



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Estudios ecológicos y genéticos de la hormiga invasora *Nylanderia fulva*
en el límite sur de su distribución natural**

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

María Belén Fernández

Director de tesis: Luis A. Calcaterra

Consejero de estudios: Javier López de Casenave

Lugar de trabajo: Fundación para el estudio de especies invasivas (FuEDEI), Bolívar 1559,
B1686EFA, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, 2023

Agradecimientos

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la Universidad de Buenos Aires, en donde realicé mis estudios de grado y posgrado, y en donde ahora presento mi trabajo de tesis de doctorado. También por otorgarme una beca de estudios de posgrado, mediante la cual pude viajar a Alemania a estudiar y vivir una experiencia inigualable. A todos los que trabajan en ella y en especial a Graciela de la secretaría del EGE, por su dedicación.

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme una beca gracias a la cual pude realizar el doctorado, y por diversos subsidios a mi grupo que permitieron llevar a cabo mi trabajo de tesis.

Las diversas instituciones (y a las personas que trabajan en ellas) que participaron y/o otorgaron permisos de trabajo para que pueda realizar los estudios de esta tesis: Parques Nacionales, Reserva Ecológica Costanera Sur, Jardín Botánico Carlos Thays, Provincia de Misiones, Reserva Natural Paititi. Al Museo Argentino de Ciencias Naturales, especialmente a Fabian Tricarico y a Joana Rodriguez. Al Museo de Ciencias Naturales de Berlín, especialmente a Lukas Kirschey.

Fabrizio Baccaro y Fernando Fernández, que me enviaron hormigas en préstamo desde lejos para realizar parte de esta tesis, y Jason Williams por enviarme secuencias de ADN, fueron invaluable aportes.

A los investigadores que intervinieron en algún momento en el transcurso de mi tesis, aportando sus conocimientos, consejos y sugerencias. Al director, Luis Calcaterra, quien me recibió cálidamente en su grupo, me acompañó en todo el proceso, siempre dispuesto al diálogo, y de quien aprendí muchas cosas, y a Viviana Confalonieri, Christoph Bleidorn, Marcela Rodriguez y Franco Simonetti.

A los compañeros de la Fundación para el Estudio de Especies Invasivas (FuEDEI). Un agradecimiento especial para Andrés, quien me enseñó y guió en muchas ocasiones, compartiendo sus conocimientos y su amistad. A Ana, Belén, Mariel, Nadia y Tomás, por su amistad y por acompañarme siempre.

A mis amigos y familia.

Resumen

Estudios ecológicos y genéticos de la hormiga invasora *Nylanderia fulva* en el límite sur de su distribución natural

La hormiga sudamericana *Nylanderia fulva* ha invadido recientemente varios países de América, causando problemas ecológicos y económicos. Los principales frentes de invasión se encuentran actualmente en Colombia y EEUU. Se desconocen los límites precisos de su distribución natural, al igual que para muchas especies de *Nylanderia* de la región, pero se estima que abarca desde el norte de Brasil hasta Argentina. El estudio que se lleva a cabo en *N. fulva*, poco conocida en su rango nativo, permitirá detallar su distribución nativa, estimar las poblaciones que dieron origen a las introducciones y reconocer sus enemigos naturales. Además, se aporta información relevante para la delimitación de especies, en el contexto de la revisión taxonómica mundial del género *Nylanderia*, aún pendiente para las especies de Sudamérica. Recolectamos muestras de más de 200 nidos de *Nylanderia* spp. y de fóridos parasitoides en Argentina y países limítrofes. La especie más colectada fue *N. fulva*, ampliamente distribuida en el noreste de Argentina, además de cinco colonias del complejo *N. guatemalensis/N. steinheili*, consideradas exóticas, y 15 de *N. silvestrii*. Se realizó un análisis filogenético utilizando el gen mitocondrial COI y nuclear *wingless*, incluyendo secuencias de *N. fulva* de poblaciones introducidas y otras especies de *Nylanderia* de Sudamérica. Encontramos que las poblaciones de *N. fulva* corresponden a un posible complejo de especies con tres clados. La estructuración genética de las poblaciones nativas de *N. fulva*, observada en marcadores microsatélites y el gen COI fue elevada. En una red de haplotipos mitocondriales, mostramos que las poblaciones de EEUU podrían proceder de la región de la cuenca del Río de La Plata. Para la delimitación de especies de *Nylanderia* se aplicaron tres algoritmos de delimitación molecular. Como resultado, las secuencias de ADN proporcionaron una mayor diferenciación (6-13 posibles especies) que la observada en la morfología de las obreras (1 especie), como lo observado en otras especies del género. Se estudió la posible influencia de un parasitoide (*Pseudacteon convexicauda*) y un endosimbionte (*Wolbachia*) sobre la historia evolutiva y coevolución con *N. fulva* mediante una comparación filogenética utilizando un sistema multi-locus de ADN para *Wolbachia* y los genes COI y *wingless* para los fóridos. Se hallaron genotipos de *Wolbachia* compartidos entre los diferentes clados que conforman *N. fulva*, descartando una especiación reciente mediada por esta bacteria. Encontramos algunas incongruencias entre los clados observados en los fóridos y los observados en su hospedador. La historia evolutiva de *N. fulva* fue estimada en su rango nativo, estimándose un centro de origen en la provincia de Misiones, Argentina, y un segundo centro de dispersión en Córdoba, con un posterior contacto secundario. En conjunto, los resultados indican que *N. fulva* podría estar atravesando un proceso de especiación.

Palabras clave: *Nylanderia* - hormigas – filogenia – enemigos naturales – *Wolbachia* – fóridos – distribución – poblaciones

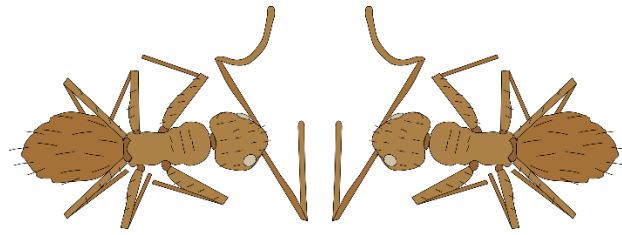
Abstract

Ecological and genetic studies of the invasive ant *Nylanderia fulva* in the southern limit of its natural distribution

Nylanderia fulva is an ant species that has recently invaded in several countries in America, causing ecological and economic damages. The most relevant invasion fronts are in Colombia and the US. *Nylanderia fulva* estimated native distribution goes from northern Brazil to Argentina, but its exact limits are currently unknown, as well as for many other *Nylanderia* species in this region. Studying *N. fulva* in its native range will allow us to inform on its exact distribution limits, estimate the putative origin populations of the introductions and recognize natural enemies. In the context of a worldwide taxonomic revision of *Nylanderia*, pending for South American species, a species delimitation of *Nylanderia* was also estimated. In this thesis, we collected more than 200 *Nylanderia* spp. nests and 20 samples of phorid flies (natural enemies), in Argentina and neighboring countries. The most collected species in the region was *N. fulva*, which was widely distributed in center to northern Argentina. We also found colonies of the exotic species complex *N. guatemalensis*/*N. steinheili* and *N. silvestrii*. A phylogeny of *N. fulva* was estimated using mitochondrial (COI) and nuclear (*wingless*) genes, including repository sequences from invasive populations in the US and South American *Nylanderia*. This revealed that populations within *N. fulva* could comprise a species complex of three clades. In a haplotype network it was estimated that populations in the US have a possible origin in the Rio de la Plata river basin region. The molecular species delimitation analyses resulted in 6-13 potential species within *N. fulva*, much more differentiation than that observed with morphology of workers (only one morph). Two organisms (*Wolbachia* and parasitoid phorids - *Pseudacteon convexicuada*-) that could have influenced the evolutionary history and speciation in *N. fulva* were studied by comparing their phylogenies. *Wolbachia* variants were characterized using a multi-locus system and phorids with two gene fragments (COI and *wingless*). We found identical *Wolbachia* genotypes infecting different clades of *N. fulva*, which led us to discard the possibility of a speciation process mediated by these bacteria. There was also no conclusive evidence towards a strict correlation between phorids and *N. fulva*. We estimated the origin of the species in Misiones, Argentina, another more recent node of diversification in Córdoba, and posterior secondary contact between them. Altogether, our results suggest that this species could be going through a speciation process.

Keywords: *Nylanderia* - ants – phylogeny – natural enemies – *Wolbachia* – phorids – distribution - populations

Introducción general



Sobre las especies invasoras

Las especies invasoras son aquellas que traspasan las barreras de sus ambientes naturales, logrando colonizar nuevos territorios, ya sea por sí mismas o, más frecuentemente, mediante la acción del humano; aquellas que además llegan a ocupar territorios fuera de su ámbito natural o conocido, se consideran exóticas (especies exóticas invasoras, EEI). Las consecuencias de las invasiones biológicas son muchas, en particular, los costos económicos asociados a las invasiones de hormigas se han estimado en 119 millones de dólares anuales (Angulo et al., 2022). En los casos con mayor impacto de estas especies, se recurre a diversos mecanismos de control con la intención de disminuir su densidad poblacional.

Las EEI son comúnmente especies vagabundas, es decir, son transferidas entre áreas, o es favorecida la expansión de su distribución, a través de actividades relacionadas al comercio, debido a su estrecha asociación con el hombre (Fontenla & Matienzo, 2011). Muchas especies de hormigas son invasivas y vagabundas, dentro de ellas, algunas son consideradas como las peores por su impacto económico a nivel mundial, y son nativas de Sudamérica: *Linepithema humile*, *Solenopsis invicta* y *Wasmannia auropunctata* (Angulo et al., 2022). Se ha establecido una lista de características que comparten las hormigas vagabundas-invasoras (Flucher et al., 2021; Fontenla & Matienzo, 2011):

- prosperan en ambientes antropizados, tales como agroecosistemas y ambientes urbanos;
- son especies poliginicas, es decir, los nidos están formados por más de una reina activa;
- son unicoloniales o supercoloniales: las obreras de diferentes nidos no presentan agresividad entre sí;
- suelen reproducirse por fisión, es decir que no hay vuelos nupciales (las hembras son fecundadas dentro de los nidos);
- son especies omnívoras y atienden hemípteros;
- despliegan agresividad interespecífica marcada; y

- la mayoría tienen un hábito de nidificación oportunista, con nidos tanto transitorios como permanentes.

Las hormigas invasoras, al acceder a un nuevo ecosistema, pueden intervenir en el funcionamiento de alguna de sus funciones al interactuar con la comunidad local de hormigas. Los efectos negativos que las hormigas invasoras suelen causar en los territorios donde han invadido, son, por ejemplo, el desplazamiento de las especies de hormigas nativas y reducción de su diversidad y la de otros artrópodos (Holway et al., 2002). A su vez, causan otros efectos relacionados con la actividad humana como la pérdida o daño de cultivos debido a la asociación de las hormigas con ciertos hemípteros, o daño estructural en urbanizaciones (McDonald, 2012). Estos efectos suelen exacerbarse debido a la capacidad de esas especies de formar poblaciones muy numerosas en los territorios que han invadido, y a la ventaja competitiva que presentan respecto de las otras especies de hormigas locales (Sakai et al., 2001). Es más, se ha observado el desplazamiento de una especie altamente invasiva luego de la llegada de otra, también invasiva, que la supera competitivamente (LeBrun et al., 2013). Se ha indicado que además de los daños económicos que las hormigas invasoras pueden generar para la actividad humana, también podrían constituir una amenaza sanitaria. Estudios recientes detectan la presencia de hormigas (entre las cuales se encuentra *Nylanderia fulva*) en ambientes hospitalarios y que éstas pueden tener en su cutícula bacterias perjudiciales para las personas tales como *Escherichia coli* o *Staphylococcus* sp., entre otras, siendo potenciales transmisoras de enfermedades (Josens et al., 2017a; Lutinski et al., 2015; Pesquero et al., 2008).

Sin embargo, gran parte del conocimiento actual sobre las causas y consecuencias de la introducción de hormigas invasoras se basa en un reducido grupo de especies (*Solenopsis invicta* y *Linepithema humile*), que han sido el foco de atención y hasta el año 2007 encabezaron el 75% de las investigaciones sobre insectos invasores (Baty et al., 2020; Lach et al., 2009). Más recientemente han cobrado interés otras importantes hormigas invasoras como *Anoplolepis gracilipes*, *Pheidole cephalothorax*, *Wasmannia auropunctata* y *N. fulva* (Angulo et al., 2022). La especie *W. auropunctata* presenta un caso de comparación interesante sobre las causas y consecuencias de las invasiones de hormigas nativas de Sudamérica. Esta especie, simpátrica a *N. fulva*, ha sobrepasado los límites de su distribución natural por acción del ser humano, y hasta ha logrado establecerse en el continente Europeo (Chifflet et al., 2016).

Desde la biología de las poblaciones se pueden responder una serie de preguntas de utilidad para entender los primeros estadios de una invasión biológica (Sakai et al., 2001): ¿hay diferencias

genéticas entre poblaciones invasivas y no-invasivas de la especie? ¿cómo difieren la diversidad genética y la biología de la especie invasora entre el área nativa e introducida? ¿existe alguna interacción con vectores que afecte la probabilidad de invasión? El sinergismo que surge de combinar las perspectivas ecológica, genética y evolutiva de las especies invasoras es esencial para desarrollar soluciones prácticas a las pérdidas económicas y ecológicas que resultan como consecuencia de esas invasiones (Sakai et al., 2001). Para establecer una estrategia de prevención y/o control efectiva, entonces, es fundamental conocer la ecología y patrones evolutivos de las EEI con especial énfasis en su rango nativo (Garnas et al., 2016). El control de una EEI consiste en utilizar alguna práctica que ulteriormente genere una disminución de las poblaciones de esa especie en el área invadida, a diferencia de la erradicación, objetivo que en la práctica es casi inalcanzable, sobre todo en especies de insectos que ya se han establecido con éxito en los nuevos territorios. Entre los métodos utilizados para reducir las poblaciones de EEI, se encuentran el control químico y el biológico, entre otros. El primero se relaciona con la utilización de sustancias que sean tóxicas para el organismo a controlar, mientras que el segundo se basa en la liberación de enemigos naturales de la EEI (Van Driesche & Bellows, 1996). Ambos se enriquecen de estudios minuciosos de la biología de la EEI, en particular el control biológico requiere de un estudio exhaustivo en el rango nativo de la especie plaga.

La hormiga invasora *Nylanderia fulva*

Nylanderia fulva, también conocida como “Raspberry crazy ant” o “tawny crazy ant”, fue registrada en los EE.UU. como invasora por primera vez cerca de Houston, Texas, en el año 2002 por Tom Raspberry, un controlador de plagas de quien esta hormiga heredó su nombre coloquial (ISAC, 2016). En ese entonces, esta especie pertenecía al género *Paratrechina*, y varias publicaciones relacionadas a esta invasora en los sucesivos años la identificaron bajo diferentes nomencladores: *Paratrechina* sp. nr. *pubens*, *Paratrechina fulva*, Raspberry crazy ant, tawny crazy ant, hormiga loca (Gotzek et al., 2012; MacGown & Layton, 2010; Zenner-Polania, 1990). La preocupación por la imposibilidad de diferenciarla de la hormiga supuestamente inocua y simpátrica en ese país, *N. pubens*, despertó el interés por esta hormiga y los subsiguientes estudios genéticos como los de LaPolla y Gotzek (y cols., 2010, 2012).

