activity pattern and herbivory rates of the grass-cutting ant *Atta capiguara*. Insectes Soc. 2016;63(3):421-428.
16. Nিকেle MA, Reis Filho W, Pie MR, Penteadó SRC. Daily foraging activity of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) leaf-cutting ants. Sociobiology. 2016;63(1):645-650.
17. Viana LR, Santos JC, Arruda LJ, Santos GP, Fernandes GW. Foraging patterns of the leaf-cutter ant *Atta laevigata* (Smith) (Myrmicinae: Attini) in an area of Cerrado vegetation. Neotrop Entomol. 2004;33(3):391-393.
18. Pilati A, Quirán EM, Estelrich HD. Actividad forrajera de *Acromyrmex lobicornis* Emery (Hymenoptera: Formicidae) en un pastizal natural semiárido de la provincia de La Pampa (Argentina). Ecol Austral. 1997;7(2):49-56.
19. Farji-Brener AG. Influencia de la estacionalidad sobre los ritmos forrajeros de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) en una sabana tropical. Rev Biol Trop. 1993;41:897-899.
20. Marschner J, Machado V, Diehl-Fleig E. Variação anual na atividade de corte de *Acromyrmex striatus* (Formicidae, Attini). Acta Biol Leopoldensia. 1993;15(1):77-86.
21. Pintera A, Zorrilla MA. Circadian and seasonal changes in the foraging activity of the Cuban leaf-cutting ant, *Atta insularis* (Hymenoptera, Formicidae). Acta Entomol Bohemoslovaca. 1981;78(5):311-317.
22. Fowler HG, Robinson SW. Foraging by *Atta sexdens* (Formicidae: Attini): seasonal patterns, caste and efficiency. Ecol Entomol. 1979;4(3):239-247.
23. Hodgson ES. An ecological study of the behavior of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. Ecology. 1955;36(2):293-304.



24. Jofre LE, Medina AI. Patrones de actividad forrajera y tamaño de nido de *Acromyrmex lobicornis* (Hymenoptera: Formicidae) en una zona urbana de San Luis, Argentina. *Rev Soc Entomol Argentina*. 2012;71(1-2):37-44.
25. Gonçalves CR. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). *Stud Entomol*. 1961;4(1-4):113-180.
26. Sharma VK, Lone SR, Mathew D, Goel A, Chandrashekar MK. Possible evidence for shift work schedules in the media workers of the ant species *Camponotus compressus*. *Chronobiol Int*. 2004;21(2):297-308.
27. North RD. Circadian rhythm of locomotor activity in individual workers of the wood ant *Formica rufa*. *Physiol Entomol*. 1987;12(4):445-454.
28. McCluskey ES. Circadian rhythms in male ants of five diverse species. *Science*. 1965;150(3699):1037-1039.
29. Tschinkel WR. The organization of foraging in the fire ant, *Solenopsis invicta*. *J Insect Sci*. 2011;11(1):26.