

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Interacción de los nematodos *Sclerorhabditis* (Rhabditidae) encontrados en troncos de *Cecropia* (Urticaceae) junto a las hormigas *Azteca* (Formicidae: Dolichoderinae)

Tesis sometida a consideración de la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, para optar por el grado académico de Licenciado en Biología con énfasis en Zoología

Geovanny Mora Pineda

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Costa Rica

2013

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Dr. Paul Hanson Snortum

Director de tesis

M.Sc.Alejandro Esquivel Hernández

Integrante del comité asesor

Dr. Adrián Pinto-Tomás

Integrante del comité asesor

M.Sc. MonikaSpringer

Miembro de Tribunal

M.Sc.Ethel Sánchez Chacón

Representante de Decana (o) de la Facultad de Ciencias y Presidenta del Tribunal

Geovanny Mora Pineda

Postulante

AGRADECIMIENTOS

A Paul Hanson, más que solo un profesor un gran amigo, desde el inicio sus ideas, apoyo, entusiasmo, deseo y pasión por conocer más y más fueron el combustible que me llevo a desarrollar este trabajo.

Alejandro Esquivel, por su guía, sus ideas y asesoramiento, así como por sus comentarios y revisión del manuscrito. El trabajo no hubiera sido posible sin su experiencia con los nematodos.

Adrián Pinto, gracias por su revisión y comentarios sobre el manuscrito.

Tatiana Rodríguez, su apoyo, compañía, ideas, comentarios y ayuda siempre incondicionales hacen cualquier cosa posible.

A mis Padres, Geovanny Mora y Zaida Pineda, por su paciencia, financiamiento y apoyo. Su ejemplo me hace seguir y sentirme orgulloso cada día. Les debo todo lo que soy.

A mi familia.

William Eberhard por sus comentarios, ideas e interés en el desarrollo de este trabajo.

Jessica Morera por su ayuda e interés en el desarrollo del estudio.

Gente de 170, en especial a Eduardo (Lalo) Chacón y Eddy Camacho.

Adriana Troyo, Olger Calderón e Iván Coronado del laboratorio de Artropodología de la Escuela de Microbiología.

Laboratorio de Biología UCR, San Ramón, en especial a Marco Zumbado.

A Elizabeth Pringle por la muestra de *Cordia alliodora*.

Viviana Lang y Jessica Padilla por su colaboración con los trámites de la escuela.

IdeaWild por su ayuda.

INDICE GENERAL

Miembros del tribunal	II
Agradecimientos	III
Indice general	IV
Indice de figuras	V
Indice de cuadros	VI
Resumen	VII
Justificación	1
Estado del conocimiento.....	3
Antecedentes.....	12
Objetivo general	14
Objetivos específicos	14
Materiales y métodos.....	15
Resultados.....	21
Discusión	33
Conclusiones.....	42
Referencias	43
Referencias de internet	47
Anexos I. Clave para obreras y reinas de las especies de <i>Azteca</i> de Costa Rica que normalmente habitan <i>Cecropia</i> (Cecropiaceae)	48
Anexos II. Glosario	50

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Corte transversal del tallo de <i>Cecropia obtusifolia</i>	4
Fig. 2. Prostoma de <i>Cecropia obtusifolia</i> . (A) Muestra el prostoma cerrado o virgen. (B) Muestra el prostoma abierto (no virgen) por <i>Azteca constructor</i>	5
Fig. 3. Cantidad de entrenudos de cuatro especies de <i>Cecropia</i> habitados por hormigas <i>Azteca</i> (n = 576).....	22
Fig. 4. Mapa de relieve de Costa Rica en el que se representa los sitios en que se encontraron plantas con nematodos junto a hormigas <i>Azteca</i> . Los círculos sin relleno son plantas diferentes de <i>Cecropia</i> . Figura modificada de Inbio (2005).	24
Fig. 5. Cantidad de entrenudos de <i>Cecropia</i> , en los que se encontraron nematodos y la relación con la ausencia o presencia de hormigas del género <i>Azteca</i> (n = 576).....	25
Fig. 6. Cantidad de entrenudos de <i>Cecropia</i> , en los que se encontraron nematodos y la relación con la condición del entrenudo (n = 576).	25
Fig. 7. Porcentaje de entrenudos de <i>Cecropia</i> habitados por nematodos (divididos en pilas de nematodos negativas o positivas al género <i>Sclerorhabditis</i>)según la especie de hormiga <i>Azteca</i> que se encontraban en el entrenudo (n = 104).	26
Fig. 8. Porcentaje de entrenudos de <i>Cecropia</i> habitados por nematodos (divididos en pilas de nematodos negativas o positivas al género <i>Sclerorhabditis</i>)según la especie de <i>Cecropia</i> en que se encontraban (n = 104).....	27
Fig. 9. Colonia de <i>Azteca xanthochroa</i> en el laboratorio. (A) Sección de <i>Cecropia obtusifolia</i> , en que se encuentra la colonia. (B) Obreras alrededor de una gota de agua colocada en la base del nido.	31

INDICE DE CUADROS

Cuadro I. Sitios de recolecta, coordenadas, especies y número de plantas de <i>Cecropia</i> utilizadas.....	16
Cuadro II. Presencia de nematodos y <i>Sclerorhabditis</i> en combinación con diferentes especies de <i>Cecropia</i> y <i>Azteca</i>	23

RESUMEN

Las mirmecófitas son plantas normalmente habitadas por hormigas. En nuestro país, uno de los casos más representativos son algunas especies de hormigas del género *Azteca* que habitan en árboles de *Cecropia*. Los beneficios para cada una de las partes de esta relación es el punto focal de la mayoría de los estudios realizados hasta ahora. Sin embargo, otros aspectos de la vida de estas hormigas han sido descuidados. Este es el caso de los nematodos que han sido varias veces reportados como habitantes comunes en las colonias de *Azteca* en *Cecropia* sin ahondar en el tema. En el presente estudio se analizó la presencia de nematodos y en específico del género *Sclerorhabditis*, con las diferentes especies de *Azteca* y *Cecropia* que se encuentran en Costa Rica. Se encontró una relación significativa entre la presencia de *Azteca* y los nematodos en las plantas de *Cecropia*. No fue posible encontrar nematodos en entrenudos que estaban (o no estuvieron) habitados por *Azteca*.

Se estableció un mapa de distribución inicial de los nematodos, con 10 sitios de muestreo en Costa Rica, así como un primer cuadro de las combinaciones *Azteca-Cecropia* junto a las que es posible encontrar nematodos y en específico a *Sclerorhabditis* sp. Adicionalmente se encontraron nematodos en plantas de *Cordia alliodora* y *Mangifera indica* habitadas por especies de *Azteca*. Para determinar si las hormigas portan los nematodos y en qué parte del cuerpo, hormigas *Azteca* reinas recién extraídas de nidos en *Cecropia*, fueron “lavadas” y cortadas en cabeza, mesosoma y metasoma, encontrando los nematodos en las tres secciones. Se presentan resultados de observaciones del comportamiento de *Azteca* con respecto a las pilas de nematodos y posibles hipótesis de su importancia para la colonia de hormigas.

Se discute sobre la naturaleza de la relación entre los nematodos con *Cecropia* y *Azteca*, los posibles beneficios para las partes y evidencia que sugiere que la relación entre los nematodos y *Azteca*, va más allá de la relación de las hormigas con *Cecropia*, sugiriendo que los nematodos se encuentran relacionados con todo o parte del género *Azteca*.

JUSTIFICACIÓN

La región neotropical es la que presenta mayor biodiversidad y riqueza de especies (Della-Lucia 2003). El grupo de las hormigas no son la excepción, ya que son consideradas entre los organismos más abundantes en las regiones neotropicales. Esta abundancia se ve reflejada en la presencia de hormigas en prácticamente todos los nichos del bosque y formando parte de diferentes cadenas tróficas. Han desarrollado relaciones con otros organismos, como por ejemplo hongos, cochinillas, áfidos y plantas. La singularidad de las relaciones entre hormigas y plantas, especialmente en las regiones tropicales, llama cada vez más la atención de biólogos y ecólogos sobre la importancia de los procesos evolutivos que rigen el establecimiento de estas interacciones (Delabie *et al.* 2003).

El caso de *Cecropia* (Urticaceae) y las hormigas del género *Azteca* (Formicidae: Dolichoderinae), se utiliza para ejemplificar la relación mutualista entre una planta y una hormiga. Su relación planta-hormiga es de las más estudiadas (Fáveri & Vasconcelos 2004, Weng *et al.* 2007). Diferentes grupos de hormigas pueden vivir en *Cecropia*, por ejemplo algunas especies de *Pachycondyla*, *Gnamptogenys*, *Heteroponera*, *Pseudomyrmex*, *Crematogaster*, *Solenopsis*, *Pheidole*, *Wasmannia*, *Cephalotes* (= *Zacryptocerus*), *Procryptocerus*, *Camponotus*, *Myrmelachista* (Longino 2005). Sin embargo, estas hormigas fundan las colonias de manera no claustral a diferencia de la mayoría de las hormigas de plantas, no son habitantes obligatorias de *Cecropia* y son menos comunes en *Cecropia* que las hormigas *Azteca* (Hanson & Longino 2006).

El género *Cecropia* es un grupo importante de plantas pioneras en la región neotropical y por esto es muy común en dicha zona (Berg *et al.* 2005). Tiene un importante rol en la regeneración de hábitats alterados y claros en el bosque. Posee potencial como planta fitorremediadora para absorber los metales pesados de suelos contaminados (Durango *et al.* 2010). Funciona como alimento y hogar para variedad de animales como: murciélagos (Lobova *et al.* 2003), perezosos (Bailey 1922) y aves (Folgarait & Davidson 1995); las cuales también funcionan como base de cadenas tróficas mayores, lo que le confiere gran importancia ecológica. Sin embargo, las relaciones simbióticas entre *Cecropia* y otros organismos, adicionalmente a la existente con *Azteca*, son poco conocidas y requieren más investigación.

Costa Rica es conocida internacionalmente por su biodiversidad. No obstante, la diversidad de grupos como los nematodos ha sido poco estudiada en el país (a excepción de los de importancia económica o médico-veterinaria conocidos, Esquivel 2003). En árboles de *Cecropia* habitados por *Azteca* es común encontrar pilas de nematodos (Longino 1991a). Es conocido que las hormigas normalmente cuidan de otros organismos como hongos y cochinillas (Coccoidea :Hemiptera) (Hanson & Longino 2006), pero no sabemos nada de las funciones de los nematodos en la biología de la relación *Azteca-Cecropia*.

El caso específico de los nematodos y específicamente del género *Sclerorhabditis* en *Cecropiano* se ha tratado en investigaciones hasta en la reciente publicación de Esquivel *et al.* (2012) donde se describe una especie del género *Sclerorhabditis* común en las plantas de *Cecropia*, pero sin entrar en detalle de la relación de estos con las hormigas *Azteca* y las plantas. Su relación tanto con la hormiga como con la planta es desconocida. Es posible que el mismo sea un parásito y esté envuelto en la muerte de las hormigas, por lo que sería un posible agente de mortalidad. Por otro lado, existe la posibilidad que el mismo sea un organismo mutualista, lo que desde el punto de vista ecológico es novedoso pues implica la relación entre tres diferentes grupos planta-hormigas-nematodos, lo cual como explica Blatrix *et al.* (2009) debe ser común pero poco estudiado en las diferentes asociaciones mutualistas estudiadas por la ciencia.

ESTADO DEL CONOCIMIENTO

Las mirmecófitas son plantas que han desarrollado estructuras especializadas para albergar hormigas (domacios) y en algunos casos alimentarlas (cuerpos alimenticios), las cuales, aun careciendo de estructuras especializadas, son habitadas, regularmente, por ciertas especies de hormigas(Hanson & Longino 2006). La mayoría de las mirmecófitas producen estructuras especializadas aun en ausencia del insecto, pero los cuerpos alimenticios de *Piper*(Piperaceae) y los domacios de *Vochysia*(Vochysiaceae) se desarrollan solamente por el estímulo de las hormigas(Hanson & Longino 2006). *Cecropia* es un género de plantas mirmecófitas, comúnmente habitada por hormigas del género *Azteca*.

Características de las plantas del género *Cecropia*: El género *Cecropia*Loefling pertenece al orden Urticales y posee una taxonomía complicada por lo que ha sido colocado en las familias Moraceae (Engler 1889 *apud*Berget *al.* 2005, Burger 1977), Urticaceae (Judd *et al.* 1994) y en una familia propia Cecropiaceae(Berg *et al.* 2005). Las *Cecropia* son arboles deciduos, nativos del trópico(Longino 2005)e incluye 61 especies(Berg *et al.* 2005). Es común encontrarlas en zonas de vegetación alterada por el hombre, junto a los caminos, en zonas de erosión y claros del bosque. Se los conoce popularmente como guarumo, yarumo y en inglés como trumpettree(Janzen 1973).