Esta especie fue introducida intencionalmente en Colombia en los años '70 para el control de serpientes y hormigas arrieras debido a su marcada agresividad (Zenner-Polania, 1990). Se menciona que la primera población introducida provino de Manaos, Brasil, aunque hubieron al

menos dos introducciones más en el país, con los primeros registros de gran crecimiento poblacional (invasión) registrados solamente cinco años luego de la primera introducción, y en cuatro estados (Boyacá, Meta, Bolívar y Antioquía). Esta introducción no solo no tuvo el resultado esperado en cuanto al control, sino que ocasionó grandes pérdidas tanto económicas como para la diversidad local. Una de las consecuencias más relevantes de la introducción de *N. fulva* fue su invasión en el área de amortiguación de un área designada para la conservación de aves nativas en el Valle del Cauca, donde desplazó a hormigas nativas y se observaron ataques hacia especies amenazadas (Aldana et al., 1995). Por otro lado, se ha considerado a esta especie como una plaga agrícola, debido a su interacción con insectos fitófagos en cultivos (Sharma et al., 2013). Estos insectos afectan el desarrollo de las plantas y pueden ser vectores de enfermedades para las mismas (Della Lucia, 2003). Por su lado, las hormigas aprovechan las sustancias azucaradas que producen estos insectos y los protegen e incluso transportan entre plantas, favoreciendo el aumento de sus poblaciones (Hernández et al., 2002). Se detectaron más de 30 especies de homópteros que atacan cultivos comerciales tales como cítricos, palta, banana y caña de azúcar, asociados a *N. fulva* (Arcila & Quintero, 2005). Si bien se ha observado que las colonias de *N. fulva* sufren una declinación lenta y han desaparecido de algunos sitios invadidos luego de 10 años, en regiones cultivadas, como la región panelera de la Hoya del río Suárez, la especie ha mantenido poblaciones estables por al menos 16 años (Arcila & Quintero, 2005). Las pérdidas económicas relacionadas al cultivo de caña de azúcar generadas por *N. fulva* se han estimado en 4000 millones de pesos colombianos (Nieves-González, 1999).

En los EEUU, en cambio, se cree que la introducción de *N. fulva* habría sido involuntaria a través de alguno de los principales puertos del sur de ese país. El primer registro de estas hormigas fue en el año 1938, en Texas, dato obtenido de ejemplares depositados en una colección entomológica (Trager, 1984), no habiendo más indicios de su presencia hasta el año 2002 cuando se empezaron a registrar grandes poblaciones de estas hormigas. También hubo detecciones tempranas en Florida, bajo el nombre *Paratrechina sp. near pubens*, aunque debido a la confusión con la especie cercana *N. pubens*, no se logró identificar claramente a esas poblaciones hasta un trabajo más reciente que incorporó técnicas moleculares y caracteres morfológicos de los sexados para separar estas dos especies (Gotzek et al., 2012). Luego de diez años de haber registrado la invasión en ese país, se determinó que las poblaciones de Florida y de Texas correspondían a una misma especie (Zhao et al., 2012). En 2015 fue detectada por primera vez en el Puerto de Savannah, Georgia, el registro más al norte registrado hasta el momento en todo el territorio invadido.

Otras regiones donde se ha detectado la presencia de *N. fulva*, o más aún su marcado crecimiento poblacional, se suman en los últimos años y han contribuido a generar un gran interés por el estudio de esta especie; algunos ejemplos son Costa Rica, Cuba, Ecuador, México. En Cuba, se ha identificado como especie exótica y se han registrado daños por estas hormigas en animales domésticos y silvestres desde al menos los años '90 (Fontenla & Matienzo, 2011). En Ecuador continental, en 2018 se registró por primera vez a *N. fulva* como invasora (aunque la subespecie *N. fulva nesiotis* ha sido descrita con localidad tipo en las Islas Galápagos) y su asociación con áfidos de la caña de azúcar (Pazmiño-Palomino et al., 2020). Asimismo, se ha expresado la gran preocupación por el reciente crecimiento poblacional de *N. fulva* en Costa Rica y la posibilidad de utilizar el control biológico para reducir sus poblaciones (Humberto Espinoza Fonseca, com. pers.). Se ha observado también un reciente incremento en su presencia y abundancia en su tierra nativa, en ciudades del centro-este de Argentina, donde invade casas, edificios y hospitales (Josens et al., 2014) y en hospitales en Brasil, donde podría presentar una amenaza sanitaria por su potencial de transportar patógenos (Lutinski et al., 2015). En el año 2016, se la encontró en un aeropuerto en la ciudad de Arica, Chile (Patrich Cerpa, com. pers.).

Retos de la sistemática de *Nylanderia* spp. en Sudamérica

La similitud entre especies cercanas de *Nylanderia*, e incluso, entre caracteres presentes en diferentes géneros dentro del grupo genérico *Prenolepis*, como el mesosoma elongado en *Euprenolepis*, *Paratrechina*, *Zatania* y *Nylanderia*, presenta dificultad para discernir entre especies de este grupo (Lapolla et al., 2010a). LaPolla y colaboradores detectaron que el mandalus de la mandíbula es el carácter que diferencia a las obreras de *Pseudolaisus* y *Euprenolepis*, pero esto fue posible luego de haber detectado en primer lugar que estos dos géneros son entidades biológicas diferentes a partir de una filogenia molecular (LaPolla, 2009). Un caso similar ocurrió en la separación de las especies *N. fulva* y *N. pubens* por Gotzek y cols. (2012), quienes a partir de una filogenia molecular y la morfología de la genitalia externa de los machos lograron encontrar caracteres que permiten diferenciar a esas especies; previo a ese trabajo, y aún luego del análisis morfológico que realizaron los autores, no se detectaron diferencias morfológicas significativas entre las obreras de *N. fulva* y *N. pubens*. Por ello, se considera que es posible que otros linajes permanezcan aún sin descubrir dentro de este grupo de géneros, si solamente se basa su identificación en caracteres de la casta obrera (Kallal & Lapolla, 2012). En un reciente estudio en donde se analizaron *loci* UCE (ultra-conserved elements, elementos ultra-conservados del genoma)

en especies de *Nylanderia* de las islas del Caribe y algunas localidades de Sudamérica, en el cual se incorporó además el análisis de algunos caracteres morfológicos, se sumó evidencia que indica que *N. fulva* (así como *N. bourbonica* y *N. guatemalensis*) forman parte de complejos de especies; por ejemplo, el complejo *N. fulva/N. pubens* podría incluir al menos unas dos especies más, aún indeterminadas, en la Guyana Francesa y en Perú (Williams et al., 2020). La confusión taxonómica que presenta el género *Nylanderia* se manifiesta particularmente en los numerosos países donde coexisten especies nativas y trotamundos o exóticas de gran similitud morfológica, como *N. guatemalensis* y *N. steinheili* en el Caribe (Williams & Lucky, 2020). El género *Nylanderia* ha sido revisado para algunas regiones del mundo, como el Neártico, Afrotrópico, el Caribe, y para algunos países como India (Kallal & Lapolla, 2012; Lapolla et al., 2011a; Lapolla & Kallal, 2019; Wachkoo & Bharti, 2015).

Estos casos reflejan la importancia de adoptar diversas metodologías para delimitar especies, y la importancia de validar esas hipótesis de especie con observaciones sobre la reproducción e historia de vida de esas entidades que sean relevantes según el concepto de especie adoptado.

Objetivo e hipótesis general

La hormiga *Nylanderia fulva* es una especie invasora que ha generado atención en los últimos años, especialmente en Colombia y EEUU, donde más se ha documentado su dispersión. Esta especie pertenece a un complejo formado por al menos dos especies crípticas simpátricas en el Caribe y Norteamérica. Poco se sabe o se ha indagado acerca de esta especie en su rango nativo, que abarcaría desde el centro de Argentina hasta alguna parte del norte de Brasil, incluso el Caribe. Debido a que las características que permiten a una especie invasora tener éxito en lugares invadidos son usualmente aquellas que han evolucionado en su rango nativo, es interesante preguntarse acerca de la biología de esta especie en el sur de Sudamérica, la porción más austral de su distribución natural. Se propuso comprender la distribución, relaciones filogenéticas y genética poblacional de *Nylanderia fulva* en el sur de Sudamérica, teniendo como hipótesis general de trabajo que esta especie comprende un complejo de especies en su rango nativo de distribución. Para alcanzar este objetivo se propone determinar los límites de distribución y variación genética de lo que se conoce como *N. fulva* en una gran porción del área nativa de distribución de la especie en el sur de Sudamérica y explorar la utilidad de diferentes fuentes de información para realizar una delimitación de especies en *Nylanderia*, con énfasis en el potencial complejo de especies *N. fulva*.

Organización de la tesis

En el primer capítulo, se constituye una introducción general al tema de estudio, una especie de hormiga invasora nativa de Sudamérica que invadió los EEUU, donde se esboza el contexto y objetivo generales de trabajo. En cada capítulo, se retoma alguno de esos aspectos abordándolos con sus hipótesis y metodologías particulares, de tal manera que un capítulo se nutre de los resultados y conclusiones de los anteriores, contando una historia acerca del avance en el conocimiento de estas hormigas. Primero, se realizaron relevamientos a campo con el fin de conocer la distribución y diversidad de especies de *Nylanderia* en Argentina y países limítrofes. Se usa la morfología y los conocimientos actuales de taxonomía en el género para hacer una primera determinación de las especies (Capítulo 1). En una segunda instancia, se aplican algoritmos de delimitación de especies utilizando marcadores de ADN, uno mitocondrial y uno nuclear, y se estiman las relaciones filogenéticas de las especies encontradas en nuestro muestreo y otras especies de Sudamérica y el Caribe (Capítulo 2). Luego, se caracteriza la diversidad genética y la estructuración poblacional de *N. fulva* en su rango nativo, ya que este conocimiento puede informar sobre procesos y patrones que pudieran moldear la evolución de las especies (Capítulo 3). Se incluyó un análisis filogenético de dos organismos que tienen una estrecha relación a la especie en estudio, bajo la hipótesis de que la coevolución de los organismos (por ejemplo, parásitos y sus hospedadores) puede inferirse mediante señales en el genoma. Encontramos dos organismos asociados a los nidos de *N. fulva* que permitieron explorar esa hipótesis, fóridos parasitoides *Pseudacteon convexicauda* y bacterias endosimbiontes *Wolbachia* (Capítulo 4).

En cada capítulo hay una introducción, metodología, resultados y discusión específicos, mientras que se presenta un capítulo final en el que se hace una recopilación de los principales resultados del trabajo y las conclusiones finales, englobando todo el cuerpo de información obtenido en esta tesis. Finalmente, se presenta la lista de toda la bibliografía consultada, y la información suplementaria de todos los capítulos y los artículos publicados en un Anexo.

Capítulo 1: Distribución del género *Nylanderia* en Argentina



Introducción

Comprender la distribución geográfica de las especies puede proporcionar indicios sobre su historia evolutiva. La biogeografía es una disciplina que se encarga de estudiar la distribución de los seres vivos en el planeta y cómo ésta ha cambiado a lo largo del tiempo. El área de distribución es un atributo que resume la historia evolutiva, ecológica y las necesidades fisiológicas de una especie (Hawkins et al., 2003). La distribución de la biodiversidad actual es afectada no solo por la historia natural de las especies, sino también por los cambios globales generados por el ser humano en el último tiempo (antropoceno), como por ejemplo el transporte de especies.

El género *Nylanderia* comprende alrededor de 130 especies de hormigas que son generalmente omnívoras, producen nidos permanentes pero también efímeros utilizando todo tipo de materiales como troncos, rocas, escombros y hasta estructuras pertenecientes a actividades humanas y se caracterizan por el movimiento rápido y errático de sus obreras (Wang et al., 2016). Estas características permiten encontrar a estas hormigas en una diversidad de ambientes; en un estudio sobre la diversidad de hormigas en hojarasca a nivel mundial, *Nylanderia* fue el quinto género más representado (Ward, 2000).

Desafortunadamente, en Argentina se conoce poco acerca de la distribución de las especies de *Nylanderia*, se cuenta con datos del siglo pasado (Kusnezov, 1978), y algunos pocos registros más actuales (Arcusa, 2011; Josens et al., 2017b; LeBrun et al., 2019), pero no se conoce aún la distribución nativa precisa de las especies presentes en el país ni en el resto de los países de Sudamérica. En particular, casi nada se sabe de *N. fulva*, especie invasora en muchos países de América, en su rango nativo en Sudamérica, donde se supone se habrían producido los cambios evolutivos que favorecieron su reciente éxito como especie invasora. En la clave de especies elaborada por Kusnezov (1978), se incluyen solo dos especies de *Nylanderia* (en ese momento bajo el género *Prenolepis*): *N. fulva* se cita con registros a nivel provincial para Argentina (12 provincias)

y la otra especie nativa, *N. silvestrii*, se menciona para cuatro provincias, con una distribución discontinua y aparentemente más acotada que la de *N. fulva*, según señala el autor. En una estimación de la distribución potencial de *N. fulva* (Fig. 1.1) se detectan como áreas favorables para la especie con los dominios Paranaense, Brasil Sur y Brasil Boreal definidos por Morrone y colaboradores (Kumar et al., 2015; Morrone et al., 2022). Sin embargo, los registros utilizados por Kumar y cols. (2015) para estimar la distribución potencial de la especie no comprendieron una gran parte de su área nativa (Fig. 1.1.B).

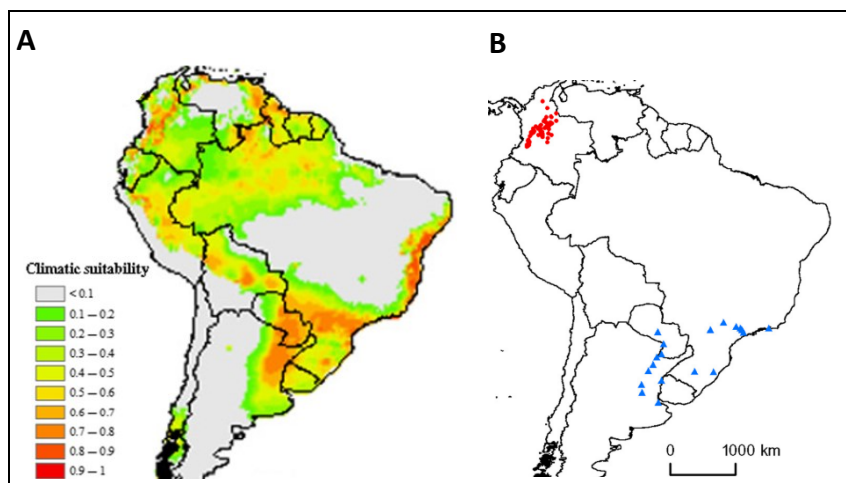


Figura 1.1. Distribución potencial de *N. fulva* en Sudamérica (A), estimada en base a los sitios de presencia en el rango nativo de la especie (B). Modificado de Kumar y cols. (2015).

Otras especies han sido reportadas para la zona más austral de Sudamérica, que incluye a Argentina y los países lindantes: las subespecies de *Nylanderia fulva*, *N. fulva fumata*, *N. fulva fumatipennis* y *N. fulva longiscapa*, la subespecie de *N. silvestrii*, *N. silvestrii kuenzleri*, y además *N. docilis*, *N. nodifera*, *N. vividula*, *N. vividula australis*, *N. brasiliensis*, *N. goeldii*, *N. guatemalensis*, *N. steinheili* (Bruch, 1915; Calcaterra et al., 2010; de Zolessi et al., 1987; Josens et al., 2017a; Kempf, 1972; Kusnezov, 1978; Snelling & Hunt, 1975; Wild, 2007a). Se elaboró un mapa con los registros bibliográficos de las especies nativas de *Nylanderia* en el cono sur de Sudamérica, que comparten su área de distribución con la hormiga *N. fulva* (Fig. 1.2).

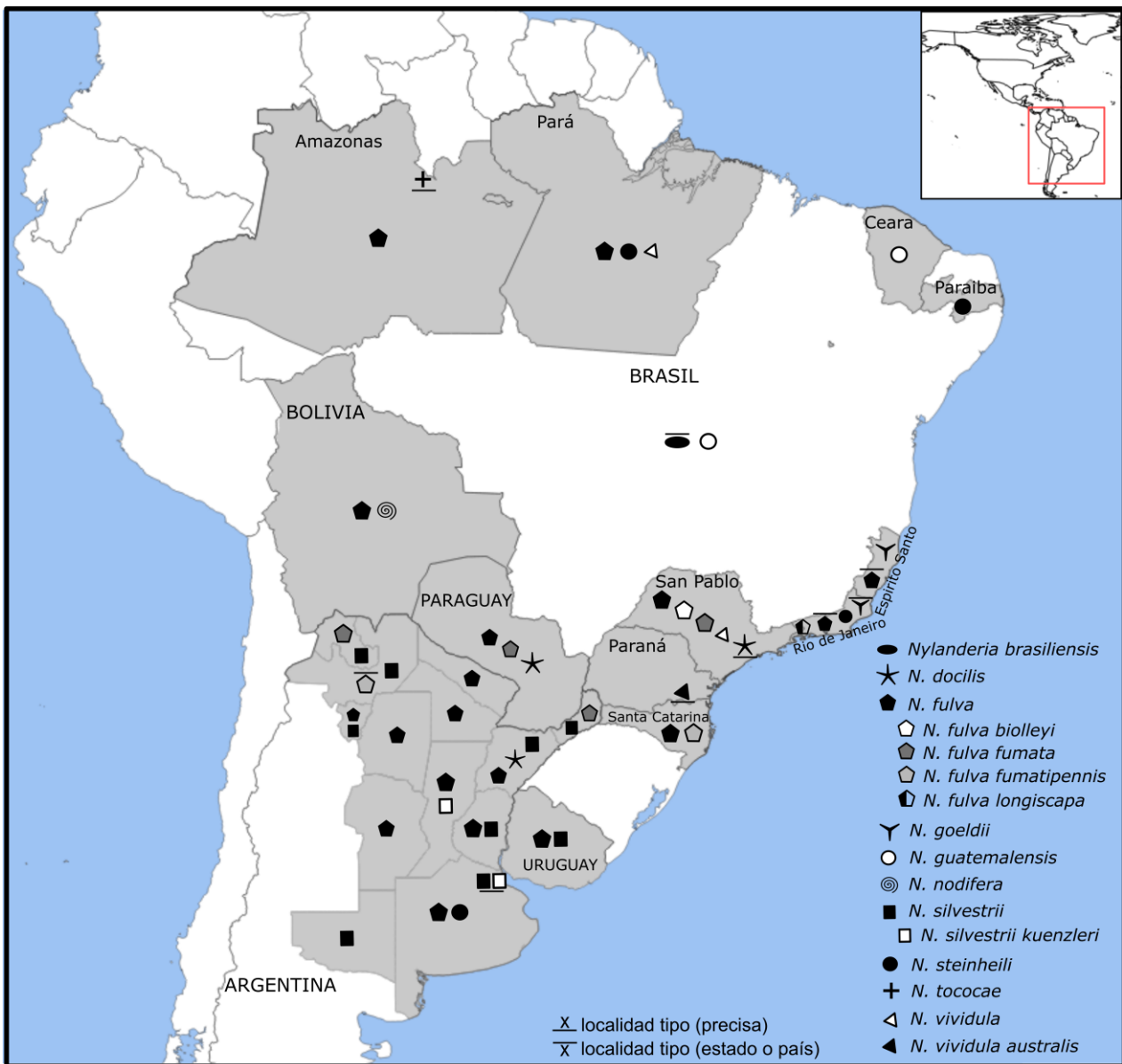


Figura 1.2. Distribución de las especies de *Nylanderia* en la región sur de Sudamérica de acuerdo a la bibliografía. Las localidades tipo se denotan con “_” junto al símbolo de la especie.

Se propuso relevar la mayor área geográfica posible de la distribución nativa del género *Nylanderia* en el sur de Sudamérica, principalmente en Argentina, con el fin de conocer la distribución de sus especies.

El objetivo e hipótesis de trabajo fueron:

1. Determinar la distribución de las especies del género *Nylanderia* en Argentina.

Hipótesis 1. *Nylanderia fulva* es la especie más común del género en Argentina, siendo la única ampliamente distribuida por el norte del país.

Metodología

Región geográfica de estudio

El área de colecta fue seleccionada de tal manera de abarcar el mayor rango posible de la distribución natural de las especies de *Nylanderia* registradas en la región, principalmente su extremo sur en Argentina. Éstas se distribuirían abarcando gran parte del centro y norte de Argentina, de acuerdo a la clave de especies de *Nylanderia* de Argentina elaborada por Kusnezov (1978). Los relevamientos fueron llevados a cabo: en Argentina, en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán, norte de San Luis y Río Negro, y en algunas regiones de Brasil, Paraguay y Uruguay. En las regiones seleccionadas se recorrieron las principales rutas nacionales y provinciales y se realizaron relevamientos en las principales ciudades atravesadas por dichas rutas y/o cada aproximadamente 100 km. Se espera encontrar *N. fulva* en las ciudades debido a la asociación positiva hallada en otras hormigas invasoras con hábitats disturbados (Bertelsmeier et al., 2017).

Para llevar a cabo las colectas de material biológico en ambientes naturales o prístinos, se solicitaron permisos de colecta en parques nacionales y reservas de la biodiversidad. Se obtuvieron permisos para los siguientes establecimientos: Parques Nacionales Campo de los Alisos, Chaco, El Palmar, Iberá, Iguazú, Impenetrable, Mburucuyá, Pre Delta; la Reserva Natural Paitití; el Jardín Botánico Carlos Thays; y la Reserva Ecológica Costanera Sur. Se recibió un permiso particular para realizar colectas en la provincia de Misiones.

Los relevamientos se realizaron en el período 2017-2023 en diferentes momentos del año. Principalmente se colectó durante la primavera-verano, épocas del año cuando hay mayor actividad de las hormigas por las mayores temperaturas. Se conoce que la mayoría de las especies de *Nylanderia* que habitan regiones templadas producen sus sexados en verano y que éstos emergen en la siguiente primavera (Lapolla et al., 2011b).

Colecta e identificación de las muestras

Se ha establecido que las hormigas de *Nylanderia* forman frecuentemente nidos efímeros que se encuentran en virtualmente cualquier cavidad disponible con humedad, ya sean naturales, creadas por otros animales que han abandonado el sitio o creadas por desperdicios humanos,

escombros o incluso en cualquier cavidad dentro de una edificación (Zenner-Polania, 1990). Esto permite utilizar la búsqueda manual como técnica de relevamiento más idónea en ambientes donde se encuentren dichas cavidades para explorar.

Los nidos se buscaron en cada sitio durante 30 minutos debajo de rocas, troncos y elementos del suelo, y se observó la presencia de senderos en el suelo y sobre árboles, postes y construcciones. En algunos casos se utilizaron cebos (tarjetas plásticas de 10 x 10 cm) con mantequilla de maní azucarada que se colocaron en lugares sombreados y separados por al menos 5 metros y se dejaron durante 30 minutos hasta la aparición de hormigas en su superficie.

Las obreras, sexuados e inmaduros de cada nido (hasta 100 individuos aproximadamente) se colectaron mediante un aspirador manual y conservaron en recipientes herméticos con alcohol al 96%. Las muestras fueron analizadas morfológicamente bajo la lupa e identificadas tentativamente en base a claves taxonómicas disponibles para el género (Kusnezov, 1978) y material fotográfico de referencia disponible en antweb (www.antweb.org).

Confección de mapas de distribución

Se utilizó el software libre QGIS para graficar las coordenadas geográficas de las muestras sobre un mapa junto a las ecorregiones (Olson et al., 2001).

Microscopía electrónica de barrido

Se seleccionó un ejemplar de cada morfoespecie para tomar fotografías utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB), a fin de hallar diferencias morfológicas de utilidad para separar especies de *Nylanderia*. Para ello se secaron las hormigas en una serie creciente de alcoholes (96% a 100% etanol-agua) y se secaron completamente mediante la técnica de punto crítico en el Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN). Luego, se montaron los especímenes sobre platinas de aluminio y se recubrieron con una aleación de oro-paladio en el MACN. Las fotografías fueron tomadas en el microscopio del MACN y el del Centro de Microscopías Avanzadas, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Resultados

Se hallaron nidos de *Nylanderia* en la mayoría de los sitios de búsqueda, tanto antrópicos como naturales y protegidos; no se hallaron colonias en los Parques Nacionales El Palmar y Pre Delta. Las especies registradas en el muestreo realizado en Argentina y países limítrofes fueron tres: *Nylanderia fulva*, *N. silvestrii* y *N. steinheili* (Fig. 1.4). Además, se registró un nido de una especie cercana, *Paratrechina longicornis* en la provincia de Misiones, en las afueras de El Dorado, cercano a la frontera con Brasil.

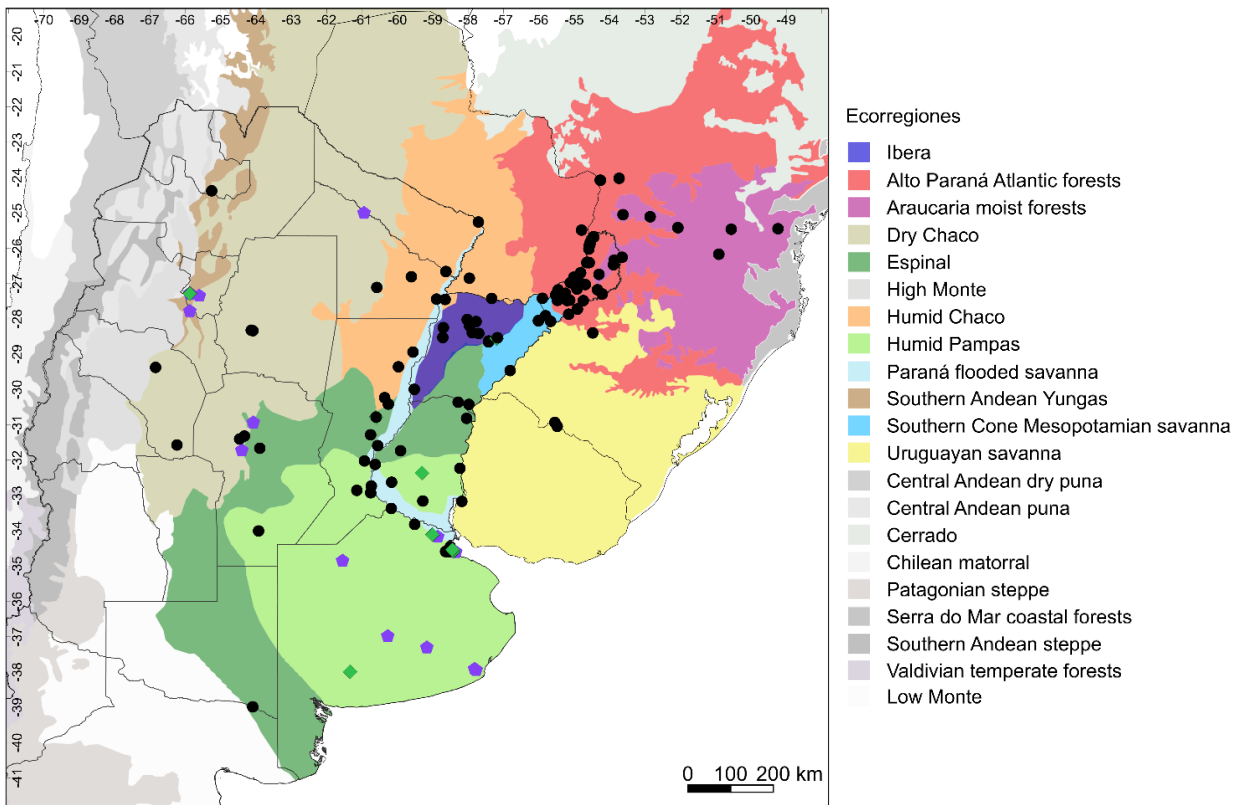
Los sitios de nidificación más frecuentes fueron debajo de troncos o piedras en áreas rurales (Fig. 1.3) y debajo de baldosas, escombros o basurales en zonas urbanas. Si bien la mayoría de los nidos fueron encontrados en áreas bajo sombra, se hallaron dos nidos en áreas expuestas por completo a la luz solar; ambos se encontraron bajo troncos de gran tamaño y correspondieron a la especie *N. fulva*, se caracterizaron por ser muy populosos y encontrarse muy cerca de la superficie.



Figura 1.3. Ejemplos de sitios donde se hallaron nidos de *Nylanderia* en ambientes naturales, bajo piedras (izq.) o bajo troncos en descomposición (centro), y en un jardín botánico bajo adoquines (der.).

El noreste argentino es la región donde se colectaron más colonias de *Nylanderia*, de las cuales todas correspondieron a la especie *N. fulva*. En los países limítrofes muestreados solo se encontraron nidos de *N. fulva*.

La casta reproductiva fue producida en los nidos muestreados en los meses de mayo y junio, en el caso de hembras aladas, y febrero-junio, septiembre y octubre en el caso de machos. Los muestreos se realizaron en todos los meses del año, a excepción de junio. Para la especie *N. silvestrii* solo se halló una reina en el total de los nidos relevados.



◆ *N. steinheili*



◆ *N. silvestrii*



● *N. fulva*



Figura 1.4. Sitios donde se colectaron muestras de *Nylanderia* spp. en el cono sur de Sudamérica y delimitación de las ecorregiones según Olson y colaboradores (2001). Se muestra un ejemplar de la casta obrera de cada especie en vista lateral.

La especie *N. silvestrii* se colectó principalmente en áreas naturales: PN Los Alisos, PN El Impenetrable, Reserva Natural Paitití, Reserva Ecológica Costanera Sur; y parques municipales, aunque algunos registros también se hicieron en ciudades y sus alrededores. Se encontraron un total de 13 nidos en 12 localidades. La mayoría de los nidos se encontraron en áreas de sierras, y en las ecorregiones Pampa Húmeda, Espinal, Chaco Seco y Yungas.

Los nidos colectados de *N. fulva* (N=217) se encontraron en regiones secas a húmedas, con precipitaciones medias anuales de 23,7-253,2 mm (promedio de 115,57 mm), mientras que los nidos de *N. silvestrii* fueron hallados en regiones más secas, con precipitaciones medias anuales de 59,5-87,7 mm (promedio de 72,5 mm).