El tronco es cilíndrico y tabicado en los nudos, similar a los del bambú (Fig. 1). El interior de los entrenudos está inicialmente lleno de una médula suave (parénquima) de color blanco. Durante el desarrollo de la planta el entrenudo se extiende y el parénquima interno se contrae, dejando hueco el entrenudo y cubierto por una delgada capa de parénquima. Esta cavidad es donde las reinas fundadoras ingresan y forman el nido de la futura colonia(Bailey 1922, Longino 1989a, 1989b, 1991b, 2005). En los tallos nuevos de las plantas se presenta una depresión o sitio suave, llamado prostoma(Bailey 1922).



Fig. 1. Corte transversal del tallo de *Cecropia obtusifolia*.

El prostoma se encuentra en cada uno de los entrenudos. Corresponde a un surco por encima de la inserción de cada hoja y que termina justo debajo del siguiente nudo en una depresión redondeada (Fig. 2). El surco externo corresponde también a una depresión en el interior, por lo que la pared del tallo en este punto es muy delgada; desprovista de elementos duros o de transporte de sustancias, como parénquima grueso o colénquima (Bailey 1922). Es por este punto que las reinas de *Azteca* ingresan en las plantas (Bailey 1922, Longino 2005, 2007a, Hanson & Longino 2006, Weng *et al.* 2007).



Fig. 2. Prostoma de *Cecropia obtusifolia*. (A) Muestra el prostoma cerrado o virgen. (B) Muestra el prostoma abierto (no virgen) por *Azteca constructor*.

Los peciolos son largos y las hojas simples, con lóbulos pronunciados. En la mayoría de las especies, en la base de cada peciolo se encuentra una zona triangular, densamente cubierta de tricomas llamado triquilio (o trichillium, plural trichilia), única del género *Cecropia*. En él se forman los cuerpos de Müller (Bailey 1922, Janzen 1973, Hanson & Longino 2006), siguiendo un proceso descrito en detalle por Rickson (1976). El triquilio puede producir desde 2500 hasta 8000 cuerpos de Müller, durante los 20 a 25 días que permanece en producción (Janzen 1973). Del total de hojas de un árbol, solo los triquillos de dos o tres se encuentran en producción (Longino 1991a). Los cuerpos de Müller están compuestos por al menos 50% de glucógeno (igual al glucógeno animal) y algunas proteínas (Janzen 1973, Rickson 1976b) y, son colectados por las hormigas que habitan la planta (Rickson 1976a, 1976b, 1977). En plantas habitadas por *Azteca*, la cosecha de los cuerpos de Müller es tan eficiente que es difícil encontrarlos en el triquilio (Bailey 1922). En las plantas que no presentan colonias de hormigas, los cuerpos de Müller se acumulan en gran número en el trichillium y en algunos casos son consumidos por otras hormigas, aves pequeñas y otros insectos. Sin embargo, según Folgarait *et al.* (1994) la producción es mayor en plantas en las que los cuerpos de Müller son removidos. También cabe destacar que en plantas que se encuentran en islas del Caribe o en tierras altas continentales, la

producción de cuerpos de Müller es reducida, probablemente debido al costo sin beneficio que la producción de estos representa pues en estas zonas no se encuentran hormigas asociadas a *Cecropia* (Janzen 1973). En las zonas altas de Costa Rica, se encuentra *Cecropia angustifolia* (antes conocido como *C. polyphlebia*; Berg *et al.* 2005), una especie no habitada por hormigas, en la que el trichillium está cubierto de largos pelos y produce menos cuerpos de Müller (Janzen 1973, Longino 1989b, 2005).

Las hojas de *Cecropia* también producen cuerpos perlados. Estos se generan en el peciolo y la parte inferior de la lámina foliar, por tricomas pluricelulares (Berg *et al.* 2005). Los cuerpos perlados contienen lípidos y pocos plastidios de glucógeno (Rickson 1976b) y a diferencia de los cuerpos de Müller, no son únicos de *Cecropia*, pues se pueden encontrar también en *Coussapoay Myrianthus* (Berg *et al.* 2005).

La distribución de *Cecropia* y *Azteca* en Costa Rica es tratada por Longino (1989a, 1989b, 1991a, 1991b). En Costa Rica se encuentran cinco especies de *Cecropia*: *C. obtusifolia*, *C. peltata*, *C. insignis*, *C. angustifolia* (exclusiva de zonas de altura entre 1400 y 2400 m.s.n.m.) y *C. pittieri*, siendo esta última exclusiva de la isla del Coco (Longino 2005, Weng *et al.* 2007). De estas especies, las dos últimas no son habitadas normalmente por hormigas *Azteca* (Janzen 1973).

Características de las hormigas del género *Azteca* que habitan *Cecropia*: El género *Azteca* pertenece al grupo Formicomorfa, subfamilia Dolichoderinae, es cosmopolita, compuesto por 22 géneros vivientes y 10 fósiles (Cuezzo 2003). Son hormigas arbóreas y se distinguen por la glándula pigidial que produce iridoides y quetonas, que se utilizan como defensa (Hanson & Longino 2006). El género *Azteca* es neotropical (Longino 2005), con cerca de 150 especies descritas (Ayala *et al.* 1996), todas arborícolas, polimórficas y pueden reconocerse por la forma acorazonada de la cabeza (Cuezzo 2003).

Trece especies del género *Azteca* son habitantes obligatorias de las plantas de guarumo (Ayala *et al.* 1996). En Costa Rica, se encuentran al menos cinco de estas especies: *A. alfari*, *A. constructor*, *A. coeruleipennis*, *A. ovaticeps* y *A. xanthochroa* (Longino 1989b, 1991a). Estas especies son divididas por Longino (1989a, 1991a) en dos grupos por representar linajes independientes que colonizaron *Cecropia*: el grupo (o complejo) de *A.*

alfari, que incluye *A. alfari* y *A. ovaticeps*, y el grupo *A. muelleri*, que incluye de ocho a diez especies (Hanson & Longino 2006) entre ellas *A. constructor*, *A. xanthochroa* y *A. muelleri*. El grupo *alfari* podría derivarse de especies que anidan en tallos, construyen nidos polidomos, son tímidas, utilizan poco cartón y son muy especializadas en su hábitat, pero poco especializadas con respecto a la especie hospedera. En contraste, el grupo *muelleri* puede derivar de especies que viven en nidos de cartón, que construyen centralizados en el tronco de *Cecropia*, son agresivas, poco especializadas con respecto al hábitat, pero sí en la especie hospedera (prefieren las especies de *Cecropia* que producen más cuerpos perlados en el envés de las hojas (Hanson & Longino 2006)). *A. coeruleipennis* no ha podido ser ubicada en ninguno de los dos grupos citados pues presenta características propias de ambos (Longino 1991b). Ayala *et al.* (1996) tampoco logró definir a qué grupo pertenece *A. coeruleipennis* utilizando análisis moleculares y discute la posibilidad que dicha especie colonizó *Cecropia* independientemente, por lo que podría representar un tercer grupo.

En *Azteca* la producción de estadios alados es continua y por largos períodos de tiempo, lo que las diferencia de otras hormigas, en las que es por episodios. El momento y el lugar de la cópula es un proceso desconocido. Las plantas de *Cecropia* adultas son habitadas por una sola colonia de *Azteca*. Estas colonias son polidomas (Hanson & Longino 2006) y presentan monoginia secundaria incluso entre diferentes especies (Choe & Perlman 1997).

Hasta ahora la vida de la colonia dentro del árbol es un aspecto desconocido, ya que el interior de los entrenudos de la planta no son visibles y al abrir un tallo se genera una reacción defensiva en las hormigas de escapar o atacar, lo que hace difícil estudiar la colonia en su comportamiento normal (observación personal). Sin embargo, Perlman (1992 *apud* Choe y Perlman 1997) logró hacer observaciones del proceso de colonización por medio del uso de cámaras de fibra óptica, y en el presente estudio se presentan algunas sugerencias para facilitar el estudio de las colonias de hormigas en su nido.

Los cuerpos de Müller colectados por las obreras son llevados al interior de los tallos (Bailey 1922), y se cree son alimento de las hormigas (Janzen 1973, Longino 1991a, 2005, Hanson & Longino 2006, Weng *et al.* 2007) debido a su alto contenido energético (Rickson

1976b). Los cuerpos han sido encontrados en el interior de los tallos de *Cecropia*, sin embargo, no existen estudios que analicen el uso que les dan las hormigas a dichos cuerpos así como al parénquima raspado de las paredes internas de los entrenudos.

La relación entre *Azteca* y *Cecropia*: La relación entre una colonia de *Azteca* y una planta de *Cecropia* inicia cuando una planta joven es colonizada por una reina que acaba de realizar su vuelo nupcial (Longino 2005). Según Longino (1989b), las reinas son encontradas en plantas jóvenes de guarumo incluso antes de que estas alcancen un metro de altura. El proceso de colonización ocurre después de la cópula, es entonces cuando la reina fundadora localiza una planta de *Cecropia* joven donde fundar una nueva colonia; Edwards *et al.* (2006) encontraron que reinas de especies de *Azteca* asociadas a *Cordianodosa* (Boraginaceae), una planta del Amazonas regularmente asociada con hormigas, presentan atracción por sus sustancias volátiles. Es posible que un mecanismo similar sea el utilizado por *Azteca* para localizar los guarumos. Para ingresar al entrenudo, la reina fundadora mastica y abre un hueco en el prostoma (Bailey 1922, Longino 1989b) sitio en el que se cree es más fácil para la hormiga penetrar a la planta (Janzen 1973), debido a la falta de conductos de transporte en el prostoma, lo que podría evitar que la entrada se llene con la savia de la planta. Tras entrar en la cámara la reina tapa la entrada con médula que raspa del interior del entrenudo de la cámara, posteriormente se cierra la apertura por el crecimiento de un callo. Diferentes reinas (de la misma o múltiples especies) pueden ingresar en el mismo entrenudo. Al abrir las cámaras se encuentran gran cantidad de reinas muertas, en algunos casos las cámaras incluso se vuelven inhabitables (Bailey 1922, Longino 2005). Las causas de la muerte de estas reinas es desconocida, para Bailey (1922) se puede deber al ataque de *Conoaximaaztecicida*, un himenóptero parásito. Weng *et al.* (2007) sugieren que la causa de la mortalidad puede estar relacionada con varios factores, entre ellos: el ataque de *Menoziola* (Diptera, Phoridae), la calidad y cantidad del parénquima en el entrenudo y la posible competencia entre las reinas, además, la presencia de nematodos y hongos entomófagos sobre las reinas muertas sugieren que éstos podrían tener relación con la alta mortalidad.

El éxito de la colonización, puede variar con la presencia de otras reinas en el entrenudo. Choe & Perlman (1997) presentan una serie de combinaciones en las que

algunas especies de *Azteca* aumentan su posibilidad de éxito al fundar la colonia asociada a otras reinas (monoginia secundaria), sean o no de la misma especie.

Una vez dentro del entrenudo, la reina pone los huevos que darán lugar a las primeras obreras de la futura colonia. En hormigas en que la reina funda la colonia sola (o sin obreras), como el caso de *Azteca*, los músculos alares y otras reservas del cuerpo se convierten en alimento para la primera camada de larvas. Este alimento consiste en huevos tróficos y secreciones salivares especializadas (Hanson & Longino 2006). Sin embargo, se ha especulado sobre la posibilidad que las reinas se alimenten de parénquima y del callo producido en el prostoma (Von Ihering y Fiebrig 1907 *apud* Bailey 1922), pero hasta ahora no se ha encontrado prueba de esto.

Las primeras obreras adultas reabren la cámara por el prostoma, entonces empiezan a forrajear, al crecer el tamaño de la colonia también se abren camino en nudos y nuevos entrenudos de la planta (Longino 1989b, Choe & Perlman 1997). Los guarumos de tamaño grande (3-4 m) contienen una sola colonia dominante con gran cantidad de obreras. Incluso árboles con varios troncos desarrollados sólo contienen una colonia y los guarumos cercanos o con copas conectadas contienen colonias separadas (Longino 1989b).

De la relación, las hormigas reciben de la planta los cuerpos de Müller presentes en el triquilio de la planta y los acumulan en las cámaras, teóricamente como alimento para las larvas (Weng *et al.* 2007). Otro beneficio para las hormigas es un sitio para anidar dentro de los troncos de la planta (Janzen 1973, Longino 2005). Dentro de los tallos habitados por *Azteca* se encuentran cochinillas (Hemiptera: Coccidae y Pseudococcidae) que las hormigas cuidan (Berg *et al.* 2005, Frederickson 2005). Estos hemípteros, al succionar la savia del floema excretan el exceso de azúcar y está puede ser aprovechada por las hormigas (Carroll 1991, Hanson & Longino 2006). Según Trimble & Sagers (2004) las cochinillas podrían representar una fuente de carbono y/o nitrógeno para las hormigas. Las cochinillas pueden ser encontradas con diferentes especies como *A. xanthochroa* y *A. beltii* (Longino 2007b, 2007c).