La especie *N. steinheili* fue recolectada en 10 sitios, en ambientes naturales, como en el PN Los Alisos y en los Esteros del Iberá, y antrópicos, como en ciudades y en un jardín botánico (JBCT). Las obreras se distinguen fácilmente de las otras especies por su patrón de coloración, ya que su cutícula es de un marrón muy oscuro y las coxas son de color blancuzco, y por su menor tamaño, más evidente en la casta reproductiva. El comportamiento a campo de esta y las otras especies fue similar, mostrando el característico movimiento rápido y errático que le da el nombre de “hormigas locas”. La especie *N. steinheili* se encontró en las ecorregiones de las Yungas, Espinal, Pampa Húmeda e Iberá.

En cada especie de *Nylanderia* encontrada en Argentina se estudiaron en detalle algunas características morfológicas de machos (n=2) y obreras (n=3) utilizando MEB. En obreras, se observó el patrón de la pubescencia en dos estructuras: la cara dorsal del propodeo y en la bulla (proyección de la cutícula que recubre la glándula metapleurale) (Fig. 1.5). La obrera de *Nylanderia steinheili* presentó pubescencia a cada lado dorsal del propodeo de tipo espiralado (Figura 1.5.C) en contraste a las otras dos especies. En la obrera de *N. fulva* (Fig. 1.5.A), la pubescencia fue mucho más abundante que en los otros especímenes, cubriendo hasta los laterales del propodeo de manera irregular. La obrera de la especie *N. silvestrii* presentó la menor cantidad de pilosidad muy dispersa (Fig. 1.5.B). También se encontraron diferencias en la presencia de pubescencia recubriendo la bulla. En *N. fulva* ésta cubre su superficie por completo, mientras que en las otras dos especies la pubescencia está prácticamente ausente. La forma de la bulla es triangular en *N. silvestrii* y *N. steinheili*, y notablemente más redondeada en *N. fulva* (Fig. 1.5, flechas). Estas características son difíciles de observar a la lupa, requiriéndose que el espécimen esté montado en seco y una capacidad de aumento de cerca de 100 veces para poder apreciarlos, o utilizando MEB, excepto la forma de la bulla que puede ser identificada a menor aumento.

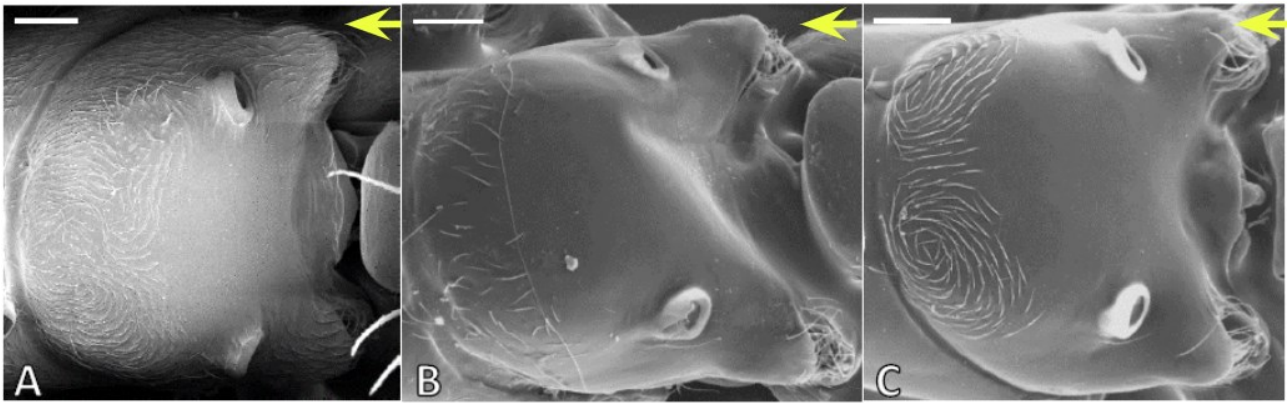


Figura 1.5. Fotografías del propodeo en vista dorsal de obreras de las tres especies de *Nylanderia* de Argentina, tomadas con microscopio electrónico de barrido. A: *N. fulva* , B: *N. silvestrii*, C: *N. steinheili*. Las flechas indican la bulla. Escala: 50 μm .

En los machos de *N. fulva*, las valvas externas de la genitalia son triangulares, con la punta más o menos aguda, y presentan una densa capa de setas largas e irregulares perimetrales (Fig. 1.6.C). En los dos machos de *N. fulva* observados con MEB (Fig. 1.6.A-B), no se encontraron diferencias entre sí y la morfología coincidió con lo observado en el material de referencia; ambos resultaron diferentes a la genitalia de *N. pubens* (Fig. 1.6.D).

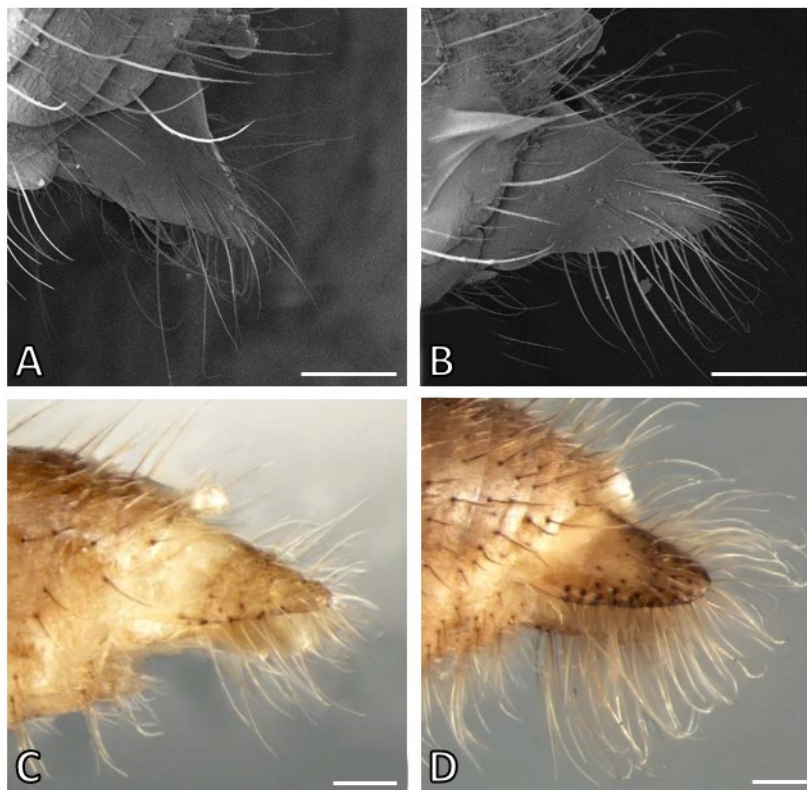


Figura 1.6. Fotografías de las valvas externas de la genitalia de machos de *Nylanderia fulva* (A-C) y *N. pubens* (D). A-B: tomadas con microscopio electrónico de barrido, C-D: adaptadas de Gotzek *et al.*, 2012. Escala: 100 μm .

Discusión

La metodología de muestreo empleada para relevar nidos de *Nylanderia* spp. fue adecuada, evidenciado por los más de 200 sitios donde se colectaron muestras de estas hormigas. Estos resultados, además, indican la amplia distribución y presencia del género en Argentina, en donde los límites de distribución encontrados hasta el momento podrían considerarse la región del Espinal, en la zona más austral y occidental del país (latitud máxima registrada a los -38°), mientras que en la región del noroeste argentino el límite occidental se encuentra en las Yungas (longitud máxima registrada a los -65°). Si bien estos límites no comprenden la real delimitación del rango nativo de las especies estudiadas, constituye un aporte significativo a los escasos datos disponibles hasta el momento. Además, el Chaco Seco podría actuar también como un límite de la distribución de las especies, ya que fue la ecorregión en donde se encontró la menor cantidad de muestras. Teniendo en cuenta esto último, el género en el sur de Sudamérica tendría una distribución mayormente Neotropical (Arana et al., 2021).

Se conoce que las poblaciones invasoras en Colombia de *N. fulva* pudieron desarrollarse en un rango amplio de altitudes (150-2600 msnm), siendo las mejores condiciones los 1500 msnm (Zenner-Polania, 1990). En Argentina, se registraron nidos de *N. fulva* hasta los 1170 msn, siendo además la especie registrada en la mayor altitud, comprobando que puede ocupar un rango amplio de altitudes en su rango nativo. Un modelado de distribución (Fig. 1.1) sugiere que las zonas con mayor probabilidad de presencia de la especie son el noreste de Argentina a lo largo del río Paraná y aproximadamente el límite político de la provincia de Buenos Aires. Esta estimación, teniendo en cuenta el rango de distribución encontrado con este trabajo de tesis, queda entonces incompleta. La inclusión de más representación de sitios en el sur del rango nativo de la especie podría mejorar la estimación del modelado.

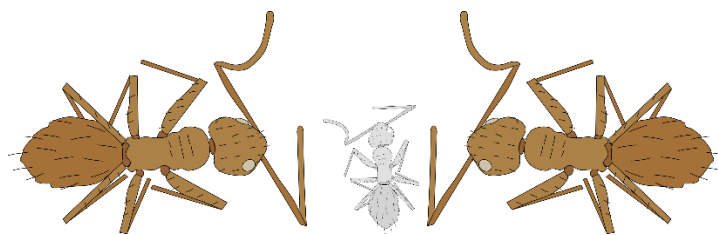
Los registros bibliográficos de *N. fulva* quedan entonces actualizados con lo obtenido en este muestreo, ya que se hallaron nidos en todas las provincias donde se mencionaba la presencia de la especie que aportan en mayor detalle localidades y tipos de ambientes donde están presentes las hormigas de este género; se expande el rango conocido de estas hormigas hacia las provincias de La Rioja y Río Negro, constituyendo en este trabajo los primeros registros de *N. fulva* en esos lugares y ampliando el rango nativo en su extremo más occidental y austral. Aportamos mayor detalle a la distribución conocida de *N. silvestrii* en la provincia de Buenos Aires y Tucumán, mientras que aportamos nuevos registros en las provincias de Córdoba y Chaco, donde no se había mencionado la especie. Así como lo observado por Kusnezov, esta especie tendría una distribución discontinua

(Kusnezov, 1978); su distribución actual podría estar estrechamente relacionada a ambientes serranos y con muy bajo nivel de disturbios.

La especie *N. steinheili* no sería nativa de Argentina, sin embargo, recientemente se menciona un registro en Buenos Aires (Josens et al., 2017b) y se menciona su presencia en listas de especies en diversos estados de Brasil (ver Fig. 1.2). En este trabajo de tesis, se hallaron diez nidos de una especie identificada como *N. steinheili* en base a su característico patrón de coloración y el tamaño pequeño de sus castas en relación a las otras especies presentes en el país. Si bien este número es muy bajo en comparación con la abundancia de nidos de *N. fulva* o *N. silvestrii* hallados, en particular un orden de magnitud menor que en la primera, es de relevancia que se hayan encontrado en varias localidades, sobre todo fuera de los grandes puertos como Buenos Aires, y en un área protegida. En Brasil, la especie *N. guatemalensis*, que pertenece al mismo complejo de especies que *N. steinheili*, es considerada nativa y su distribución conocida abarca una amplia parte de Brasil, como los estados de Pará, Acre, Mato Grosso, Maranhao, y su distribución más austral conocida es en el estado de Paraná (das Chagas Rabelo, 2015; Demétrio et al., 2017; Do Prado et al., 2019; Oliveira et al., 2009; Williams & Lucky, 2020). En trabajos de relevamiento de especies recientes, la especie más común de esas dos en Brasil es *N. guatemalensis*; esta última especie tendría una distribución continental, mientras que *N. steinheili* estaría restringida a las islas del Caribe y las Antillas, y habría sido erróneamente identificada en muchos casos (J. Williams, com. Pers.). Es por eso que se concluye que los especímenes identificados en este trabajo podrían corresponder más probablemente a *N. guatemalensis* y no a *N. steinheili*.

El estudio preliminar realizado sobre la morfología de obreras y machos de algunas especies de *Nylanderia* de Argentina dio como resultado algunos hallazgos que podrían contribuir a la confección de una clave taxonómica, como el patrón característico de la pubescencia en el propodeo, que fue marcadamente diferente en las tres especies observadas. Las tres especies encontradas en este trabajo pueden ser separadas por su diferente tamaño (*N. guatemalensis* es generalmente menor), su coloración (coxas blancas o crema en *N. guatemalensis*, y resto del cuerpo marrón, mientras que las otras especies tienen coloración homogénea marrón), pubescencia (densa y ubicua en *N. fulva*, escasa en *N. silvestrii* y restringida a ciertos segmentos en *N. guatemalensis*), largo del escapo (*N. silvestrii* más corto que *N. fulva*). Si bien estas especies fueron claramente distinguibles, para el caso de *N. silvestrii* no descartamos que los ejemplares puedan corresponder a otra especie de la región, ya que al momento no se pudo comparar la identificación en base a ejemplares tipo, además de que la única información de esa especie (así como de las otras especies de la región sur de Sudamérica) es la descripción original.

Capítulo 2: Delimitación de especies de *Nylanderia* de Sudamérica



Introducción

El género *Nylanderia* tiene una compleja historia taxonómica, ha sido revivido a su estatus de género válido en un reciente trabajo que plantea la primer hipótesis de filogenia del grupo a partir de marcadores moleculares (Lapolla et al., 2010a). A partir de ese trabajo, se han publicado revisiones taxonómicas de las especies de *Nylanderia* para diversas regiones del mundo y se han actualizado las estimaciones de las relaciones filogenéticas para el género (Kallal & Lapolla, 2012; Lapolla et al., 2011a; Wachkoo & Bharti, 2015; Williams et al., 2022).

Nylanderia pertenece a un grupo de géneros denominado grupo *Prenolepis* (*Prenolepis* genus-group) y es el más numeroso en especies, con más de 130 especies y subespecies descritas (Lapolla et al., 2010b). Esta diversidad, sin embargo, no es acompañada por una gran variación morfológica entre las especies, sobre todo en la casta obrera. Actualmente se reconocen al menos tres complejos de especies, cuyas obreras son indistinguibles o presentan mínimas diferencias, constituidos por hasta once posibles especies (Williams et al., 2020): complejo *N. bourbonica*, complejo *N. guatemalensis* y complejo *N. fulva* (Fig. 2.1).

Las descripciones disponibles para las especies de *Nylanderia* de la región sur de Sudamérica se encuentran desactualizadas (e. g. *N. silvestrii*, *N. docilis*, *N. goeldii*). *Nylanderia fulva*, debido a que ha cobrado gran importancia en los últimos años, fue incluida en recientes tratamientos taxonómicos (Fernández, 2000; Gotzek et al., 2012; Williams et al., 2022), aunque su tratamiento ha sido fundamentalmente individual.

Estudios genéticos recientes proveen evidencia que respalda que *N. fulva* es un complejo de especies que podría estar conformado por cuatro especies (Williams et al., 2022). Por otro lado, la especie *N. fulva* es politípica, con actualmente cinco subespecies válidas con localidades tipo desde Argentina hasta las Islas Galápagos y el Caribe. En los últimos años, se han sinonimizado dos subespecies con la subespecie nominal (*N. fulva cubana* y *N. fulva fumata*) (Lapolla & Kallal, 2019; Wild, 2007b). Esto evidencia la necesidad de una revisión taxonómica que abarque todo el potencial

rango nativo de la especie (Sudamérica y el Caribe), considerando además que la especie es parte de un complejo y que potencialmente puede coexistir con otras *Nylanderia* morfológicamente similares.

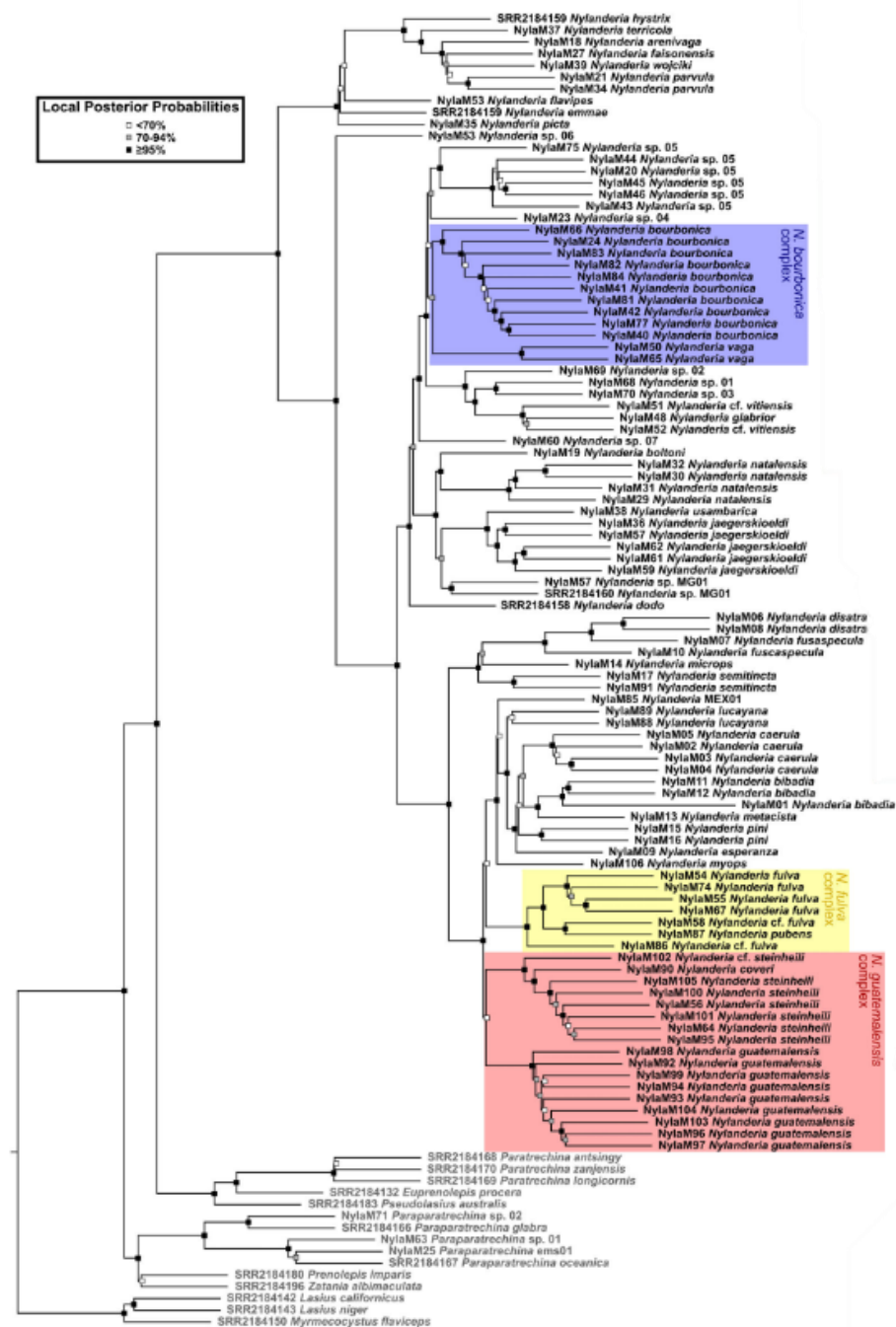


Figura 2.1. Filogenia del género *Nylanderia* del mundo basada en elementos ultraconservados del genoma (UCEs) (Williams et al., 2020), donde se señalan los tres complejos de especie actualmente conocidos.

En base a las evidencias de que existen complejos de especies dentro del género, y más precisamente, las especies encontradas en los muestreos corresponderían a dos de ellos, se planteó hacer un análisis de delimitación de especies utilizando secuencias de ADN para inferir los límites y número de especies presentes efectivamente en la región en estudio.

Los objetivos e hipótesis de trabajo fueron:

2. Estudiar las relaciones filogenéticas de *Nylanderia fulva*.

Hipótesis 2. *Nylanderia fulva* es una especie hermana de *N. pubens*

3. Delimitar las especies de *Nylanderia* de Argentina.

Hipótesis 3. *Nylanderia fulva* comprende un complejo de especies.

Metodología

Especímenes

Se utilizaron los especímenes de *Nylanderia* colectados en este trabajo de tesis, así como otros recibidos en préstamo por investigadores colegas (cooperadores), y se determinaron hasta el nivel de morfoespecies utilizando claves disponibles (Kusnezov, 1978; Martínez Montoya, 2008). A su vez se obtuvieron secuencias de ADN en este trabajo y otras cedidas por colaboradores obtenidas a partir de datos secuenciados por UCEs (ultra-conserved elements), siendo varias de ellas correspondientes a especímenes identificados a nivel de especie por esos investigadores. Se recibieron ejemplares de tres sitios en una región del Amazonas en Brasil, colectados en un muestreo de la diversidad de insectos utilizando trampas de caída (Guilherme et al., 2022). Un resumen de los datos recopilados se muestra en la Figura 2.2.

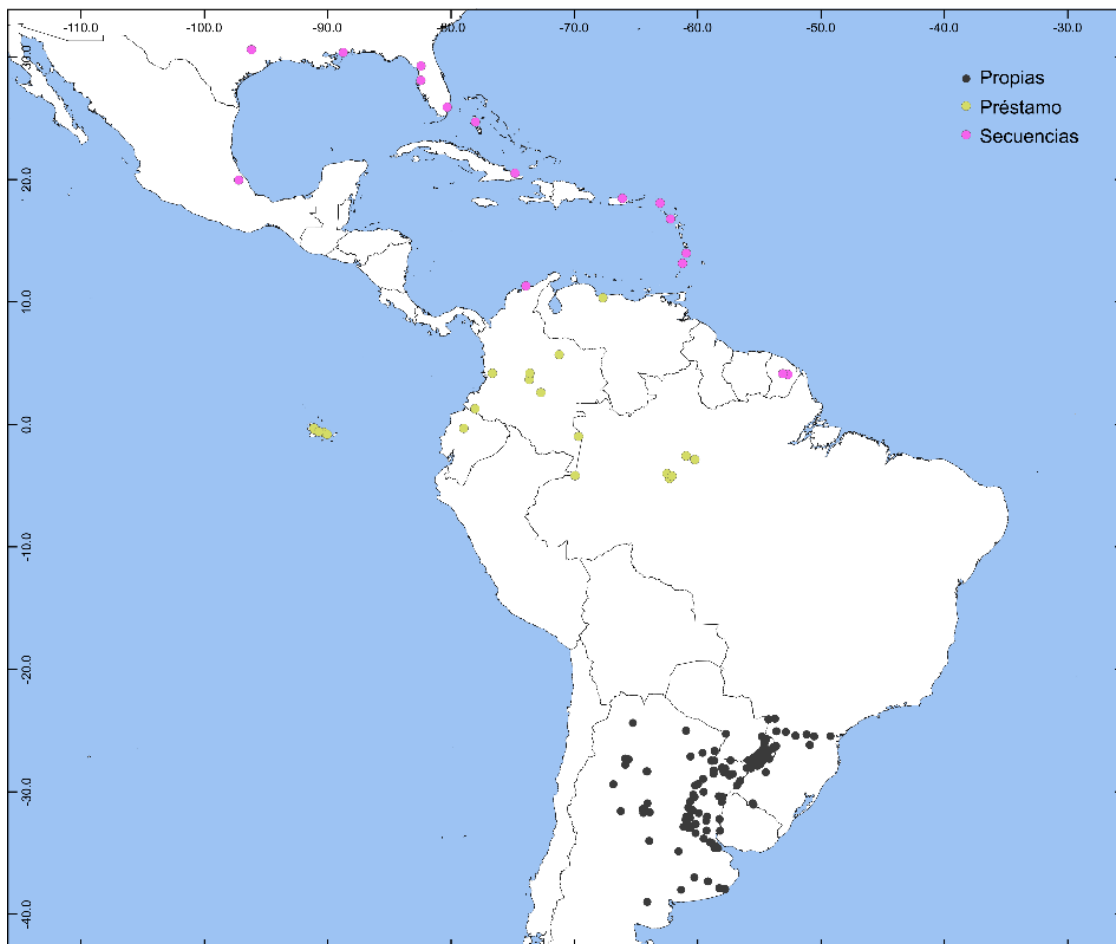


Figura 2.2. Ubicación geográfica de los especímenes obtenidos con los muestreos realizados en esta tesis (“Propias”), en préstamo, y de secuencias de ADN.

Extracción y amplificación de ADN

Previo a la extracción, se secaron las hormigas colocándolas sobre un papel secante para evaporar el alcohol (medio de conservación). Se extrajo ADN genómico de una sola hormiga obrera por muestra utilizando el kit Extract-N-Amp Tissue PCR (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). Cada muestra se trituró utilizando pilones plásticos esterilizados (Eppendorf) y se procedió según el protocolo propuesto por el fabricante. Se corroboró mediante espectrometría en un detector Denovix la concentración de nucleótidos totales obtenidos mediante el proceso de extracción.

Se amplificó mediante PCR un fragmento del gen mitocondrial que codifica la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) y un fragmento del gen nuclear *wingless* (*wnt*). Los *primers* utilizados para amplificar cada fragmento fueron seleccionados de tal manera que las secuencias obtenidas puedan compararse con otras ya disponibles para la especie *N. fulva* en el repositorio Genbank (www.genbank.com). Estos fueron *Jerry* y *Pat* para el gen COI y 578F y 1032R para el gen *wingless*. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen de 25 uL por muestra para el fragmento del

gen COI (solución de trabajo en la Tabla 2.1) y en 20uL para el fragmento del gen *wingless*, en cuyo caso se utilizó el mix de reacción del kit Extract-N-Amp Tissue PCR que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación, a excepción de los *primers* y el templado de ADN. El protocolo de PCR que se siguió es el de Gotzek y col. (2012): desnaturalización inicia a 94°C por 3 min; 35 ciclos de amplificación de desnaturalización a 94°C por 1 min, annealing a 50°C por 1 min y extensión a 72°C por 2 min; y extensión final a 72°C por 10 min. Se verificó el resultado de las amplificaciones con geles de agarosa. Se utilizó el servicio de secuenciación Sanger de la empresa Macrogen.

En el caso de las muestras cedidas por otros colegas, posiblemente debido al estado de conservación de los especímenes, no fue posible en la gran mayoría de los casos obtener secuencias de ADN con los protocolos diseñados. Es por esto que se aplicaron diferentes técnicas que usualmente permiten sobrellevar la fragmentación del ADN debido a la antigüedad o estado de conservación de las muestras, que se detallan en el anexo (A2.1). Sin embargo, se logró amplificar uno o ambos genes para solamente cinco de esos ejemplares, todos provenientes del muestreo en Brasil.

Tabla 2.1. Composición de la solución utilizada en la reacción de PCR del gen COI.

Componente	Volumen (µL)
Agua destilada	16,2
Buffer de PCR	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTPs	2,5
Primer forward	0,6
Primer reverse	0,6
TAQ polimerasa	0,1
Templado de ADN	1
Volumen final:	25

Análisis de secuencias de ADN

Se verificó que los fragmentos secuenciados no correspondan a posibles duplicaciones génicas o pseudogenes, verificando que la secuencia de aminoácidos traducida corresponda con una secuencia de referencia, y que dentro de la secuencia de aminoácidos no se encuentren codones *stop*. Para ello se analizaron los seis marcos de lectura posibles para cada gen en R con el paquete Biostrings (Pagés et al., 2019).

Se alinearon las secuencias de cada gen utilizando el software libre UGENE v. 38.1, mediante el algoritmo *Muscle*, adicionando secuencias de repositorios de *N. fulva* así como del grupo externo.

Debido a que no se hallaron prácticamente secuencias del fragmento COI seleccionado para utilizar como grupo externo, la elección de dicho grupo se redujo a las pocas opciones disponibles. Algunas de ellas se obtuvieron haciendo una búsqueda en genomas mitocondriales disponibles utilizando el software MitoFinder (Allio et al., 2020). El alineamiento final para el gen COI resultó en 125 secuencias de 688 pares de bases (pb) y 100 secuencias del fragmento de *wnt* de 340 pb. Se seleccionaron secuencias como grupo externo de géneros cercanos filogenéticamente y de otras especies de *Nylanderia* del Neotrópico, que se detalla en la Tabla A2.1. Algunas de las secuencias incluidas fueron obtenidas mediante un algoritmo de filtrado de resultados de secuenciación de *loci* UCE, PHYLUCE, que permite recuperar fragmentos de ADN de uso recurrente en hormigas, tales como el gen *wingless* y el gen COI en su versión completa, con lo cual fue posible seleccionar el fragmento estudiado en este trabajo, que no es el usual fragmento *barcode* flanqueado por los *primers* LCO-HCO. Estas secuencias provinieron de varios sitios de América continental e islas y fueron brindadas por un cooperador.

Análisis filogenético

La estimación de las filogenias se realizó utilizando inferencia Bayesiana (IB) implementada en BEAST v2.6 (Bouckaert et al., 2019). Por un lado se estimó la filogenia del gen COI, que posteriormente fue utilizada para los análisis de delimitación de especies, y por otro se combinaron ambos genes en un árbol de especies.

Con el programa IQtree (Kalyaanamoorthy et al., 2017), que implementa el algoritmo ModelFinder, se estimaron los modelos de sustitución nucleotídica de cada gen. El modelo de sustitución más probable utilizando el criterio BIC fue TIM2 + I + G4 para el gen COI y K80 + G4 para *wnt*, se seleccionó un reloj molecular estricto con una tasa de sustitución elaborada en base a datos de hormigas de las subfamilias Formicinae, Myrmecinae y Ponerinae en 0,01455 sustituciones por millón de años (ma) (Resende et al., 2010), 100 millones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), muestreadas cada 2000 generaciones y los valores de los prior por default. Para el árbol filogenético del gen COI se utilizó el programa IQtree para estimar una filogenia basada en máxima verosimilitud (ML).

Delimitación molecular de especies

Se realizó un análisis de delimitación de especies para *Nylanderia* utilizando secuencias de ADN. Se aplicaron diferentes modelos de delimitación: Assemble Species by Automatic Partitioning,

ASAP (Puillandre et al., 2021), Generalized mixed Yule-coalescent, GMYC (Fujisawa et al., 2013), implementación Bayesiana del método Poisson Tree Processes, bPTP (Zhang et al., 2013). El método ASAP, a diferencia de los otros basados en árboles filogenéticos, utiliza distancias para separar posibles unidades taxonómicas independientes, que en este caso se calcularon utilizando el modelo de Kimura de dos parámetros (K80) en el servidor online (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>), con los parámetros sugeridos por los autores y 200000 generaciones de MCMC. Para los métodos GMYC y bPTP se utilizó el árbol datado para el gen COI+wnt obtenido en BEAST como explicado anteriormente, con 20 millones de generaciones MCMC, muestreadas cada 1000 generaciones, el modelo de sustitución TIM2 +G4 +I, reloj molecular estricto con una tasa de sustitución de 0,01455 y un prior de Coalescent Constant Population. El modelo bPTP se corrió en el servidor (<https://species.h-its.org/>), el modelo ASAP en el servidor (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html>) y el modelo GMYC en R con el paquete splits (Ezard et al., 2021).