La relación con *Azteca* le produce también una serie de beneficios a *Cecropia*. La planta es protegida por sus hormigas de la competencia de otras plantas como enredaderas

que pueden ascender por el tronco. Las enredaderas son atacadas por la colonia que habita la planta (Janzen 1969). Según Sagers *et al.* (2000) y Trimble & Sagers (2004), los detritos (cadáveres, meconio, mudas y excrementos), dejados por las hormigas en las cámaras, al descomponerse pueden ser absorbidos por la planta y funcionar como una fuente de nitrógeno y otros recursos. Las hormigas defienden también a su planta del ataque de herbívoros. Schupp (1986) encontró que plantas habitadas crecen más rápido y con menos herbivoría que aquellas en las que la colonia de hormigas fue removida. Además, plantas con colonias grandes de hormigas y reclutamiento más rápido presentan menor daño en las hojas (Duarte y Godoy 1992).

La relación entre *Azteca-Cecropia* y el nematodo asociado a las colonias: Salvo pocos casos, la relación *Azteca-Cecropia* es el punto focal de los estudios publicados hasta el día de hoy, existiendo pocos trabajos sobre la relación de otros organismos con estos dos géneros. Sin embargo, Blatrix *et al.* (2009) sugiere que las relaciones entre organismos se deberían considerar como una posible comunidad simbiótica que además podría incluir las cochinillas, hongos, bacterias y nematodos. En el caso de *Cecropia*, además, se ha reportado la presencia de coleópteros (gorgojos) del género *Lissoderes* (Coleoptera: Curculionidae). La etapa larval de estos se desarrolla en el interior de los entrenudos no habitados por las *Azteca*, las cuales lo eliminan en el caso de encontrarlos (Wenget *al.* 2007). Pero, como en el caso de otros organismos asociados a este sistema, no se conoce que repercusiones puede tener su presencia para las hormigas o la planta.

Otro habitante de los tallos de *Cecropia* son los nematodos, los cuales se encuentran normalmente en una sustancia llamada “knollen” (traducción tubérculo, Müller 1880-1881 *apud* Longino 1991a). Al menos tres géneros diferentes se han encontrado dentro de las plantas habitadas por *Azteca* (observación personal), uno de estos géneros de nematodos comúnmente encontrado es *Sclerorhabditis* (Nematoda: Rhabditidae), el cual es un género nuevo descrito por Ahmad *et al.* (2007). Este género, hasta hace poco, incluía una única especie, *S. tridentatus*, que fue encontrada en el tronco de una palmera (*Oreodoxa regia*: Arecaceae) en la India, la cual contenía excrementos de aves y murciélagos así como también restos de insectos y de madera. Según Ahmad *et al.* (2007) la especie puede ser bacteriófaga. La especie encontrada en *Cecropia obtusifolia*, *Sclerorhabditis*

neotropicalis, fue descrita por Esquivel *et al.* (2012). La biología de esta especie, por ser nueva, es totalmente desconocida, aunque puede estar relacionada con las hormigas que habitan la planta pues es común encontrar nematodos en plantas habitadas por *A. xanthochroa* y *A. constructor* (Longino 1991a). Sin embargo, esto es lo único que conocemos sobre los nematodos de *Cecropia*.

ANTECEDENTES

Las primeras observaciones de la relación existente entre *Azteca* y *Cecropia* fueron hechas en la década de 1880 (Janzen 1969). Los beneficios y la necesidad de la relación para cada parte es el tema de la mayoría de los estudios (Janzen 1966, 1969, Schupp 1986, Davidson & B. 1991, Sagers *et al.* 2000, Fáveri & Vasconcelos 2004, Trimble & Sagers 2004, Frederickson 2005, entre otros).

Entre los autores más destacados se encuentra Bailey (1922), que cuestiona la relación existente, en su opinión, la relación es comensalista. En contraste, Janzen (1973) encontró que plantas de especies que en la zona continental son usualmente habitadas por hormigas, en las islas del Caribe y en la isla de Cocono producen cuerpos de Müller y han perdido su relación con hormigas; debido a que la planta no las requiere, pues el ambiente de las islas no presenta la diversidad de posibles depredadores y plantas competidoras presentes en el continente, lo que haría pensar que la relación es mutualista. Longino (1989b) estudió la distribución de ambos géneros en diferentes zonas de Costa Rica, la especificidad de las especies de hormiga por una u otra especie de planta y la taxonomía del género *Azteca* (Longino 1989a, 1989b, 1991a, 1991b, 2006). Weng *et al.* (2007) estudiaron las interacciones entre un picudo cuyas larvas se desarrollan en *Cecropia* y su interacción con *Azteca*. Estudios como el de Weng *et al.* (2007), en el que se estudia la interacción de otros organismos con la ya conocida de *Cecropia-Azteca*, son pocos y no han tocado nunca el tema de los nematodos presentes.

La nematofauna del país es poco estudiada. Esquivel (2003) realizó el primer estudio general de los nematodos de las zonas protegidas de Costa Rica. De las muestras tomadas por Esquivel solo el 7% del material ha sido identificado hasta el nivel de especie. Lo cual demuestra lo incipiente que es la información sobre los nematodos de vida libre en nuestro país. De los nematodos presentes en *Cecropia*, existen solo tres reportes, el primero de Müller (1880-1881 *apud* Longino 1991a) quien hace una pequeña descripción de la sustancia en que se encuentran los nematodos y la presencia de los mismos; posteriormente Longino (1991a) reporta nuevamente la existencia de los nematodos y Weng *et al.* (2007), quien además de reportar su existencia, menciona la posibilidad que estos estén

relacionados con la muerte de gran cantidad de reinas fundadoras encontradas regularmente en lo tallos de *Cecropia*.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la existencia de una relación entre los nematodos del género *Sclerorhabditis* presentes en el interior del tronco de *Cecropia* habitados por hormigas del género *Azteca*, mediante el análisis de diferentes especies de *Cecropia* y de hormigas *Azteca*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si la presencia de nematodos del género *Sclerorhabditis* está o no relacionado con las hormigas *Azteca*.
- Analizar si diferentes especies de hormigas *Azteca* habitantes de diferentes especies de *Cecropia* poseen el mismo género de nematodo.
- Establecer si las reinas de *Azteca* transportan el nematodo *Sclerorhabditis*.
- Realizar observaciones del comportamiento de las hormigas y su relación con los nematodos del género *Sclerorhabditis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo: Los muestreos se realizaron a partir de abril del 2011 hasta mayo del 2012 aprovechando la temporada lluviosa del país, en la cual aumenta el número de plantas jóvenes de *Cecropia*. Se utilizaron en total 23 plantas de cuatro especies distintas: *C. obtusifolia*, *C. peltata*, *C. insignis* y *C. angustifolia*, con un total de 576 entrenudos analizados. Las plantas se localizaban a la orilla de caminos donde estas son comunes. Los sitios de recolecta fueron: En Guanacaste: Abangares y Ostional. En Alajuela: Ciudad Quesada; Santa Elena en Monte Verde; la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes; la sede de la Universidad de Costa Rica en San Ramón y el distrito de Bolívar también en San Ramón. En San José: cerca del parque nacional Braulio Carrillo, Moravia; y la Universidad de Costa Rica en San Pedro de Montes de Oca. Las coordenadas geográficas, especies de *Cecropia* analizadas y cantidad de las recolectas se encuentran resumidas en el cuadro 1. Como pruebas adicionales de la relación entre la presencia de nematodos y las hormigas *Azteca*, se analizó una muestra: *Cordia alliodora* (Boraginaceae) procedente del Parque Nacional Santa Rosa, Guanacaste, habitada por *Aztecacpittierii* y una muestra de *Mangifera indica* (Anacardiaceae) habitada por *A. instabilis*; de las que fue posible extraer nematodos.

Las plantas seleccionadas se cortaron cerca de la base para evitar eliminar la planta (la cual es capaz de generar nuevos brotes, incluso si se corta su tallo), pero evitando dejar entrenudos huecos en el sitio, pues se deseaba que todos estos formen parte de las muestras a examinar. Se tomaron plantas con una altura entre uno y dos metros para facilitar su

manejo así como para evitar colonias de hormigas demasiado grandes las cuales son muy agresivas.

CUADRO I

Sitios de recolecta, coordenadas, especies y número de plantas de *Cecropia* utilizadas

Sitio	Coordenadas		Cantidad de plantas utilizadas por especie			
			<i>C. obtusifolia</i>	<i>C. peltata</i>	<i>C. insignis</i>	<i>C. angustifolia</i>
Abangares	10°16'55"N	84°57'36"O		3		
Bolívar, SR.	10° 6'18"N	84°29'8"O	1			
C. Quesada	10°19'19"N	84°25'39"O			1	
Moravia	10° 3'45"N	84° 3'54"O				4
Ostional	9°59'46"N	85°41'56"O		3		
RBAMB	10°13'12"N	84°36'6"O			2	
Monte Verde	10°13'38"N	84°51'28"O		2		
UCR, SJ.	9°56'15"N	84° 2'57"O	5			
UCR, SR.	10° 5'4"N	84°28'43"O	2			

SR=San Ramón RBAMB= Reserva biológica Alberto Manuel Brenes SJ= San José

El análisis de las muestras se realizó en el laboratorio de entomología de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica (UCR) y en el laboratorio de nematología de la Universidad Nacional (UNA). Las plantas fueron cortadas un entrenudo a la vez, iniciando por la base. Cada nudo fue cortado por la parte inferior, de forma que cada entrenudo que se separe de la muestra tuviera un nudo en la parte inferior, que evita que el contenido del mismo se pierda. Los entrenudos fueron colocados sobre una caja petri y abiertos longitudinalmente, con el fin de examinar el contenido de los mismos bajo un

estereoscopio. Se tomaron muestras de colonias de hormigas (reinas y obreras) y nematodos.

Presencia de *Azteca* en los entrenudos de *Cecropia* y la relación con los nematodos (con énfasis en el género *Sclerorhabditis*): En los entrenudos se analizó: 1) la presencia y la(s) especie de hormigas *Azteca*, 2) la presencia de larvas o pupas en la colonia, 3) presencia y cantidad aproximada de obreras, 4) la presencia o ausencia de “pilas” de nematodos, la presencia de nematodos y del género *Sclerorhabditis*, 5) estado del interior del parénquima del entrenudo y si es “virgen” o no (Fig. 2). Un entrenudo virgen se define como uno en el que nunca han ingresado hormigas del género *Azteca*. Para determinar si un entrenudo era virgen o no, se revisaron el prostoma y ambos nudos de cada entrenudo, pues como se explicó anteriormente son estos los puntos utilizados por *Azteca* para ingresar en las cámaras de *Cecropia*. Cualquier entrenudo donde los nudos no se encontraron perforados y con el prostoma cerrado y sin cicatriz, fue considerado virgen.

Montaje para identificación de nematodos: Los nematodos encontrados en las muestras fueron colectados y fijados en formaldehído caliente (entre 80 y 90 °C) al 4%. Cuando la pila de nematodos era muy abundante, se tomó una sección de ésta con unas pinzas. Posteriormente los nematodos fueron transferidos a glicerina pura según el procedimiento descrito por Seinhorst (1959). Se prepararon láminas fijas con una muestra del total de nematodos recolectados, utilizando la técnica del anillo de parafina descrita por De Maeseneer y D’Herde (1963).

Identificación de muestras: De la(s) colonia(s) de hormigas en las plantas se tomaron muestras de reinas y obreras. Estas fueron identificadas utilizando la clave para *Azteca* de Longino (1991a, 1991b, 2007a). Estas mismas claves fueron utilizadas para preparar la clave de hormigas *Azteca* en *Cecropia* de Costa Rica en español para el presente trabajo (anexo). Una colección de las hormigas de *Cecropia* de Costa Rica fue depositada en el Museo de Zoología de la Universidad de Costa Rica como material de referencia para futuros trabajos.

La identificación de los nematodos se llevó únicamente hasta el nivel del género en el caso de *Sclerorhabditis*, contando para esto con la supervisión de Alejandro Esquivel, nematólogo de la Universidad Nacional (UNA) y autor del artículo Esquivel *et al.* (2012) en que se describe la especie *Sclerorhabditis neotropicalis*. Las muestras en las que se encontró dicho género se definieron como positivas.

Las plantas se identificaron con las características presentes en el trabajo de Berg *et al.* (2005). Las plántulas pequeñas sin frutos se utilizaron solo si eran parte de una población de plantas adultas de una única especie.

Hormigas portadoras de nematodos: Para identificar si las hormigas eran portadoras de los nematodos se aplicaron los siguientes pasos:

1) Lavado con agua: Cada hormiga se colocó individualmente sobre una gota de agua por 10 minutos en una caja petri, para hacer que los nematodos en la superficie de la hormiga se desprendieran y así ser recolectados bajo el estereoscopio.

2) Lavado con jabón: Para determinar si las hormigas portaban los nematodos en el interior del cuerpo, las hormigas fueron “lavadas”, tomándolas con una pinza suave, de

forma que no se dañara la hormiga y agitándola dentro de una solución detergente durante 10 segundos, para desprender los nematodos aun presentes en la superficie de la hormiga, que no se hayan desprendido en el paso anterior. La solución detergente consistía de aproximadamente 0.3 mL (5 gotas) de detergente por cada 100 mL de agua; se utilizó detergente doméstico, marca Axion® anti-grasa en su versión líquida. Posterior al lavado se colocó la hormiga en agua pura. En este paso la presencia de los nematodos solo fue revisada como positiva o negativa, sin tener en cuenta la cantidad encontrada.