Determinación morfológica de especies

Los ejemplares en préstamo recibidos de investigadores de Brasil y Colombia fueron determinados bajo lupa utilizando una clave de morfoespecies de *Nylanderia* para Colombia y comparando con fotografías de antweb (Martínez Montoya, 2008). Debido a la imposibilidad de obtener secuencias de ADN de la mayoría de estos ejemplares, en muchos casos la delimitación morfológica no pudo contrarrestarse con la molecular. Debido a la escasez de fotografías de material tipo de muchas especies sudamericanas, no fue posible determinar a nivel de especie estos ejemplares.

Resultados

En el capítulo anterior se describen tres especies registradas en Argentina y países limítrofes en base a la morfología de los muestreos realizados en este trabajo.

Los ejemplares recibidos en préstamo provenientes de Brasil, se identificaron en las especies/morfoespecies *N. fulva*, *N. cf. pubens* y *N. steinheili/N. guatemalensis*. Los especímenes provenientes de Colombia y Ecuador se determinaron hasta seis especies/morfoespecies, *N. fulva*, *N. steinheili/N. guatemalensis*, *N. docilis*, *N. sp1*, *N. sp2* y *N. sp3*. Se obtuvieron secuencias de ADN

que se incorporan en los subsiguientes análisis para siete de esos ejemplares correspondientes a las especies: *N. cf. pubens* (NF248, NF251a), *N. fulva* (NF262, NF263, NF266) y *N. guatemalensis* (NF247, NF251b).

En los árboles de los genes, se observa que el fragmento mitocondrial (Fig. 2.3) presenta un nivel de discriminación mayor que el nuclear (A2.2), con tres linajes dentro de la especie *N. fulva* con monofilia recíproca y soporte de ramas alto (mayor a 90 en todos los casos, Fig. 2.3). Estos linajes (denominados a partir de ahora clados I a III) tienen una estrecha relación con las secuencias que corresponden a la especie *N. pubens*, que se representa como clado hermano a los tres linajes de *N. fulva*. En la filogenia estimada con el gen *wnt*, *N. fulva* se estima como un único linaje monofilético que incluye además a todas las muestras de *N. pubens* (A2.2). Las muestras NF249 y NF262 provenientes de Brasil, e identificadas como *N. cf. pubens*, agruparon, la primera, en un clado que contiene a la especie *N. lucayana*, originaria de las Antillas, aunque con bajo soporte, y la segunda como hermana al clado I de *N. fulva* (Fig 2.3). En general, el complejo *N. fulva/N.pubens* presenta terminales con longitudes de ramas muy cortas, posible evidencia de reparto incompleto de linajes o también de falta de señal genética.

Se incluyeron en el análisis secuencias de *N. fulva* de EEUU, Puerto Rico, Saint Martin y Méjico (ver secuencias con el símbolo “+” en Fig. 2.3). La muestra de Méjico resultó una especie diferente, posiblemente sin otros representantes incluidos en este análisis, mientras que todas las muestras de EEUU agruparon en su totalidad dentro del complejo *N. fulva*; la mayoría agrupó dentro del clado I mientras que la muestra de Saint Martin y una de Florida agruparon junto a secuencias de *N. pubens*.

En cuanto a las otras especies identificadas, se encontró que los ejemplares correspondientes a *N. silvestrii* agruparon en un clado parafilético con buen soporte (filogenia COI y COI-*wnt*), incluyendo a *N. caerulea*. Se observan dos linajes, uno hermano a *N. caerulea* más antiguo (ancestro compartido hace aproximadamente 1,9 millones de años –ma-), y otro más reciente, que divergió hace 1,5 ma.

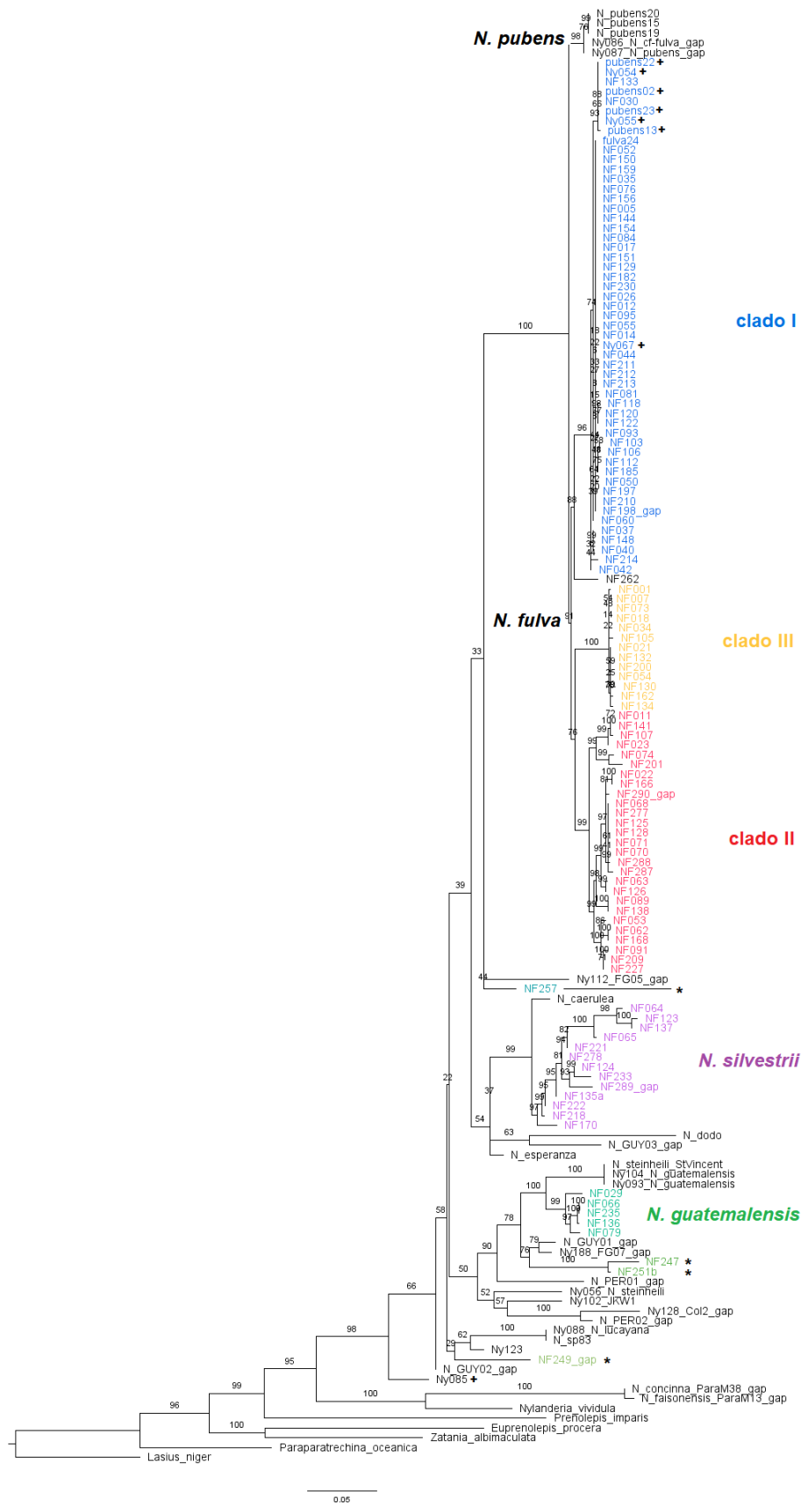


Figura 2.3. Filogenia de las especies de *Nylanderia* de Sudamérica basada en el gen COI de máxima verosimilitud. Se identifican las especies de acuerdo a su monofilia recíproca y la identificación morfológica de las obreras. Las secuencias indicadas con * denotan especies indeterminadas y + secuencias de *N. fulva* introducidas.

El complejo *N. guatemalensis* está representado por cinco especies/morfoespecies en las filogenias estimadas: *N. guatemalensis*, *N. steinheili*, *N. lucayana*, *N. spp.* JKW1 y FG07. Este complejo se recupera en las filogenias como parafilético. En total, se presentan dos linajes monofiléticos con alto soporte de ramas para algunos grupos de especies: [*N. guatemalensis* + *N. guatemalensis* de Argentina], [*N. steinheili* + *N. sp.* JKW1]. Las secuencias correspondientes a la especie *N. guatemalensis* resultaron en un linaje hermano al que contiene las secuencias de repositorios de *N. guatemalensis* y de un ejemplar de *N. steinheili* del Caribe. Asimismo, las muestras NF251 y NF257 fueron identificadas morfológicamente como *N. guatemalensis*, pero su relación filogenética no refleja ese mismo resultado, ya que están más distantemente relacionadas, aunque con bajo soporte de ramas. En particular, esas secuencias corresponden a muestras de Brasil, mientras que el otro linaje de *N. guatemalensis* fue colectado en Argentina. En la filogenia de COI estas secuencias sí resultan un clado hermano a *N. guatemalensis*, con moderado soporte. Otras morfoespecies de repositorios que agrupan con las anteriormente mencionadas son *N. spp.* 83, GUY01, GUY02 y PER01, de las cuales no se cuenta con información más que su ubicación geográfica (región Caribe).

Al graficar la distribución de los linajes mitocondriales de *N. fulva* en un mapa, se puede observar una distribución de los mismos que podría tener una estructuración geográfica (Fig. 2.4). Las poblaciones que pertenecen al clado I están distribuidas más hacia el noreste de Argentina y continúan su distribución hacia el sur de Brasil. Respecto al clado III, solapa su distribución tanto con el clado I como con el clado II, abarcando mayormente las provincias de Entre Ríos, Corrientes y Misiones. El clado II es el que se encuentra más hacia el oeste y sur de Argentina, donde los otros dos linajes no se detectaron.

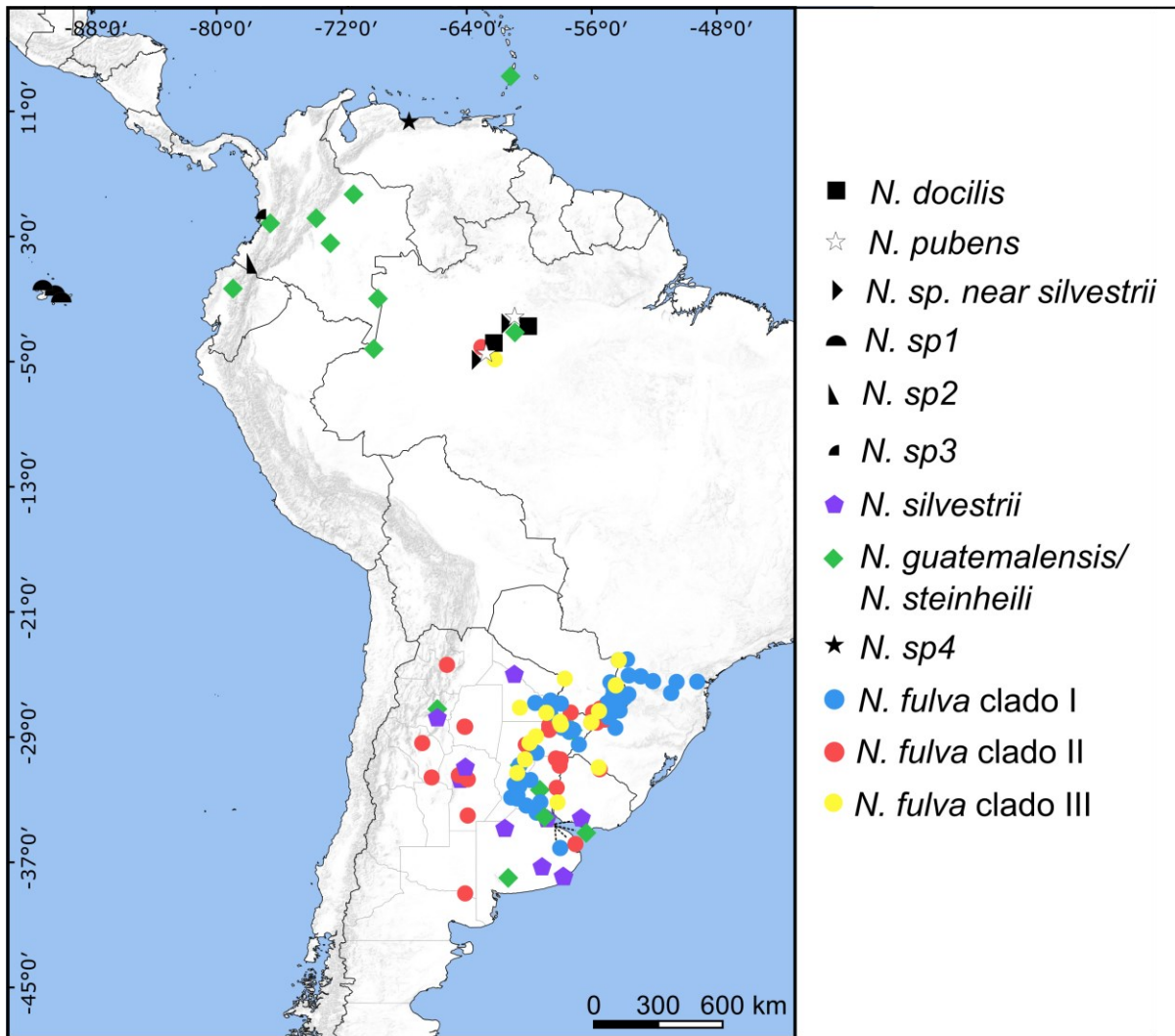


Figura 2.4. Ubicación geográfica de las morfoespecies de *Nylanderia* identificados para Sudamérica en este trabajo y tres linajes mitocondriales de *N. fulva* (clados I-III).

En el análisis filogenético realizado en base a los dos genes, y calibrado con un reloj molecular (Fig. 2.5), las relaciones entre géneros y grupos de especies reconocidos fueron estimadas con un soporte robusto; particularmente, el complejo *N. fulva/N. pubens*. Este complejo comparte un ancestro común más reciente con las demás *Nylanderia* hace 4,2 millones de años (ma). El género *Nylanderia* se recupera como monofilético y con un ancestro común hace 7 ma. *Nylanderia silvestrii* corresponde a un grupo parafilético, cuyo origen en común con *N. caerulea* se estimó en 2,9 ma. El ancestro común más reciente entre las poblaciones de *N. guatemalensis* de Argentina y las del Caribe habría ocurrido hace 1,27 ma.

El análisis de delimitación de especies ASAP, que utiliza un umbral de distancias genéticas, separó a las secuencias en 19 unidades, de las cuales cinco comprenden a todas las secuencias identificadas como *N. fulva* y a *N. pubens*, dos a *N. silvestrii* y seis a *N. guatemalensis/N. steinheili*. El método no identificó a las secuencias de *N. pubens* como una especie diferente.