3)Cortes: Las hormigas fueron cortadas en cabeza, mesosoma y metasoma, y cortando cada sección de forma transversal, utilizando un bisturí. Las distintas secciones se colocaron en una gota de agua sobre una caja petri por 10 minutos con el fin de permitir a los nematodos salir del interior de la hormiga. Los nematodos encontrados en cualquiera de los pasos fueron recolectados y conservados para su posterior análisis, según las técnicas previamente descritas.

Se utilizaron 63 reinas vivas (11 de *A. alfari*, 9 *A. courulepennis*, 32 *A. constructor*, 2 *A. ovaticeps* y 9 *A. xanthochroa*) recolectadas en las distintas especies de *Cecropia* incluidas en el estudio. Dos de las reinas de *A. constructor* se encontraron fuera de la planta, se trataba de hormigas colonizadoras, esto sugiere que se trataba de hormigas que no habían logrado ingresar a la planta en la que fueron encontradas. Las 11 hormigas de *A. alfari* analizadas fueron de reinas aladas (vírgenes, aun en el nido materno).

Observaciones de la interacción entre los nematodos y *Azteca* dentro de los nidos: Con el objetivo de analizar la relación entre las hormigas y los nematodos, se desarrolló un método para conservar las colonias de *Azteca* vivas fuera de la planta, lo que

facilitó su observación. Para esto, se llevaron al laboratorio de entomología colonias pequeñas (o parte de colonias) de *Azteca*, que incluyeran reinas, obreras y cría (huevos, larvas y/o pupas), provenientes de las plantas recolectadas. Se colocó la sección (uno o pocos entrenudos) de la planta donde habitaba una colonia sobre una caja de petri y se mantuvieron dentro de un recipiente de plástico con tapa.

A las colonias que se mantuvieron en el laboratorio se les colocaron gotas (de 3 a 4) de agua por semana, para mantener la humedad y para consumo de las hormigas. Además con el objetivo de alimentar las colonias dentro de los recipientes en que se encontraba la colonia se colocaron cuerpos de Müller tomados de trichilia de *C. obtusifolia*, cortados de plantas en el campus de la UCR; así como papel humedecido con agua azucarada y granos de azúcar, posibles sustitutos de alimento de las hormigas.

Se conservaron 11 colonias en el laboratorio, provenientes de diferentes plantas. En los casos en los que la colonia de hormigas murió, pero se encontraban nematodos con vida, estos se conservaron para estudiar que tanto tiempo se mantenían con vida en ausencia de las hormigas. Adicional a estos nematodos se mantuvieron en el laboratorio otros cuatro entrenudos de *Cecropia* en los que se encontraron nematodos sin hormigas.

Las colonias en el laboratorio fueron revisadas periódicamente por intervalos de 5 minutos dos veces al día, dos veces por semana, tomando nota sobre las actividades realizadas por las hormigas con respecto a las pilas de nematodos.

RESULTADOS

Se analizaron en total 576 entrenudos de cuatro especies de *Cecropia* presentes en Costa Rica; 243 de *C. peltata*, 141 de *C. obtusifolia*, 100 de *C. angustifolia* y 92 de *C. insignis*. El promedio de altura y cantidad de entrenudos por planta fue de 111 cm y 28 entrenudos respectivamente.

Presencia de *Azteca* en los entrenudos de *Cecropia* y la relación con los nematodos (con énfasis en el género *Sclerorhabditis*): De las 23 plantas analizadas únicamente dos, una de *C. angustifolia* y una de *C. peltata*, no contenían hormigas del género *Azteca* en su interior. De los 576 entrenudos, 226 colonizados por una (a veces dos) de las cinco especies de hormigas *Azteca* de *Cecropia* reportadas para Costa Rica. La distribución por número de entrenudos habitados, de las especies de *Azteca* fue: 72 (12,5%) entrenudos eran de *A. xanthochroa*, 57 (9,9%) de *A. coeruleipennis*, 44 (7,6%) de *A. constructor*, 30 (5,2%) de *A. ovaticeps* y 23 (4%) de *A. alfari*. El resto de los entrenudos se dividió según el estado de su prostoma en: 110 (19,1%) entrenudos no vírgenes (abandonados por *Azteca*) y 240 (41,7%) entrenudos vírgenes (nunca fueron habitados por *Azteca*). Estas dos últimas categorías, aunque no presentaban hormigas *Azteca*, sí estaban habitados en algunas ocasiones por picudos *Lissoderessp.* (Coleoptera: Curculionidae) u otras especies de hormigas. En los entrenudos no vírgenes además fue común encontrar restos de reinas de hormigas *Azteca*. La Fig.3 muestra la distribución de las diferentes especies de *Azteca* en las especies de *Cecropia* estudiadas. *C. peltata* es la única especie en la que se encontraron todas las especies de *Azteca* la única en la que se encontraron las

especies *A. coeruleipennis* y *A. alfari*. *A. xanthochroa* y *A. constructor* son las especies encontradas en más especies de *Cecropia* con tres cada una.

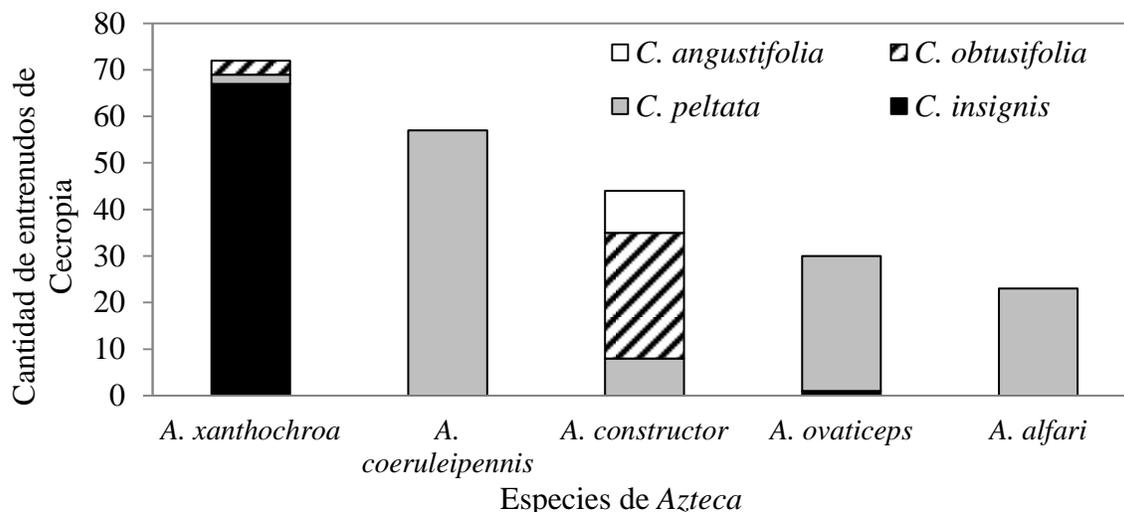


Fig. 3. Cantidad de entrenudos de cuatro especies de *Cecropia* habitados por hormigas *Azteca* (n = 576).

El cuadro 2 resume las 20 posibles combinaciones en Costa Rica de *Azteca* y *Cecropia*. De estas en el presente estudio se analizaron 9 con respecto a la presencia de nematodos en general y de *Sclerorhabditis* en específico, encontrándose nematodos en todas las combinaciones analizadas, y *Sclerorhabditis* también en todas las combinaciones con excepción de *A. xanthochroa* con *C. obtusifolia*. De las posibles combinaciones, solo las que incluyen a *C. peltata* pudieron ser analizadas en su totalidad. Los nematodos estuvieron presentes en al menos una planta en cada sitio de muestreo y *Sclerorhabditis* estuvo presente en todos los sitios a excepción de la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes en San Ramón (Fig. 4). La distribución geográfica de las diferentes especies de *Azteca* en cada una de las especies de guarumo (Fig. 3 y 4) se adapta a los registros presentados por estudios previos (Downhower 1975, Schupp 1986, Longino

1989a, 1989b, 1996, 2007a, Alvarez-Buylla & Martinez-Ramos 1992, Longino & Colwell 1997, Fáveri & Vasconcelos 2004).

CUADRO II

Presencia de nematodos y *Sclerorhabditis* en combinación con diferentes especies de *Cecropia* y *Azteca*

<i>Azteca</i>	<i>C. insignis</i>		<i>C. peltata</i>		<i>C. obtusifolia</i>		<i>C. angustifolia</i>	
	Nem	Sclero	Nem	Sclero	Nem	Sclero	Nem	Sclero
<i>A. constructor</i>	?	?	+	+	+	+	+	+
<i>A. xanthochroa</i>	+	+	+	+	+	-	?	?
<i>A. coeruleipennis</i>	?	?	+	+	?	?	?	?
<i>A. alfari</i>	?	?	+	+	?	?	?	?
<i>A. ovaticeps</i>	?	?	+	+	?	?	?	?

Nem = Nematodos *Sclero* = *Sclerorhabditis*

? = combinación no encontrada en el presente estudio

De los entrenudos analizados de *Cecropia*, se encontraron nematodos en 103, de estos, en 96 junto a los nematodos (en sentido general, sin importar el género), se encontró al menos una especie de hormigas *Azteca*. Al analizar la relación entre la presencia y ausencia de nematodos en los entrenudos, se encontró diferencia significativa ($X^2=153$, $p < 0.001$) entre los entrenudos en los que se encontraron hormigas *Aztecay* en los que no (Fig. 5). De forma similar se analizó la relación entre el estado del prostoma del entrenudo con la presencia de nematodos, encontrando que existe también una diferencia significativa ($X^2=89$, $p < 0.001$) en la distribución de los nematodos según el estado del entrenudo, si este era virgen o no, no habiéndose encontrado nematodos en ningún entrenudo virgen (Fig. 6). De los 103 entrenudos en los que se encontraron nematodos, en 79 (76%) de los entrenudos se encontró el género *Sclerorhabditis*. El resto de los casos (24%) corresponde a muestras en las que se encontraron otros géneros de nematodos, los cuales no fue

posible identificar. Sin embargo, se sabe que pertenecen al grupo de los Rhabditidos y son probablemente bacteriófagos, al igual que *Sclerorhabditis*.

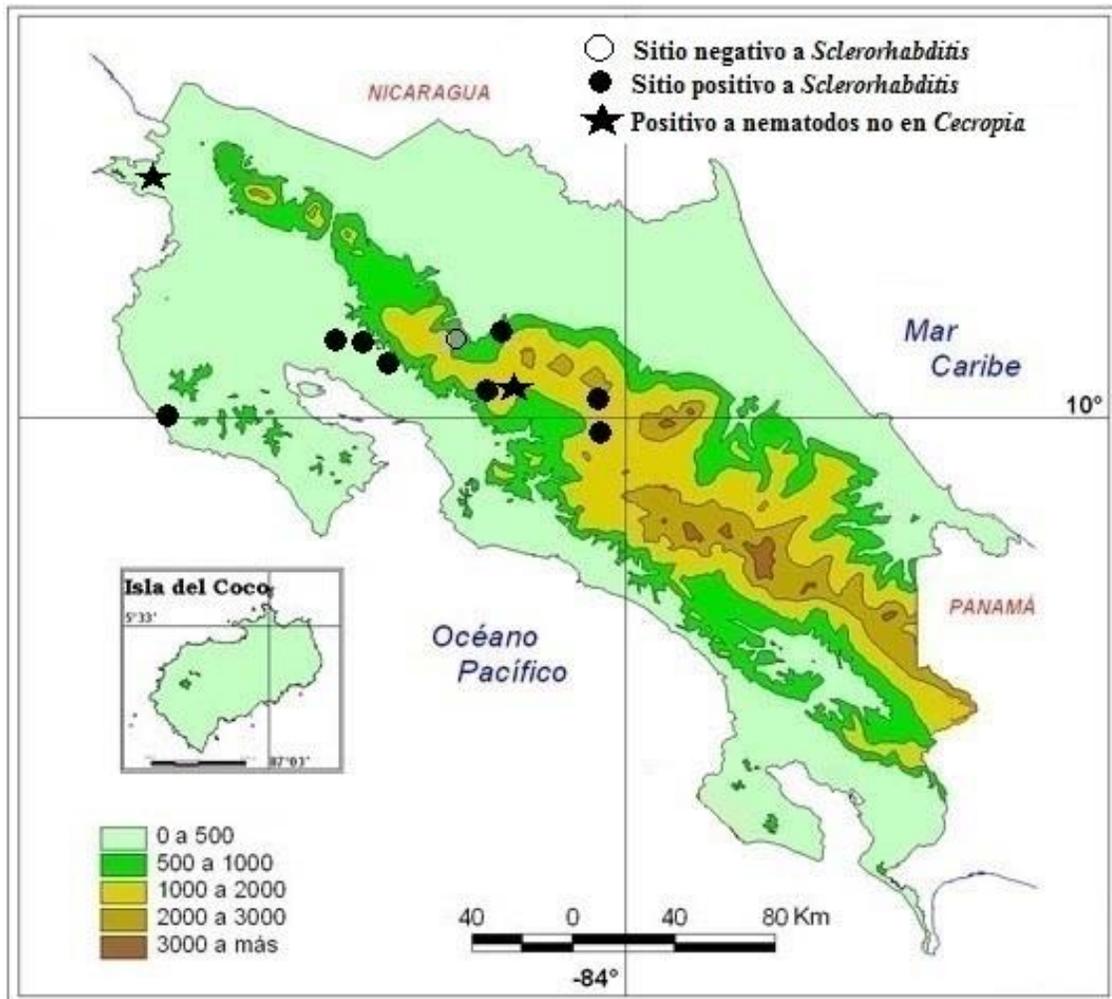


Fig. 4. Mapa de relieve de Costa Rica en el que se representa los sitios en que se encontraron plantas con nematodos junto a hormigas *Azteca*. Los dos círculos sin relleno corresponden a las muestras de *Cordia alliodora* y *Mangifera indica* en las que se encontraron nematodos. Figura modificada de Inbio (2005).

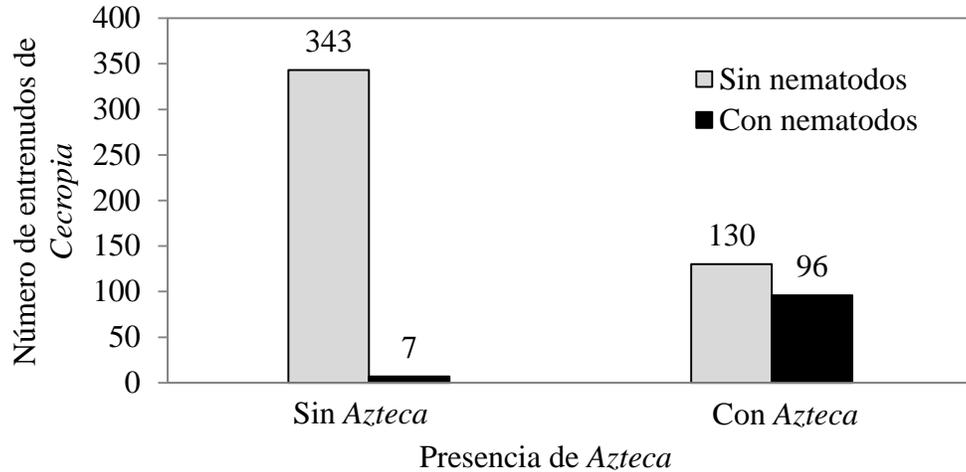


Fig. 5. Cantidad de entrenudos de *Cecropia*, en los que se encontraron nematodos y la relación con la ausencia o presencia de del género *Azteca* (n = 576, $X^2=153$, $p < 0.001$).

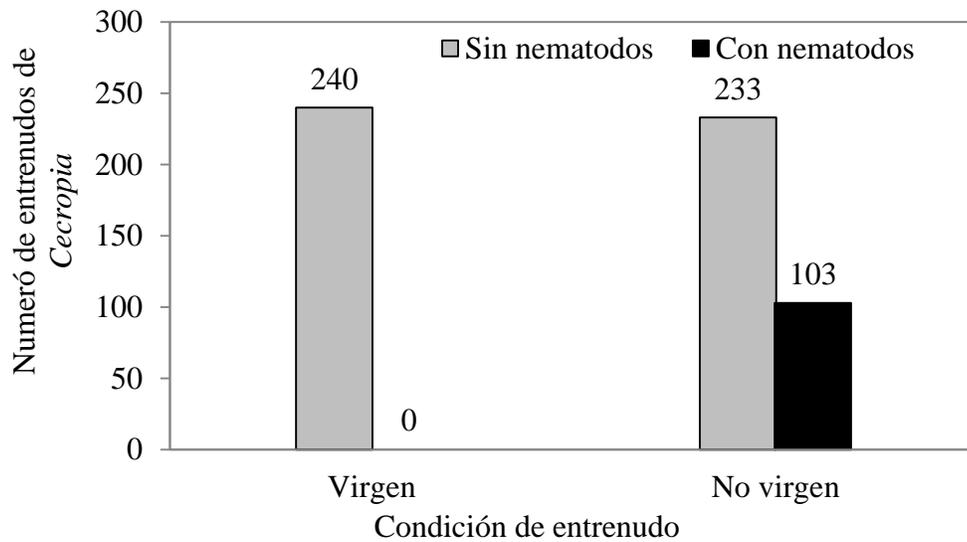


Fig. 6. Cantidad de entrenudos de *Cecropia* en los que se encontraron nematodos y la relación con la condición del entrenamiento (n = 576, $X^2=89$, $p < 0.001$).

LaFig. 7muestra los nematodos en entrenudos habitados por cada una de las especies de *Aztec* presentes en el país. *A. constructor* es la especie con mayor presencia de nematodos en sus nidos, encontrado estos en cerca de un 59% de los entrenudos habitados por esta especie de hormiga. Los entrenudos habitados por *A. ovaticeps* presentan el menor

porcentaje en cuanto a la presencia de nematodos con tan solo un 20%. El porcentaje más bajo de entrenudos con nematodos se encuentra en dos categorías: los entrenudos abandonados por *Azteca* (no vírgenes) que representaron solo un 2% de los entrenudos y los entrenudos vírgenes, en los que no se encontró nematodos en ningún caso (estos últimos no incluidos en la Fig. 7).

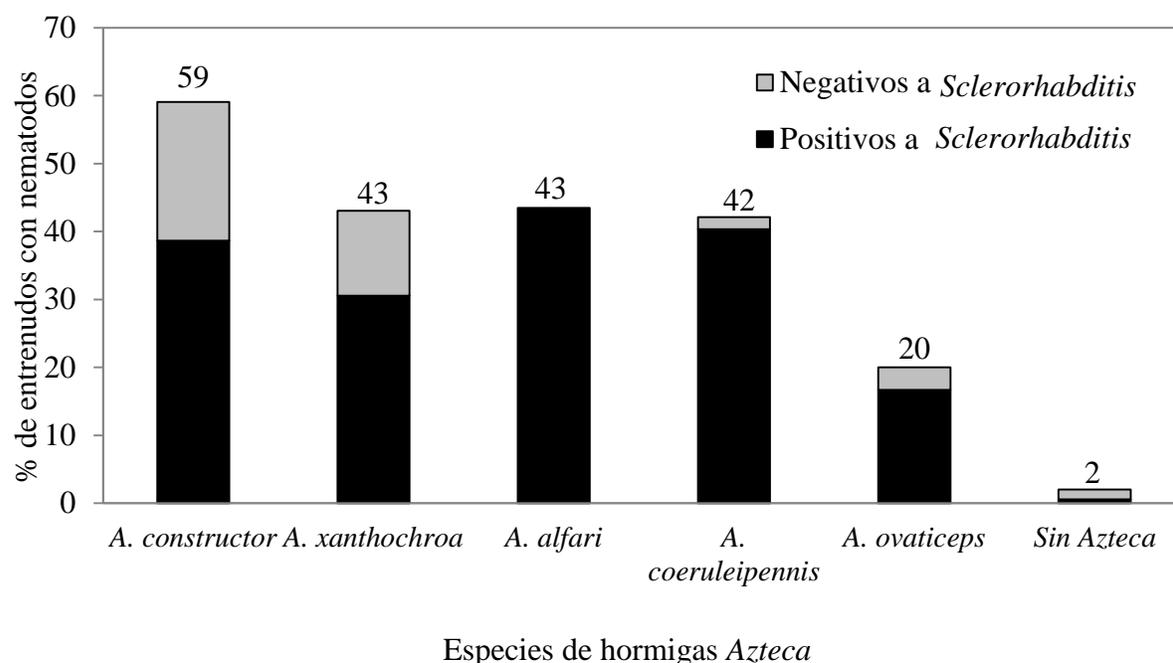


Fig. 7. Porcentaje de entrenudos de *Cecropia* habitados por nematodos (divididos en pilas de nematodos negativas o positivas al género *Sclerorhabditis*)según la especie de hormiga *Azteca* que se encontraban en el entrenudo (n = 104).

En las cuatro especies de *Cecropia* se encontraron nematodos; la Fig. 8 muestra el porcentaje de entrenudos habitados por cada especie. *C. insignis* es la especie con mayor porcentaje de entrenudos con nematodos y *C. angustifolia* es la que menor porcentaje de entrenudos fueron positivos a la presencia de nematodos. En el caso de las muestras de *Cordia alliodora* (Boraginaceae) también se encontraron nematodos junto con las hormigas,

en este caso *Aztecapittieri*, y también fue posible encontrar el género *Sclerorhabditis*. En *Mangifera indica*(Anacardiaceae) se encontró un nido de *Aztecainstabilis*, en este caso también se halló una masa color oscuro y apariencia húmeda, similar a la encontrada en las colonias de *Azteca* en *Cecropia*, que contenía nematodos, pero el género *Sclerorhabditis* no fue encontrado dentro de la muestra analizada.

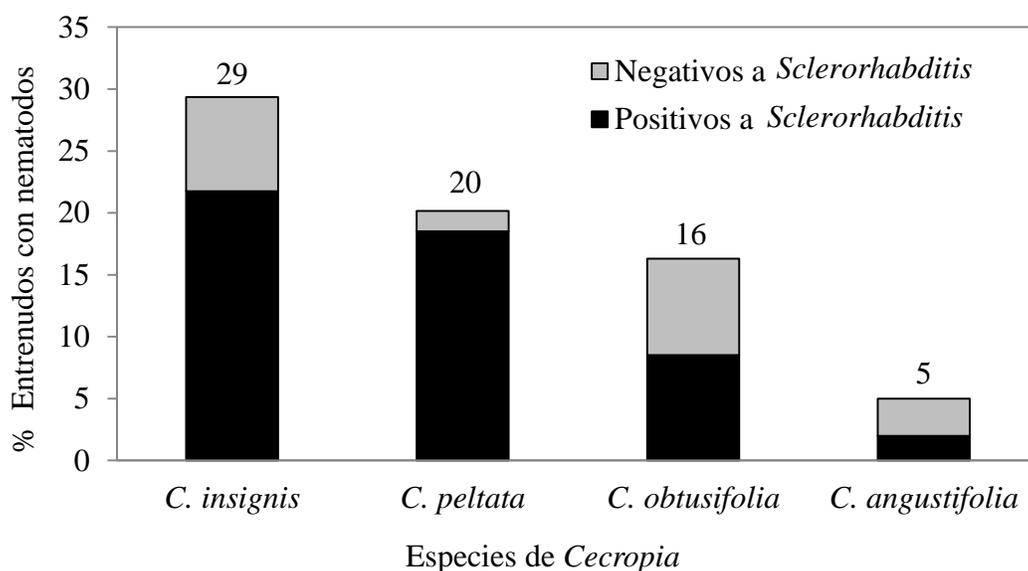


Fig. 8. Porcentaje de entrenudos de *Cecropia* habitados por nematodos (divididos en pilas de nematodos negativos o positivos al género *Sclerorhabditis*)según la especie de *Cecropia*enque se encontraban (n = 104).

Hormigas portadoras de nematodos: Los datos generales resultado de cada uno de los pasos de lavado de las hormigas se presentan a continuación. Así como algunos casos considerados de importancia para la investigación.

1)El lavado con agua: fue aplicado a 63 reinas de *Azteca*; encontrando nematodos en 29 (46%) de las hormigas. De estos últimos,25 fueron positivos al género *Sclerorhabditis*. En 6 casos la colonia de hormigas no tenía una pila de parénquima, que es

donde habitualmente se encuentran los nematodos y estos se encontraron solo sobre la reina. Las dos reinas colonizadoras de *A. constructor*, encontradas abriendo el prostoma de plantas de *C. obtusifolia*, portaban nematodos y una fue positiva a *Sclerorhabditis*. Casos importantes a mencionar son once reinas aladas de *A. alfari*, en dos de estas se encontraron nematodos, ambos positivos al género *Sclerorhabditis*.

2) lavado con jabón: Fue aplicado a 32 reinas, todas habiendo pasado antes por el lavado con agua. Se encontraron nematodos en 11 hormigas tras el lavado con jabón. Este paso se aplicó a dos de las reinas aladas mencionadas anteriormente, obteniéndose en ambos casos un negativo para la presencia de los nematodos.

3) Cortes: se aplicó en total a 28 reinas, y fue posible encontrar nematodos en las tres secciones cortadas. El mayor número de positivos a nematodos fue para la sección del metasoma, con nueve; después el mesosoma en el que se encontraron en 7 casos; y finalmente la cabeza con 4. En los casos positivos el número de nematodos en cada sección fue variable. Para el mesosoma y la cabeza el número de nematodos estuvo entre 1 y 4. El metasoma fue la sección con mayor cantidad de nematodos, encontrándose hasta 18.

Observaciones de la interacción entre los nematodos y *Azteca* dentro de los nidos: En total se llevaron al laboratorio 10 colonias de hormigas. De estas: 4 eran de *A. constructor*, 2 de *A. coeruleipennis*, 3 de *A. xanthochroa* y 1 de *A. ovaticeps*. Todas las colonias contaban con una reina, obreras, cría y nematodos ubicados en pasta o trozos de parénquima. Tres de las colonias no se establecieron, muriendo en los primeros tres días en el laboratorio. De las restantes siete, 3 colonias de *A. constructor* se establecieron en el laboratorio y fue posible mantenerlas por un periodo de cerca de 15 días cada una; las

restantes colonias (2 de *A. coeruleipennis*, 1 de *A. xanthochroa* y 1 de *A. ovaticeps*) se mantuvieron por un periodo mayor a un mes. En estas últimas incluso se observó un incremento en el número de obreras adultas en la colonia. Transcurrido el mes, las colonias suelen a disminuir en número y finalmente morir, iniciando por la muerte de las obreras y posteriormente la reina.