Los análisis GMYC y bPTP resultaron en una estructuración de *N. fulva* en un total de 40 y 46 clústeres. El método GMYC incluyó a las muestras identificadas como *N. cf. pubens* NF248 y NF251a junto con otras secuencias identificadas como *N. pubens*, pero no a las muestras NF249 y NF236, que resultaron unidades independientes. Para la especie *N. fulva*, identificó al clado III como una especie, mientras que las secuencias de los clados I y II fueron incorporadas en doce grupos. El clado II fue separado en siete especies, y tres secuencias incluidas en un grupo que incluye a también a secuencias del clado I (NF053, NF062 y NF158). El clado I se separó en cinco grupos, uno de ellos incorpora la mayoría de las secuencias de poblaciones fuera del rango nativo (Ny054, Ny055, pubens02, pubens13, pubens22 y pubens23). Otra secuencia de una población introducida, Ny191 (Missisipi, EEUU), agrupó como una especie diferente, mientras que la secuencia Ny067 (Puerto Rico), agrupó junto a muchas otras secuencias nativas, de Argentina y Paraguay. Las secuencias identificadas como *N. silvestrii* fueron agrupadas en siete posibles especies. A pesar de la cercana relación filogenética con *N. caerulea*, ninguna fue incluida en la misma hipótesis de especie con ésta.

En los tres métodos empleados, se detectó que una de las secuencias obtenida de repositorios (*N. steinheili*, de St. Vincent), identificada como *N. steinheili*, agrupa con otras identificadas con *N. guatemalensis* y ningún método de delimitación las identificó como especies distintas. Las secuencias de muestras argentinas de *N. guatemalensis* agruparon de la misma manera con los tres métodos aplicados: NF029 y 079 se presentan como dos especies, y las restantes se agrupan como una tercera especie. Ninguna comparte el mismo grupo que las secuencias de *N. guatemalensis* de otros sitios en las Antillas (Ny104 y 093, St. Lucia y St. Vincent).

Según el método bPTP, *N. fulva* está formada por once especies, entre las cuales las siguientes se reconocen como especies únicas: NF262 (morfoespecie *N. cf. pubens*), NF074, NF201 y NF053. Este método también reconoce a las secuencias del clado III como una única especie, mientras que dos secuencias del clado II fueron incorporadas en un grupo que incluye a todo el clado I como una misma especie (NF266 y NF290). En el grupo que incluye a todas las secuencias del clado I, se incorporaron también todas las secuencias de poblaciones introducidas de *N. fulva*. Las secuencias identificadas como *N. pubens* se agruparon en tres especies, una representada por NF251a, otra por NF249 y las restantes en el tercer grupo (en este caso falta el dato para las muestras NF248 y NF236 de las que no se pudo amplificar el gen COI). En el caso de las muestras

que corresponden a la especie *N. silvestrii*, se identificaron prácticamente cada secuencia como una posible especie (13 secuencias y 10 posibles especies), y ninguna agrupó junto a *N. caerulea*. Las muestras identificadas como *N. guatemalensis* pertenecientes a Brasil, NF247, NF251b, NF257, formaron parte cada una de una especie distinta.

Las distancias genéticas (% de diferencias nucleotídicas) en base al fragmento de COI de 688pb se muestran en la Tabla 2.3. El valor de diferenciación global para un total de 114 secuencias fue de 19,44%, que incluye a las especies de *N. fulva*, *N. pubens*, *N. guatemalensis* y *N. silvestrii*.

Tabla 2.3. Porcentaje de variación de sustituciones nucleotídicas para las especies de *Nylanderia* del sur de Sudamérica en base al gen COI.

Especie (n)	<i>N. guatemalensis</i>	<i>N. pubens</i>	<i>N. silvestrii</i>	<i>N. fulva</i>	<i>N. fulva</i> clado I	<i>N. fulva</i> clado II	<i>N. fulva</i> clado III
<i>N. guatemalensis</i> (8)	2,97						
<i>N. pubens</i> (3)	8,61	0,00					
<i>N. silvestrii</i> (9)	5,94	4,23	0,50				
<i>N. fulva</i> (90)	8,46	2,67	4,53	1,64			
<i>N. fulva</i> clado I (43)	8,76	2,52	4,54		0,17		
<i>N. fulva</i> clado II (22)	9,27	3,30	4,84		3,03	1,74	
<i>N. fulva</i> clado III (13)	8,98	3,33	4,91		2,78	3,85	0,26

Discusión

Estimamos una filogenia para las especies de *Nylanderia* de la región sur de Sudamérica, empleando secuencias de ADN de un gen mitocondrial y uno nuclear. Como es usual, el gen mitocondrial estudiado (COI) presentó mayor variabilidad que el gen nuclear (*wnt*), evidenciado en un árbol filogenético con mayor cantidad linajes monofiléticos estimados respecto del gen nuclear. En la filogenia estimada con COI, se identifican linajes recíprocamente monofiléticos dentro de los límites de la especie *N. fulva*, mientras que esa estructuración no se recupera en el árbol filogenético realizado con el gen *wnt*. Dos de los métodos de delimitación de especies aplicados (GMYC y bPTP) recuperan esta división con algunas diferencias (mayor estructuración), a la vez que proponen varias unidades taxonómicas para las secuencias del grupo *N. guatemalensis/N. steinheili* y las de *N. silvestrii*. Sin embargo, estas posibles unidades taxonómicas no fueron diferenciadas con el análisis morfológico preliminar ni a campo.

Incorporamos a las secuencias disponibles una gran cantidad de ejemplares del género *Nylanderia* en una región muy poco relevada, en el sur de Sudamérica, y en el estado de Amazonas,

en Brasil. Se recuperó la monofilia del género, como se ha observado en los últimos estudios filgenéticos del grupo y, en particular, también se estimó a *N. fulva* como una especie monofilética, hermana a *N. pubens*. Reconocemos al grupo de especímenes colectados en Argentina como *N. guatemalensis* o en su defecto, una especie que pertenece al mismo complejo.

Estos resultados constituyen una primera aproximación a desentrañar las relaciones y delimitar las especies de los complejos de especies presentes en el sur de Sudamérica y potenciales nuevos complejos que surgen de este trabajo. Resulta interesante continuar explorando la hipótesis de especies reflejada por los métodos de delimitación con otras fuentes de información de relevancia para la biología de la especie. Es posible que *N. fulva* presente estructuración geográfica de sus poblaciones, según la distribución observada de los linajes que la conforman, y ello tenga influencia en un proceso de especiación actual o reciente en la especie.

Si se tiene en cuenta que algunas de estas especies aun cuentan con subespecies válidas, una pregunta a responder es si la estructuración genética observada podría correlacionarse con esos *taxa*. Se cuenta con algunos registros para las subespecies de *N. fulva*; por ejemplo, *N. fulva fumatipennis* se menciona para la provincia de Salta en Argentina y en el estado de Santa Catarina en Brasil (Forel, 1915; Kempf, 1972), pero esa distribución disyunta no coincide con los grupos delimitados en este trabajo, por lo que no se puede concluir en base a ese aspecto. En el caso de la otra especie nativa de Argentina, *N. silvestrii*, se reconoce actualmente la subespecie *N. silvestrii kuenzleri*. Los especímenes incluidos en este trabajo mostraron una estructuración en al menos dos linajes de acuerdo a la filogenia de ambos genes, uno de los cuales resultó hermano a la especie *N. caerulea*, de República Dominicana, cuyo origen evolutivo es en el Neotrópico (Lapolla & Kallal, 2019). Los análisis de delimitación bPTP y GMYC, por otro lado, sugieren una estructuración mayor, separando para muchos casos cada secuencia/especimen en una especie diferente, concordando en cierto punto con la hipótesis de que existe alguna estructuración dentro de esta especie. La distribución conocida para *N. silvestrii silvestrii* es la región centro-norte de Argentina, mientras que para la subespecie *N. silvestrii kuenzleri* se conocen registros únicamente para la región centro-este (Santa Fé y Buenos Aires, Fig. 1.2). Uno de los linajes de *N. silvestrii* estimados en la filogenia de este trabajo incluye cuatro especímenes, procedentes de las provincias de Tucumán, Córdoba y Buenos Aires. El otro linaje, hermano a *N. caerulea*, agrupa especímenes de Buenos Aires, Chaco, Catamarca y Córdoba. Entonces, la distribución de los linajes nuevamente no aporta información suficiente para explicar la delimitación de las subespecies de este grupo. La cercana relación con la especie *N. caerulea* es llama la atención, por un lado, porque *N. esperanza*, que es una especie que pertenece a un grupo de especies hermanas todas con origen en la zona del Caribe, agrupa más distantemente

que *N. caerulea*, cuando en las filogenias estimadas actualmente resulta la especie hermana a *N. caerulea* (Williams et al., 2020, 2022). En base a estos grupos que se delimitan a partir del ADN, en un próximo trabajo se inspeccionará en mayor detalle la morfología y se comparará material tipo de las subespecies de *N. silvestrii* con el fin de hallar si esos linajes o hipótesis de especie presentan diferencias morfológicas correspondientes a las subespecies descritas o a potenciales diferentes especies.

Los patrones observados en la filogenia de las especies, con linajes recíprocamente monofiléticos dentro de las especies, así como la agrupación obtenida con los métodos de delimitación, en donde muchos ejemplares son estimados como diferentes especies, podrían deberse a una organización en metapoblaciones, sobre todo al basarse en marcadores mitocondriales que tienen alta tasa de sustitución. Por ejemplo, el método ASAP tiene como supuesto que la variabilidad intraespecífica es menor que la interespecífica (Puillandre et al., 2021). Según el concepto unificado de especies, estas se definen como metapoblaciones que evolucionan como linajes independientes, que divergen adquiriendo ciertas características con el tiempo (De Queiroz, 2007); simplemente si uno toma una muestra en un tiempo determinado, puede encontrarse en una diferente etapa en este proceso de divergencia y observar patrones distintos de diversificación en esas características. Es por esto que la elección de la mejor hipótesis de delimitación de especies debe descansar en la evidencia de más de un tipo de información, ya que solo podemos hacer una observación puntual respecto de los tiempos de evolución de las especies.

El desarrollo de técnicas de enriquecimiento de ciertas zonas del genoma utilizando secuenciación masiva ha sido de mucha utilidad, en particular, para el estudio de filogenias en hormigas. En 2017, Branstetter y cols. publicaron la primer librería de marcadores UCEs desarrollada específicamente para hormigas (Branstetter et al., 2017), que fue aplicada en diversos estudios de delimitación de especies y filogenias. Por ser un tipo de secuenciación masiva del genoma, los UCEs tienen el potencial de aportar una cantidad de información genética mucho mayor a la que se obtiene seleccionando unos pocos marcadores genéticos individuales (secuenciación por el método Sanger). Se ha mencionado recientemente que estos complejos de especies en *Nylanderia*, por su alta variabilidad intraespecífica, su amplia distribución y la baja diferenciación entre especies cercanas, presentan un reto para la delimitación de especies basada en datos moleculares (Williams et al., 2022). En ese trabajo, los autores realizaron una delimitación de especies utilizando *loci* UCE, y listan al menos unas cuatro especies dentro del complejo *N. fulva*; los métodos de delimitación aplicados también resultaron en una sobre-división de los grupos tanto cuando aplicaron únicamente el fragmento COI como con el set completo de *loci* UCE. Esto demuestra que la

variabilidad intraespecífica captada con el marcador mitocondrial podría reflejar un nivel de variación que replica el de todo el genoma. Lamentablemente, ese trabajo tampoco incluye poblaciones de todo el rango nativo de la especie, sino que tienen un muestreo enfocado hacia la región Caribe de América y los EEUU, con lo que las hipótesis de especie que concluyen, cuentan solo una parte de la complejidad de este grupo. Un patrón inverso se observó en el complejo de especies *N. guatemalensis*/*N. steinheili*, que son dos especies muy similares morfológicamente, pero que en base a la delimitación con *loci* UCE, no se recuperaron como especies hermanas. Este complejo de especies está formado por, al menos: *N. guatemalensis*, *N. steinheili*, N. JKW1, N. sp. FG01, N. sp. FG02 N. sp. FG03, N. sp. FG07, N. sp. Ven4, N. sp. Bra1, and N. sp. Per3/Col2. En este trabajo, se incluyeron cinco de esas especies (*N. guatemalensis*, *N. steinheili*, N. JKW1, N. sp. Per3/Col2 y N. sp. FG07) que se estimaron como especies diferentes con los métodos aplicados, pero que no fueron resueltas de la misma manera en la filogenia. De esta manera, si bien las relaciones filogenéticas no se recuperaron de la misma manera utilizando dos genes, sí se obtuvo la misma hipótesis de especies. Otro trabajo que delimita complejos de especies en el género de hormigas *Temnothorax*, utilizando UCEs y ADN mitocondrial (13 genes), encuentra también congruencia en los resultados de la delimitación utilizando ambos marcadores (Prebus, 2021).

En ese trabajo (Williams et al., 2022), los autores lograron incluir una muestra del mismo sitio en donde se colectó la especie *N. pubens* que fue estudiada en el trabajo de Gotzek y cols. (2012), primer trabajo donde se encontró la diferencia entre esa especie y *N. fulva*. Incorporando esa secuencia en la filogenia y delimitación de especies realizadas en esta tesis, se pudo comprobar que algunos especímenes de Brasil que fueron diagnosticados como *N. cf. pubens* de acuerdo a su morfología, podrían ser efectivamente esta especie (NF248, NF251a). A pesar de que esa hipótesis solo pudo ser puesta a prueba con uno de los métodos (GMYC), en el que fueron incluidas en especies diferentes a otras *N. pubens*, teniendo en cuenta que en la filogenia agruparon dentro del linaje de *N. pubens* con alto soporte, y que en su especie hermana, *N. fulva*, esta misma variabilidad es considerada aún intraespecífica, estas muestras entonces se consideran parte de la especie *N. pubens*. La fuente de las diferencias halladas entre esas secuencias podría relacionarse con que las poblaciones de origen de las mismas son de regiones geográficas muy distantes, como ser el Caribe y las Antillas respecto de Brasil.

Entre los distintos métodos de delimitación aplicados, el método basado en distancias genéticas (ASAP) puede considerarse el menos robusto, debido a que no recuperó como especie diferente a *N. pubens*, lo cual es ampliamente reconocido en los trabajos filogenéticos y de delimitación existentes (Gotzek et al., 2012; Williams et al., 2022). Además, esta metodología estimó

que especímenes de morfología muy diferente también pertenecen al grupo que incluye *N. fulva* y *N. pubens* (NF257 –identificada como *N. guatemalensis*-, *N. lucayana*, entre otras). Estos resultados son consistentes con lo hallado en estudios empíricos que ponen a prueba diferentes métodos de delimitación molecular de especies de insectos, y que evidencian que el método ABGD (versión anterior del ASAP) subdivide mientras que el método GMYC sobredivide a las especies (Luo et al., 2018), pero que la concordancia con la delimitación taxonómica del mismo set de datos, puede variar dependiendo del caso de estudio (Schwarzfeld & Sperling, 2015). Por otro lado, es importante destacar que el método GMYC estimó las hipótesis de especies utilizando información de los dos genes en estudio (COI y wnt), mientras que el método bPTP se basa solamente en el gen COI, aunque utilizan diferentes algoritmos de delimitación, el primero basándose en el tiempo de divergencia, mientras que el segundo se basa en las sustituciones nucleotídicas. Entonces, se considerarán tanto el método bPTP como el GMYC como hipótesis de delimitación de especie igualmente válidas, ya que los resultados de ambos fueron muy similares, y no se cuenta al momento con información adicional que permita favorecer una de las dos hipótesis.