La conservación de las colonias en el laboratorio se vio simplificada, porque las colonias estudiadas no se desplazaron fuera del contenedor plástico en el cual se les colocó. De hecho las obreras rara vez abandonaban la sección de *Cecropia* en la que habitaba la colonia, y la reina nunca lo hizo. Solo en dos casos las obreras de una colonia de *A. xanthochroa* buscaron los agujeros realizados para ventilación en la tapa del recipiente y utilizando sus mandíbulas los ampliaron hasta ser capaces de salir por el mismo. Sin embargo, tras salir no se alejaron y volvieron a la colonia. Solamente en un caso las obreras escaparon del recipiente, durante un periodo en que no estaban vigiladas y no regresaron a la colonia.

En términos de tiempo, la conservación de las colonias en el laboratorio fue más exitosa cuando en el nido se encontraban alta cantidad de cuerpos de Müller, que la colonia conserva apilados junto con las crías, como reserva de alimento. La principal ventaja de que la colonia posea una reserva de alimento se debe a que en cerca del 95% de los casos en que se colocaron trichilia con las colonias conservadas, los cuerpos de Müller fueron removidos por las obreras de la colonia y lanzados lejos de la sección de *Cecropia* donde la colonia se mantenía. Esto mismo sucedió con los cuerpos de Müller removidos del triquilio con pinzas y colocados dentro del nido. En pocos casos los cuerpos de Müller fueron llevados al interior del nido por las obreras, donde fueron dejados.

La muerte de las colonias en el laboratorio parece estar asociado con la disminución de cuerpos de Müller. Al disminuir el número de cuerpos de Müller almacenados por la colonia, el número de obreras disminuyó rápidamente, así como el de huevos, larvas y pupas. Posteriormente la colonia murió, siendo siempre la reina la última en morir, la cual puede mantenerse viva sin alimento hasta por 22 días. En una colonia de *A. constructor* que se encontraba sin reserva de alimento, se colocaron cuerpos de Müller cerca de la reina de la colonia, y esta rápidamente los comía, a diferencia de las obreras, las cuales los eliminaban fuera del área del nido.

El azúcar como sustituto para el alimento (tanto disuelta en agua como en granos) no fue utilizada por las hormigas en ningún caso. Al colocar las gotas de agua, cuyo objetivo era humedecer el recipiente y consumo para las hormigas, fueron rodeadas el 80% de las veces por un círculo de obreras, que daban la impresión de estar bebiendo (Fig. 9).

Al morir las colonias se mantuvieron los nematodos en los recipientes en que se mantenían. En los diez casos los nematodos se mantuvieron por más de un mes con vida. Los nematodos de la colonia de *A. xanthochroa* se mantuvieron por dos meses más, tras la muerte de la última obrera. Es importante notar que mientras la colonia de hormigas se mantenía con vida era posible encontrar los nematodos únicamente en la pasta, sin embargo, al morir la obreras de la colonia los nematodos se dispersaban por todo el trozo de *Cecropia* en el que habitaba la colonia de hormigas.



Fig. 9. Colonia de *Azteca xanthochroa* en el laboratorio. (A) Sección de *Cecropia obtusifolia*, en que se encuentra la colonia. (B) Obreras alrededor de una gota de agua colocada en la base del nido.

En total se realizaron 50 tiempos de observación de 5 minutos cada uno, sin encontrar patrones de comportamiento repetidos de las hormigas con respecto a las pilas de nematodo, a excepción del paso ocasional de las obreras de la colonia sobre la pasta en que se encuentran los nematodos (este comportamiento representa el 99% de las interacciones entre las hormigas y la pila de nematodos registrados). Dos comportamientos vistos en una sola ocasión cada uno, merecen ser mencionados: 1) una obrera de *A. xanthochroa* fue vista caminar y detenerse sobre la pila de nematodos, en este punto la obrera recurvo un poco el metasoma y deposito sobre la pila de nematodos una gota de líquido color pardo, proveniente de su ano. 2) En la misma colonia de *A. xanthochroa*, en una de las gotas de agua colocadas dentro del nido, se encontró un trozo de parénquima similar al encontrado en las pilas en que encuentran los nematodos, impregnado de agua, que posteriormente fue trasladado por una obrera hasta la pila de nematodos y dejado en este sitio. En este último caso, no se observó cómo llegó el trozo de parénquima a la gota de agua, pero es bastante

probable que una hormiga lo colocara en este sitio pues el nido se encontraba dentro de un recipiente tapado en el laboratorio donde no tenía ningún tipo de alteración externa.

Otro comportamiento observado comúnmente consistió en ver nematodos en un solo sitio, con el extremo superior del cuerpo extendido hacia arriba “en el aire” y moviéndose regularmente, movimientos llamados nictatorios (Molina 2003, Brown *et al.* 2011). Sin embargo, por no ser un comportamiento estrictamente de interacción nematodos-hormigas y dado que el número de nematodos en una pila es tan grande, no se realizó ninguna medida de la cantidad de nematodos realizando los movimientos nictatorios o del tiempo invertido en esta actividad.

DISCUSIÓN

Presencia de *Azteca* en los entrenudos de *Cecropia* y la relación con los nematodos (con énfasis en el género *Sclerorhabditis*): La presencia de hormigas *Azteca* en la mayoría de las plantas, a pesar de su pequeño tamaño, se debe a la temprana colonización, aun antes de alcanzar un metro de altura (Longino 1989b). Sin embargo, el tamaño también puede explicar la ausencia de hormigas en una de las muestras de *C. peltata*, pues en el caso de la planta sin *Azteca*, el tamaño de la misma era de solo 0.40 m y los tricilia de dicha planta aun no producían cuerpos de Müller, por lo que probablemente no podrían mantener una colonia de hormigas. El otro caso de planta sin *Azteca* corresponde a una planta de *C. angustifolia*, la cual no es comúnmente habitada por *Azteca* (Janzen 1973, Longino 1989a, Naoki & Toapanta 2001, Berg *et al.* 2005, Valverde & Hanson 2011), pero en la que sí es posible encontrar reinas con vida. Tal es el caso de las otras tres plantas de esta especie analizadas en el presente estudio, en las cuales se encontraron reinas de *A. constructor*, sin haber encontrado colonias establecidas.

A pesar de que se supone que las hormigas *Azteca* son poco específicas con respecto a la especie de *Cecropia* que colonizan (Longino 1989b), *C. peltata* fue la única en que se encontraron las cinco especies de *Azteca* comunes en *Cecropia*. *C. peltata* es además la única *Cecropia* en que se encontraron *A. alfari*, *A. coeruleipennis*, a excepción de una sola colonia, *A. ovaticeps* (Fig. 3). Esto podría sugerir una preferencia de algunas especies de *Azteca*, hacia esta especie de *Cecropia*.

Las combinaciones de *C. insignis* con *A. constructor* y *A. coeruleipennis*, no encontradas en el presente estudio, tampoco han sido encontradas por Longino (1989b), lo

que sugiere que estas combinaciones no se dan en el campo, posiblemente debido a diferencias geográficas en la distribución de las especies o que son difíciles de encontrar. Las otras combinaciones no encontradas en el presente estudio sí han sido reportadas (Longino 1989b), a excepción de las que involucran a *C. angustifolia*, la cual como ya se mencionó anteriormente no es habitada por *Azteca*.

El alto porcentaje de entrenudos de *Cecropia*, en los que se encontraron hormigas pero no nematodos puede indicar que los nematodos no desempeñar un papel indispensable en los nidos de *Azteca*, al no estar presentes en la totalidad de estos. Otra posible explicación, para no haber encontrado nematodos en los entrenudos habitados por *Azteca*, es la imposibilidad de encontrar los nematodos en los nidos registrados como negativos, debido a factores como el pequeño tamaño de los nematodos. Por ejemplo en el género *Sclerorhabditis* los individuos más grandes alcanzan solo los 560 μm (Esquivel *et al.* 2012). Además su color transparente y su posiblemente bajo número en colonias jóvenes, como las analizadas en el presente estudio hacen que exista la posibilidad de no ser detectados, aun con el uso de un estereoscopio, si los mismos no se encontraban en movimiento o en un sitio visible al momento de la revisión.

La combinación de *C. obtusifolia* y *A. xanthochroa*, de las combinaciones encontradas, fue la única negativa a la presencia de *Sclerorhabditis* a pesar de si encontrarse nematodos de otros géneros. Esto puede ser producto de: 1) no se encontraba en ninguno de los tres entrenudos, en que se encontró esta combinación, junto con los nematodos presentes, 2) al tomar la muestra de los entrenudos no se recolectaron nematodos de este género; o 3) no se presenta cuando se da esta combinación. Sin embargo, el último caso se puede descartar debido a la presencia del *Sclerorhabditis* en plantas de

Cecropia habitadas por *A. constructor*. Similar razonamiento se puede aplicar a la combinación de *Sclerorhabditis* con *A. xanthochroa*, ya que sí fue encontrado en entrenudos de *C. insignis* y *C. peltata* habitados por esta especie de *Azteca*. Para descartar las dos posibilidades restantes, como en el caso de las combinaciones no estudiadas aun, son necesarios más estudios de campo, en busca de nematodos y en específico de *Sclerorhabditis*.

Se determinó que la presencia de los nematodos se ve relacionada, de manera significativa, con la presencia o ausencia de las hormigas. *Sclerorhabditis* (y cualquier nematodo en general) fue encontrado únicamente en entrenudos no vírgenes. Siendo estos los únicos sitios por los que suelen ingresar las diferentes especies de *Azteca* en los entrenudos de *Cecropia* (Choe & Perlman 1997). Se puede afirmar que los nematodos (incluido *Sclerorhabditis*), que normalmente se encuentran en *Cecropia*, se encuentran únicamente en entrenudos que están o estuvieron en algún momento habitados por hormigas *Azteca*. Esto a su vez, sumado a los casos en los que se encontraron nematodos en los lavados de reinas fundadoras, podría sugerir que los nematodos llegan con las hormigas y están presentes desde la fundación del nido, posiblemente llegando los mismos con la reina fundadora.

Como se comentó anteriormente los nematodos son capaces de sobrevivir sin estar en compañía de las hormigas por hasta un mes. Esto explica los entrenudos no vírgenes en los que se encontraron nematodos, pero que no son habitados por *Azteca*. Es probable que estos nematodos en entrenudos sin *Azteca* han sido dejados en los entrenudos por colonias que se han desplazado a otros entrenudos más altos en la planta (Janzen 1973, Choe & Perlman 1997) o que han muerto.

En términos de tiempo, la relación entre *Azteca* y los nematodos podría ser más antigua que la relación entre *Azteca* y *Cecropia*. Esta idea explicaría por qué los nematodos se encuentran junto a especies de *Azteca* que no habitan en *Cecropia*, como lo son *A. instabilis* (encontrada en *Mangifera indica*) y *Azteca pittieri* (en *Cordia alliodora*), además de todas las especies de *Azteca* que sí habitan *Cecropia* en Costa Rica.

Longino (1989b, 1991) separa las especies de *Azteca* de Costa Rica en dos (quizá tres) grupos que colonizaron en momentos diferentes las plantas de *Cecropia*, basado en el comportamiento y morfología de las especies. Esta idea sugiere también que la relación entre los nematodos y *Azteca* es más antigua que la relación de estas últimas con *Cecropia*. Esto debido a que es más probable que el establecimiento de la relación entre los nematodos y *Azteca* se diera una sola vez, a lo largo un grupomonofilético (o quizá todo el género) de hormigas *Aztecac* cuando aún no eran habitantes de *Cecropia*.

No está claro si existe una relación entre los nematodos y *Cecropia*. Sagers *et al.* (2000) mostró a través de rastro de isótopos que existe un intercambio de nutrientes entre *Cecropia* y las hormigas que la habitan, y si *Azteca* está recibiendo nutrientes de los nematodos, la presencia de estos últimos beneficiaría indirectamente a las plantas. Sin embargo, no sabemos si existe una vía de nutrientes directa entre los nematodos y la planta. Es posible que *Cecropia* absorba nutrientes, como el nitrógeno, que los nematodos excretan, pero son necesarios estudios que prueben si el desarrollo de la planta se ve influenciado por la presencia o ausencia de los nematodos.

Hormigas portadoras de nematodos: El lavado con agua mostró tener cierta efectividad, pues en este fue posible encontrar nematodos en un porcentaje (46%) de las

reinas analizadas. Sin embargo, la cantidad de estos casos pudo ser menor que el real por la posibilidad que en algunos casos los nematodos no se desprendieran de las hormigas, provocando falsos negativos.

En aproximadamente 34% de los casos las hormigas aun portaban nematodos en su cuerpo tras el lavado con jabón. Sin embargo, debido a ser un método utilizado por primera vez y que no es posible medir la efectividad del jabón para retirar los nematodos de la superficie de las hormigas (pues no son visibles sobre éstas), no se puede decir que estrictamente estos nematodos se encontraran en el interior de las hormigas. Es posible que los mismos simplemente son nematodos de la superficie y que resistieron el lavado con jabón. Caso diferente sería si tras el lavado con jabón no se encontraran nematodos hasta el momento de cortar las hormigas, lo cual hubiera indicado claramente que se encontraban en el interior de estas.

Los nematodos se encontraron en las tres secciones en que se cortaron las reinas. La función de estos en las diferentes secciones de las hormigas es incierta; sin embargo, pueden encontrarse solo en una etapa inmadura de colonización entre diferentes sitios, en la que utilizan como a la hormiga como medio de transporte.

Es también posible que los nematodos se alimenten o sobrevivan sobre las hormigas. El metasoma fue la sección en que más nematodos se encontraron. Esta preferencia puede deberse a la mayor variedad de sitios, provistos de humedad como las divisiones, el ano, entre tergitos y los espiráculos, que pueden servir de refugio, sobre todo si la comparamos con la cabeza que posee relativamente pocos orificios. Otra posible razón para la preferencia del metasoma es la presencia del ano como fuente de alimentos, el cual

se podría suponer, es una fuente de bacterias. No se sabe si existen beneficios para las hormigas en cargar a los nematodos, pero evidentemente tampoco es fácil para las hormigas eliminar los nematodos de su cuerpo, pues si estos sobrevivieron a los diferentes lavados realizados en el presente estudio resulta obvio que es poco lo que podrían hacer las hormigas para librarse de estos. Por lo que el llevar los nematodos es una condición determinada solo por la posibilidad de que las hormigas se acerquen o no a las zonas donde estos se encuentran.

Finalmente debe aclararse que por ser este un procedimiento experimental nuevo y que por tanto no existe punto de comparación, por lo que existe la posibilidad de que los nematodos en su totalidad se encontraran en el interior de las hormigas y que al ser “lavadas” en cualquiera de los pasos realizados estos salieran, ya sea a través de los espiráculos, la unión entre las placas del exoesqueleto o cualquier orificio, y que los mismos resisten los distintos lavados y salieron debido a diferentes circunstancias como por ejemplo la entrada de agua o la muerte de la hormiga portadora.

Observaciones de la interacción entre los nematodos y *Azteca* dentro de los nidos:El rol específico de los nematodos encontrados en los nidos de *Azteca* es aún desconocido, así como el tipo de relación y si la misma es beneficiosa o no para las hormigas es desconocido. Pero, sabemos que los nematodos de los géneros *Sclerorhabditis* y *Diploscapter*, otro género que se es común encontrar junto con *Azteca* en *Cecropia*, según Ahmad *et al.*(2007), son probablemente bacteriófagos, por lo que podemos pensar que no son parásitos directos de las hormigas. Este resultado concuerda con las observaciones de nematodos vivos tiempo después de la muerte de las hormigas, pues estos no se alimentarían de ellas. El hecho de que los nematodos se mantengan en un solo punto

mientras la colonia de hormigas esta con vida y tras la muerte de las hormigas se desplacen por toda el área del antiguo nido sugiere que las hormigas los mantienen, de alguna forma desconocida, restringidos en una pequeña zona (la pila de parénquima raspado de la planta).

Como se señaló anteriormente, se observaron hormigas, en una ocasión, depositando una sustancia líquida proveniente de su ano sobre la pila donde se encuentran los nematodos y también colocar sobre esta área un material humedecido muy similar al parénquima raspado del interior de la planta. Esto podría sugerir que las hormigas mantienen la humedad de la pila para beneficio de los nematodos, los cuales dependen de un ambiente muy húmedo para sobrevivir (Ruppert y Barnes 1996). Otro posible beneficio, más evidente, para los nematodos es un vector para moverse (foresis). Debido a su pequeño tamaño y reducida movilidad los nematodos requieren de un medio de transporte eficiente (Krishnan *et al.* 2010), el cual puede consistir de las hormigas aladas las cuales viajan en busca de plantas si colonizar y pueden llevar a los nematodos sobre ellas en estos viajes.

Los nematodos deben llegar a las hormigas al estas acercarse a las pilas de nematodos, utilizando los movimientos nictatorios vistos durante las observaciones realizadas en el presente estudio y que se sabe son utilizados por los nematodos cuando se encuentran en una etapa colonizadora (Brown *et al.* 2011). En las reinas aladas de *A. alfari* y las reinas colonizadoras lavadas, se encontraron nematodos, lo que sugiere que los nematodos de las colonias vienen de la colonia madre. Los nematodos son llevados por las reinas vírgenes al salir del nido materno, como sucede con el hongo llevado por las hormigas Attini.

Existe una relación entre las hormigas del género *Azteca* y un grupo de nematodos Rhabditidos (incluido el género *Sclerorhabditis*). Los posibles beneficios para los nematodos pueden incluir, como ya se mencionó, el transporte y acceso a alimento (bacterias) producto de la actividad de las hormigas. Sin embargo, la naturaleza, alcance y el posible beneficio o desventaja de esta relación para las hormigas no está clara. Dentro de las posibilidades, si consideramos la relación mutualista o incluso simbiótica, se encuentran: 1) La eliminación de bacterias patógenas para las hormigas, tanto sobre su cuerpo como en el nido. 2) Los nematodos son posible fuente de alimento para las hormigas adultas o larvas. Si consideramos el pequeño tamaño de los nematodos únicamente, esto no parece viable, pero, si consideramos que dentro de una sola pila de nematodos en *Cecropia* se calcula podrían haber hasta 22.000 individuos y que en nidos grandes hay varias pilas con nematodos, estos podrían representar una buena fuente de alimento, en forma de proteína. Sin embargo, durante las observaciones no fue posible ver a las hormigas alimentarse de estos. Por lo que para probar esta posibilidad es necesario realizar disecciones del tracto digestivo de las hormigas, tanto adultas y larvas, para comprobar si los nematodos sirven de alimento. 3) Recursos como el nitrógeno que los nematodos obtienen de las bacterias y excretan en forma de amonio podría ser absorbido por la planta hospedera o por las mismas hormigas. Por último se debe incluir también la posibilidad de una relación comensalista, en la que las hormigas no se beneficien de ninguna forma e incluso podría causar posibles perjuicios para estas por parte de los nematodos.

Para determinar el tipo de relación entre nematodos y *Azteca* se deben hacer estudios comparativos entre colonias de hormigas en el laboratorio con y sin nematodos. Esto representa un reto pues sería necesario la eliminación de los nematodos de

las colonias, lo cual, dado que los mismo se pueden encontrar sobre las hormigas, es difícil de conseguir. Es posible explorar y experimentar con diferentes químicos en busca de productos capaces de eliminar a los nematodos sin dañar a las hormigas, para de esta manera determinar si el desarrollo de las colonias se veafectado por los nematodos.

CONCLUSIONES

- Es posible encontrar nematodos Rhabditidos con todas las especies de *Azteca* que habitan, de forma obligatoria, en las cuatro especies continentales de *Cecropia* en Costa Rica.
- Es común encontrar los nematodos en entrenudos de *Cecropia* que son o fueron habitados por *Azteca*, pero no se encontraron en los que nunca estuvieron habitados por *Azteca*.
- El género *Sclerorhabditis* se encuentra junto con todas las especies de *Azteca* que habitan plantas de *Cecropia* en Costa Rica.
- Es posible encontrar nematodos en plantas diferentes a *Cecropia* habitadas por hormigas *Azteca*.
- Los nematodos se pueden encontrar sobre el cuerpo de las hormigas *Azteca*.
- *Sclerorhabditis* no es el único género de nematodos Rhabditidos encontrados junto con *Azteca* en plantas de *Cecropia*.
- Son necesarios más estudios para esclarecer el tipo de relación que existe entre *Azteca* y los nematodos.
- Los cuerpos de Müller son comidos al menos por las reinas de *Azteca*.

REFERENCIAS

- Ahmad, I., A.A. Asghar & M.M. Mahamood. 2007. Nematodes of the order Rhabditida from India. Description of *Sclerorhabditistridentatus* gen. n., sp. n. (Nematoda: Rhabditidae). *Nematology* 9: 43–47.
- Alvarez-Buylla, E.R. & M. Martinez-Ramos. 1992. Demography and allometry of *Cecropiaobtusifolia*, a neotropical pioneer tree - An evaluation of the climax-pioneer paradigm for tropical rain forests. *Journal of Ecology* 80: 275–290.
- Ayala, A.F., J.A.K.W. Wetterer, J.T. Longino & D.L. Hartl. 1996. Molecular phylogeny of *Azteca*Ants (Hymenoptera: Formicidae) and the colonization of *Cecropia* trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 423–428.
- Bailey, I.W. 1922. Notes on Neotropical Ant-Plants. I. *Cecropiaangulata*, sp. nov. *Botanical Gazette* 74: 369–391.
- Berg, C.C., P.F. Rosselli & D.W. Davidson. 2005. *Cecropia*. *Flora Neotropica* 2 94: 1–230.
- Blatrix, R., S. Bouamer, S. Morand & M. Selosse. 2009. Ant-plant mutualisms should be viewed as symbiotic communities. *Plant Signaling & Behavior* 4: 554–556.
- Brown, F.D., I. D'Anna & R.J. Sommer. 2011. Host-finding behaviour in the nematode *Pristionchus pacificus*. *Proceedings of the Royal Society B* 278: 3260–3269.
- Burger, W. 1977. *Flora Costaricensis*, Family #52, Moraceae. *Fieldiana, Bot.* 40: 94-215.
- Carroll, C.R. 1991. *Azteca*, p. 703-705. In D.H. Janzen (ed.). *Historia Natural de Costa Rica*. Editorial UCR. San José, Costa Rica.
- Choe, J.C. & D.L. Perlman. 1997. Social conflict and cooperation among founding queens in ants (Hymenoptera: Formicidae), p. 392–406. In J.C. Choe & C. J. (eds.). *The Evolution of Social Behavior in Insects and Arachnids*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Cuezzo, F. 2003. Subfamilia Dolichoderinae, p.291-297. In F. Fernández (ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Instituto de investigación de recursos biológicos. Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia.
- Davidson, D.W. & F.L. B. 1991. Symbiosis of ants with *Cecropia* as a function of light regime, p. 289 – 309. In R.C. Huxley & F.C. Cutler (eds.). *Ant - Plant Interactions*. Oxford University Press, New York.
- Davidson, D. W. 1997. The role of resource imbalance in the evolutionary ecology of tropical arboreal ants. *Biol. J. Linn. Soc.* 61:153-181.

- De Maeseneer, J. & J. D'Herde. 1963. Méthodes utilisées pour l'étude des anguillules libres du sol. *Rev. Agr. Brussels*. 16: 441-447.
- Delabie, J.H.C., M. Ospina & G. Zabala. 2003. Relaciones entre hormigas y plantas: una introducción, p.167-180. *In* F. Fernández (Ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Instituto de investigación de recursos biológicos. Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia.
- Della-Lucia, T.M.C. 2003. Hormigas de importancia económica en la región Neotropical, p.337-349. *In* F. Fernández (Ed.). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Instituto de investigación de recursos biológicos. Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia.
- Downhower, J.F. 1975. The distribution of ants on *Cecropia* leaves. *Biotropica* 7: 59–62.
- Durango, V., L.M. Negrete, B.J. Colorado & P.L. Castro. 2010. Remediación de suelos contaminados con mercurio utilizando guarumo (*Cecropiapeltata*). *Ingeniería y Desarrollo* 27: 113–129.
- Edwards, D.P., M. Hassall, W.J. Sutherland & D.W. Yu. 2006. Assembling a mutualism: ant symbionts locate their host plants by detecting volatile chemicals. *Insect Soc.* 53: 172–176.
- Esquivel, A. 2003. Nematode fauna of Costa Rican protected areas. *Nematropica* 33: 131–145.
- Esquivel, A., J. Abolafia, P. Hanson & A. Pinto. 2012. A new species of nematode, *Sclerorhabditisneotropicalis* sp.n. (Rhabditida), associated with *Azteca* ants in *Cecropiaobtusifolia*. *Nematropica* 42: 163–169.
- Fáveri, S.B. & H.L. Vasconcelos. 2004. The *Azteca-Cecropia* association: are ants always necessary for their host plants? *Biotropica* 36: 641–646.
- Folgarait, P.J. & D.W. Davidson. 1995. Myrmecophytic *Cecropia*: antiherbivore defenses under different nutrient treatments. *Oecologia* 104: 189–206.
- Folgarait, P.J., H.L. Johnson & D.W. Davidson. 1994. Responses of *Cecropia* to experimental removal of Mullerian bodies. *Functional Ecology* 8: 22–28.
- Frederickson, M.E. 2005. Ant species confer different partner benefits on two neotropical myrmecophytes. *Oecologia* 143: 387–395.
- Hanson, P. & J.T. Longino. 2006. Hormigas (Formicidae), p. 644–694. *In* P. Hanson & I.D. Gauld (eds.). *Hymenoptera de La Región Neotropical*. The American Entomological Institute vol. 77, Gainesville, Florida, EEUU.

- Janzen, D.H. 1966. Coevolution of mutualism between ants and *Acacias* in Central America. *Evolution* 20: 249–275.
- Janzen, D.H. 1969. Allelopathy by myrmecophytes: The ant *Azteca* as an allelopathic agent of *Cecropia*. *Ecology* 50: 147–153.
- Janzen, D.H. 1973. Dissolution of mutualism between *Cecropia* and its *Azteca* ants. *Biotropica* 5: 15–28.
- Judd, W. S., R. W. Sanders, & M. J. Donoghue. 1994. Angiosperm family pairs: preliminary phylogenetic analyses. *Harvard Bot.* 5:1-51.
- Kappelle, M. 2008. Diccionario de la biodiversidad. Editorial InBio, Heredia - Costa Rica.
- Krishnan, A., S. Muralidharan, L. Sharma & R.M. Borges. 2010. A hitchhiker's guide to a crowded syconium: how do fig nematodes find the right ride? *Functional Ecology* 24: 741–749.
- Lobova, T.A., S.A. Mori, F. Blanchard, H. Peckham & P. Charles-dominique. 2003. *Cecropia* as a food resource for bats in French Guiana and the significance of fruit structure in seed dispersal and longevity. *American Journal of Botany* 90: 388–403.
- Longino, J.T. 1989a. Taxonomy of the *Cecropia*-inhabiting ants in the *Aztecaalfari* species group (Hymenoptera Formicidae) Evidence for two broadly sympatric species. *Contributions in Science*. 412: 1–16.
- Longino, J.T. 1989b. Geographic variation and community structure in an ant-plant mutualism: *Azteca* and *Cecropia* in Costa Rica. *Biotropica* 21: 126–132.
- Longino, J.T. 1991a. *Azteca* ants in *Cecropia* trees: taxonomy, colony structure, and behaviour, p. 271–288. In C.R. Huxley & D.F. Cutler (eds.). *Ant - Plant Interactions*. Oxford University Press, Oxford.
- Longino, J.T. 1991b. Taxonomy of the *Cecropia*-inhabiting *Azteca* ants. *Journal of Natural History* 25: 1571–1602.
- Longino, J.T. 1996. Taxonomic characterization of some live-stem inhabiting *Azteca* (Hymenoptera:Formicidae) in Costa Rica, with special reference to ants of *Cordia* (Boraginaceae) and *Triplaris* (Polygonaceae). *Journal of Hymenoptera Reserch* 5: 131–156.
- Longino, J.T. 2006. A taxonomic review of the genus *Myrmelachista* (Hymenoptera: Formicidae) in Costa Rica. *Zootaxa* 1141: 1–54.
- Longino, J.T. 2007a. A taxonomic review of the genus *Azteca* (Hymenoptera: Formicidae) in Costa Rica and a global revision of the aurita group. *Zootaxa* 1491: 1–63.

- Longino, J.T. & R.K. Colwell. 1997. Biodiversity assessment using structured inventory: capturing the ant fauna of a tropical rain forest. *Ecological Applications* 7: 1263–1277.
- Molina, J.P.A. 2003. Supervivencia y parasitismo de nematodos entomopatógenos para el control de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) en frutos de café. *Bol. San. Veg. Plagas* 29: 523–533.
- Naoki, K. & E. Toapanta. 2001. Mullerian body feeding by Andean birds: new mutualistic relationship or evolutionary time lag? *Biotropica* 33: 204–207.
- Rickson, F.R. 1976a. Anatomical development of the leaf trichilium and Mullerian bodies of *Cecropiapeltata* L. *American Journal of Botany* 63: 1266–1271.
- Rickson, F.R. 1976b. Ultrastructural differentiation of the Mullerian body glycogen plastid of *Cecropiapeltata* L. *American Journal of Botany* 63: 1272–1279.
- Rickson, F.R. 1977. Progressive loss of ant-related traits of *Cecropiapeltata* on selected Caribbean islands. *American Journal of Botany* 64: 585–592.
- Ruppert, E.E. & R.D. Barnes. 1996. *Zoología de los invertebrados*. McGraw-Hill Interamericana, Mexico.
- Sagers, C.L., S.M. Ginger & R.D. Evans. 2000. Carbon and nitrogen isotopes trace nutrient exchange in an ant-plant mutualism. *Oecologia* 123: 582–586.
- Schupp, E.W. 1986. *Azteca* protection of *Cecropia*: ant occupation benefits juvenile trees. *Oecologia* 70: 379–385.
- Seinhorst, J. W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4: 67–69.
- Trimble, S.T. & C.L. Sagers. 2004. Differential host use in two highly specialized ant-plant associations: evidence from stable isotopes. *Oecologia* 138: 74–82.
- Valverde, J.P. & P. Hanson. 2011. Parenchyma: a neglected plant tissue in the *Cecropia*/ant mutualism. *Symbiosis* 55: 47–51.
- Weng, J., K. Nishida, P. Hanson & L. LaPierre. 2007. Biology of *Lissoderes* Champion (Coleoptera, Curculionidae) in *Cecropia* saplings inhabited by *Azteca* ants. *Journal of Natural History* 41: 1679–1695.

REFERENCIAS DE INTERNET

- Inbio 2005. Especies de Costa Rica de *Ganoderma australe*. Inbio (consultado: 1 enero 2013, <http://multimedia.inbio.ac.cr/m3sINBio/getImage?size=big&id=34962>).
- Longino, J.T. 2005. The *Cecropia-Azteca* association in Costa Rica. The Evergreen State College, Olympia (Consultado: 19 marzo 2011, <http://academic.evergreen.edu/projects/ants/ANTPLANTS/CECROPIA/Cecropia.html>).
- Longino, J.T. 2007b. *Aztecaxanthochroa* (Roger 1863). The Evergreen State College, Olympia, USA (Consultado: 19 marzo 2011, <http://academic.evergreen.edu/projects/ants/GENERA/AZTECA/SPECIES/CONSTRUCTOR/constructor.html>).
- Longino, J.T. 2007c. *Aztecabeltii* Emery 1893. The Evergreen State College, Olympia, USA (Consultado: 19 marzo 2011, <http://academic.evergreen.edu/projects/ants/GENERA/AZTECA/SPECIES/BELTII/beltii.html>).

ANEXOS I. Clave para obreras y reinas de las especies de *Azteca* de Costa Rica que normalmente habitan *Cecropia* (Cecropiaceae)

Identificación de muestras: La clave para la identificación es una adaptación traducida a partir de las presentadas por Longino (1991a, 1991b, 2007a) y una traducción de Paul Hanson, para ser utilizada en las especies de *Azteca* habitantes obligatorias de *Cecropia* en Costa Rica. La identificación de las obreras en las colonias de *Azteca* es difícil por la variación en los tamaños y colores que ocurre con la maduración de la colonia, así como por la condición polimórfica de la especie. La clave presentada al igual que en las claves de Longino, se recomienda aplicarla en las obreras más grandes de colonias maduras y solo en casos en los que no es posible la identificación a partir de hormigas reinas.

Clave para obreras

- 1a. Sin setas erectas en la superficie externa de la tibia trasera, fórmula palpos 5,3..... 2
- 1b. Con setas (5 o más; difíciles de ver en *A. coeruleipennis*) erectas en la superficie externa de la tibia trasera, fórmula de palpos 5,3 o 6,4..... 3

- 2a. Relativamente pocas setas paradas al dorso del mesosoma (se ve “limpio”) y éstas son de longitud uniforme; color variable entre colonias..... *alfari*
- 2b. Con varias setas paradas al dorso del mesosoma y éstas son de longitud irregular; normalmente de colores amarillo..... *ovaticeps*

3a. Amarillo; superficie dorsal del propodeo plano, la parte posterior del mesonoto abruptamente inclinada hacia arriba; levemente polimórfica, encontrada en el Pacífico seco; formula palpos 5,3.....*coeruleipennis*

3b. Color variable; superficie dorsal del propodeo y mesonoto formando dos convexidades; formula de palpos 5,3 o 6,4 4

4a. Peciolo en perfil con el lóbulo dorsal más grande (en distancia perpendicular) que el lóbulo ventral; cara de color moteado (pardo claro y anaranjado); en colonias maduras la obreras salen por fisuras en el tronco principal a 2-3 m sobre el nivel del suelo..... *xanthochroa*

4b. Peciolo en perfil con el lóbulo dorsal más pequeña (en distancia perpendicular) que el lóbulo ventral; color de cara uniformemente pardo; fisuras en el tronco principal altas, a la altura de las primeras ramas y su respuesta a disturbios es masiva y rápida, cubriendo rápidamente el tronco *constructor*

Clave para reinas

1a. Sin setas erectas en la superficie externa de la tibia trasera..... 2

1b. Con setas erectas en la superficie externa de la tibia trasera..... 4

2a. Color naranja; cabeza sub-rectangular, formula palpos 5,3..... *xanthochroa*

2b. Color negro.....3

3a. Cabeza sub-rectangular, formula palpos 6,4..... *coeruleipennis*

3b. Cabeza con los lados redondeados; dorso del mesosoma con superficie cubierta de setas; formula palpos 5,3 *constructor*

4a. Cuarto terguito abdominal con menos de 6 setas erectas, color usualmente negro, poco agresiva, lo que se ve reflejado en las plantas habitadas por ellas..... *alfari*

4b. Cuarto terguito abdominal con más de 10 setas erectas, color desde negro hasta café, poco agresiva, lo que se ve reflejado en las plantas habitadas por ellas..... *ovaticeps*

ANEXOS II. Glosario

Cartón: fibras vegetales que las hormigas mastican y las cementan. Varía de forma tamaño y color según la especie. En *Azteca* es utilizado para crear estructuras en el interior de las plantas de *Cecropia* (Hanson & Longino 2006).

Cuerpos de Müller: sustancia segregada por el triquilio de *Cecropia*, de forma alargada y color blanco, formado principalmente por glucógeno (Rickson 1976b) y que se cree sirven de alimento a las hormigas *Azteca* que habitan la planta.

Cuerpos perlados: sustancia segregada por tricomas en el envés de las hojas de *Cecropia* y otras plantas. Contienen lípidos y pocos plastidios de glucógeno (Rickson 1976b) y que se cree sirven de alimento a las hormigas *Azteca* que habitan la planta.

Entrenudo virgen: Entrenudo de *Cecropia* en el cual no han ingresado hormigas del género *Azteca*. Se caracteriza por tener el prostoma así como los nudos intactos.

Espiráculos: pequeñas aberturas exteriores de las tráqueas del sistema respiratorio de insectos.

Fundación claustral: Forma en que las reinas del género *Azteca* fundan sus nidos, en plantas del género *Cecropia*, encerradas dentro de un entrenudo, prácticamente sin tener contacto con exterior hasta el nacimiento de la primera generación de obreras, viviendo de sus reservas de energía corporal para sobrevivir durante este periodo.

Huevos tróficos: huevos no reproductivos. Producidos por la reinas o las obreras. Utilizados como alimento.

Meconio: Son las primeras heces secretadas tras el nacimiento. En el caso de las hormigas tras la salida de la etapa de pupa.

Mirmecófitas: plantas habitadas regularmente por ciertas especies de hormigas. Muchas presentan estructuras especializadas (domacios) para albergar hormigas y algunas para alimentar hormigas (cuerpos alimenticios) (Hanson & Longino 2006).

Monoginia: condición en la que en una colonia de hormigas los huevos los pone una sola reina (Hanson & Longino 2006).

Nido: estructura(s) física que una colonia de hormigas utiliza(n) como albergue (Hanson & Longino 2006). Una sola colonia puede poseer uno o varios (polidomo).

Parénquima: Célula o tejido de una planta que puede fabricar o almacenar nutrientes (Kappelle 2008). En el caso de la presente investigación en *Cecropia*, se refiere a la capa de materia blanca que se encuentra sobre la superficie del interior de los entrenudos.

Pila de parenquima: Sitio en un nido de *Azteca* en que se encuentra una pila de materia vegetal en trozos pequeños, que en el caso muchas colonias contiene gran cantidad de nematodos. Su color y textura suelen estar asociados a la presencia de los nematodos. Siendo de blanco y formado por trozos como granos relativamente grandes cuando no posee nematodos, hasta café oscuro con textura como pasta muy fina cuando posee gran cantidad de nematodos.

Polidoma: colonia de hormigas que se encuentra distribuida en más de un nido (Hanson & Longino 2006).

Prostoma: depresión en cada uno de los entrenudos de *Cecropia*, donde la pared del tallo de la planta es delgado (Bailey 1922). Es por este punto, que las reinas ingresan en las plantas (Bailey 1922, Longino 2005, 2007a, Hanson & Longino 2006, Weng *et al.* 2007).

Tergitos: placas transversales que cubren el dorso del metasoma.

Triquilio: (sin. trichillium, pl. trichilia) zona triangular en la base de cada peciolo, densamente cubierta de tricomas, en que se forman los cuerpos de Müller. Única del género *Cecropia* (Bailey 1922).

Vuelo nupcial: salida de las reinas nuevas (vírgenes) aladas del nido madre, para aparearse y fundar nuevas colonias.