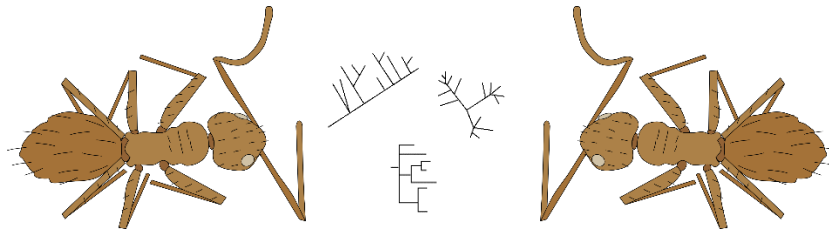
En base a los resultados presentados y lo expuesto, sugerimos que: se considere a *N. silvestrii* como un posible complejo de especies, potencialmente incluyendo a *N. caerulea*, o que los linajes encontrados sean diagnosticados a nivel de subespecie si así lo determinara un análisis morfológico más minucioso; se incorpora una posible nueva especie al complejo *N. guatemalensis/N. steinheili*, diferente a las anteriormente descritas (genéticamente) en las delimitaciones de especies, presente en Argentina; y la incorporación de tres nuevas posibles especies al complejo *N. fulva/N. pubens* (con únicos representantes, NF262, NF248 y NF251a, de Amazonas, Brasil). Estas hipótesis de especies deben ponerse a prueba utilizando o bien marcadores moleculares de mayor representación, como los UCEs, o mediante estudios morfológicos o morfométricos; además, una evaluación de las descripciones de las especies sudamericanas de *Nylanderia* así como de ejemplares tipo y depositados en colecciones biológicas es fundamental para poder informar mejor a la decisión acerca de esas hipótesis. Resulta interesante el registro de los ejemplares identificados morfológicamente como *N. cf. pubens*, que además agruparon dentro del linaje de *N. pubens*, que fueron colectados en Brasil, debido a que esta especie se considera originaria del Caribe. Estos registros podrían ser poblaciones invasoras en ese país, o bien ser la primera evidencia de que *N. pubens* tendría un origen Sudamericano compartido con *N. fulva*, lo que podría explicar la estrecha relación filogenética y morfológica entre esas especies.

En este trabajo se buscó representar la mayor parte posible del rango nativo de *N. fulva* con el fin de explorar la mayor variabilidad existente en sus poblaciones, pero aún queda por conocer

los límites precisos de su distribución, y entonces, de su variabilidad hacia el norte de su distribución, fundamentalmente en Brasil, para poder entender y seleccionar la mejor hipótesis de delimitación de especies. En los próximos capítulos se estudiarán una serie de fuentes de información que permitan entender mejor la historia evolutiva de este grupo de especies e informar sobre la delimitación de las mismas.

Capítulo 3: Estructuración poblacional y filogeografía de *Nylanderia*

fulva



Introducción

Las especies con una amplia distribución geográfica usualmente presentan estructuración de sus poblaciones. En el amplio muestreo realizado sobre *N. fulva* se encontró que ésta se distribuye desde Río Negro en Argentina hasta el Amazonas en Brasil. Este gran área de distribución abarca climas y paisajes muy variados, con lo cual, se esperaría que exista alguna diferenciación de las poblaciones de la especie a lo largo de algún gradiente, o incluso la existencia de una o más barreras geográficas que influyen sobre el flujo génico entre poblaciones.

En una primera aproximación a estudiar la diversidad de especies del género *Nylanderia*, en el capítulo anterior de este trabajo, se descubrió la diversidad genética del fragmento del gen COI. Este presenta gran variabilidad y, al aplicar algoritmos de delimitación de especies, permitiría separar a *N. fulva* en más de una unidad evolutiva independiente (o hipótesis de especie) y a su vez este único marcador muestra suficiente resolución para separarla de la especie críptica *N. pubens*. Se observó que dentro de *N. fulva* hay una divergencia de 1,6%, mientras que cuando se consideran a los clados I-III por separado se obtiene una divergencia de 0,2-1,7% dentro y de 2,8-3,9% entre los linajes (Tabla 2.x). A su vez, la divergencia entre las especies hermanas, *N. fulva* y *N. pubens* fue de 2,7%. Estos resultados sugieren que o bien las poblaciones de *N. fulva* presentan un nivel de estructuración elevado en sus poblaciones, consistiendo de al menos tres linajes que mantienen algún grado de aislamiento entre sí, o estos linajes podrían considerarse unidades evolutivas independientes, por lo tanto, especies diferentes. Según los algoritmos de delimitación, este número podría elevarse a más especies. Sin embargo, no se encontró la misma diferenciación para el gen nuclear estudiado, ya que incluso agrupa a *N. fulva* y *N. pubens* como una misma especie. En

este capítulo se estudia en mayor profundidad la estructuración poblacional de *N. fulva* que permite hacer una mejor evaluación entre las dos posibles hipótesis planteadas.

La filogeografía estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes genealógicos, especialmente los linajes dentro y entre especies cercanamente relacionadas (Avice, 2000). Un análisis filogeográfico pretende hallar una relación entre la disposición geográfica de las variantes genéticas y su relación genealógica. Históricamente, el marcador de ADN ideal para realizar este tipo de estudios fue el ADN mitocondrial. Las cualidades de este marcador que lo hacen idóneo para estudios filogeográficos son su alta tasa de sustitución nucleotídica, que posee prácticamente nula recombinación, su gran variación intraespecífica y su herencia estrictamente materna (Rentarúa, 2007). Este tipo de estudios puede realizarse utilizando herramientas basadas en la teoría de la coalescencia, que permite trazar caracteres ancestrales (por ejemplo, coordenadas geográficas) en una ancestría.

En el contexto del estudio de especies invasoras, los análisis filogeográficos aportan significativamente a estimar posibles áreas de origen de variantes genéticas de interés, por ejemplo, haplotipos invasores, y también potenciales puntos de introducción y rutas de expansión de poblaciones en las áreas invadidas. Se ha sugerido que en los EEUU, los posibles puertos de entrada de las poblaciones de *Nylanderia fulva* fueran el Puerto de Houston, Mobile, Jacksonville y Savannah (Williams & Lucky, 2020), los puertos más importantes de la región sur de los EEUU. Por otro lado, un estudio sobre la estructuración poblacional de colonias introducidas en los EEUU encontró que no hay diferenciación genética entre colonias de *N. fulva* ubicadas a grandes distancias geográficas en el sur de ese país (Eyer et al., 2018). Este hallazgo pone en evidencia dos posibles escenarios sobre la invasión de *N. fulva*: o bien hubo una única introducción que fue luego propagada hacia los demás sitios o, si ocurrió más de una introducción, estas podrían proceder de un mismo genotipo. Conocer el escenario más probable de la introducción de una especie invasora aporta información de utilidad para desarrollar estrategias de prevención de nuevas introducciones.

En este capítulo se emplea una serie de análisis que permiten describir los patrones de diversidad de la especie *N. fulva* y su distribución geográfica, para reconstruir la historia evolutiva de la especie. Estos resultados brindarían información relevante que complementa a las hipótesis de delimitación de especies propuestas anteriormente.

Los objetivos e hipótesis de trabajo fueron:

4. Hallar las posibles poblaciones fuente de introducción de *N. fulva* en los EEUU.

Hipótesis 4. La población fuente de la introducción de *N. fulva* en los EEUU se encuentra cercana a alguno de los principales puertos de la cuenca del Río de La Plata.

5. Estimar la estructura poblacional e historia evolutiva de *N. fulva* en su rango nativo.

Metodología

Se realizaron una serie de análisis descriptivos y estadísticos que permiten estudiar y visualizar la variabilidad intra- e interespecífica de las especies, que se describen a continuación:

Diversidad

Se generó una lista de haplotipos basados en el fragmento del gen COI en el programa DnaSP v.6 (Rozas et al., 2017). Utilizando los paquetes para QGIS “Point Sampling Tool” y “TomBio” se graficó una grilla de 1 x 1 grados sobre el mapa de la región en estudio y se calculó un mapa de calor correspondiente al número de haplotipos diferentes en cada celda.

Se calcularon, además, estadísticos y valores relacionados a la variabilidad de los marcadores usados, COI y wnt. Se realizaron pruebas de neutralidad para los datos agregados en tres clados, y de diferenciación genética en base a cada gen, que permiten evidenciar señales de eventos demográficos: D de Tajima (Tajima, 1989), F de Fu (Fu, 1993) y R2 de Ramos-Onsins y Rozas (Ramos-Onsins & Rozas, 2002); y se significaron con 1000 simulaciones basadas en la teoría de la coalescencia. El estadístico D de Tajima prueba el ajuste de los datos a lo esperado según una distribución neutral de la frecuencia de cada sitio y comprende valores negativos, cuando hay un exceso de variantes de baja frecuencia, indicando barrido selectivo o cuellos de botella, o valores positivos, cuando hay un exceso de variantes de frecuencias intermedias, indicando una reducción en la población o selección balanceadora.

AMOVA

A partir de las secuencias de COI se realizó un análisis molecular de la varianza (AMOVA) utilizando el paquete poppr en R, seguido de un test de randomización con 100 permutaciones para el cálculo del p valor. Este análisis utiliza las distancias pareadas entre las secuencias de ADN como

medida de la variabilidad, y permite compararla entre individuos, subpoblaciones y poblaciones (es decir, dos niveles de agregación). Se seleccionaron cuatro hipótesis de agrupamiento de los individuos en poblaciones y subpoblaciones, detalladas en la Tabla 3.1. Debido a que se analizaron las muestras bajo estas cuatro hipótesis alternativas, se utilizó un umbral de significación estadística corregido por la falta de independencia ($p_{\text{Bonferroni}}=0,0125$). Las variables utilizadas para clasificar a las muestras fueron las ecorregiones (ver Fig. 1.3) y provincias biogeográficas (Fig. 3.1)

Tabla 3.1. Hipótesis de estructuración de las poblaciones de *N. fulva* puestas a prueba con un análisis molecular de la varianza (AMOVA). ¹ Olson et al., 2001. ² Löwenberg-Neto, 2014.

Hipótesis	Subpoblaciones	Poblaciones
1	Ecorregiones ¹	Clados de la filogenia (I, II y III)
2	Polígono de 100 km	Ecorregiones ¹
3	Polígono de 100 km	Provincias biogeográficas ²
4	Polígono de 100 km	Clados de la filogenia (I, II y III)

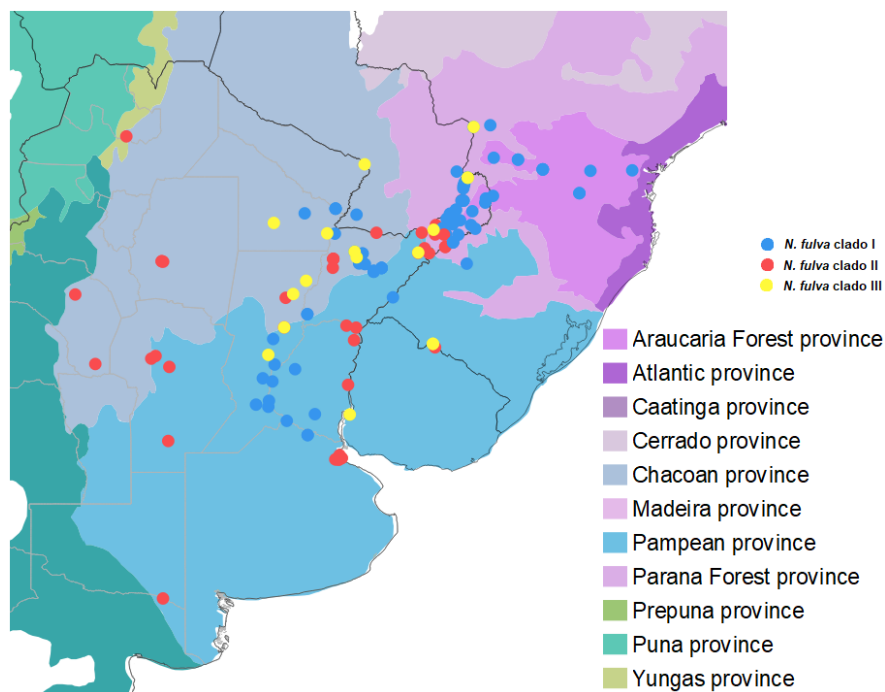


Figura 3.1. Clasificación de los nidos de *N. fulva* en provincias biogeográficas (Löwenberg-Neto, 2014). El color de las muestras indica el clado mitocondrial de pertenencia.

Aislamiento por distancia

El aislamiento por distancia es la mayor similitud genética entre individuos cercanos geográficamente que entre aquellos más distanciados (Wright, 1943). Esta relación se exploró

mediante un test de Mantel, que describe la correlación entre la matriz de distancias genéticas (calculadas según el modelo TN93 -Tamura y Nei, 1993-) y las distancias geográficas. También se analizó la regresión lineal entre ambas medidas de distancia. Ambos test se realizaron en R.

Microsatélites

Los microsatélites son secuencias simples repetidas (SSR) en el genoma, de menos de 10 nucleótidos de longitud. Estos marcadores tienen una tasa relativamente alta de sustitución, permiten distinguir entre individuos homocigotas y heterocigotas (son marcadores codominantes) y son apropiados para inferir eventos recientes en la historia evolutiva de una especie, no así para inferir la historia evolutiva más antigua como otros marcadores nucleares (Rentarías, 2007). Se recurrió a un servicio externo, brindado por el Departamento de Entomología de la Universidad de Texas A&M, para procesar y secuenciar 13 *loci* microsatélite diseñados para *Nylanderia* (Eyer et al., 2018). Se seleccionaron 12 muestras de nidos del rango nativo de *N. fulva* (Argentina y Uruguay), cada una consistió de 1-18 obreras, para un total de 178 individuos genotipados. El ADN fue extraído utilizando el kit Genra Puregene (Genra Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA), luego se realizaron PCR multiplex, secuenciadas utilizando un secuenciador ABI 3500 y procesadas en Geneious v.9.1 (Kearse et al., 2012) y CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA).

Se utilizó el software STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) para asignar individuos a clústeres en base a su genotipo. Se seleccionó un set de 30 valores de k (1-30), que fueron estimados por triplicado mediante 200.000 generaciones MCMC, descartando el 10% como *burn-in*, bajo un modelo de admixture y frecuencias alélicas correlacionadas. La selección de/los valores de k (número de clústeres) más probable se realizó utilizando diferentes criterios. Por un lado, en el servidor StructureHarvester (<https://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>), que permite evaluar el mejor valor de k de acuerdo al Δk de Evanno (Evanno et al., 2005), la metodología más usada en la literatura. También mediante la función `find.clusters` del paquete `adegenet`, que implementa el algoritmo de k -means para seleccionar el valor de k más probable bajo el criterio BIC. Por último, debido a que el tamaño de las muestras fue desparejo, se empleó una serie de algoritmos que penalizan ese error y devuelven un valor más probable de k disponible en el servidor StructureSelector (<https://lmme.ac.cn/StructureSelector/>). Este set de estimadores presenta resultados más robustos tanto para muestras con y sin diferencias de muestreo, evitando los problemas del método usualmente empleado (Δk de Evanno): poblaciones diferentes con bajo muestreo tienden a ser agrupadas mientras que individuos de poblaciones ampliamente

muestreadas se suelen separar a pesar de formar parte de una población panmíctica (Puechmaille, 2016).

Con el complemento GenAEx 6.51b2 (Peakall & Smouse, 2006, 2012) se calcularon los estadísticos F_{st} (índice de fijación), N_m (número de migrantes por generación) y se realizó un análisis molecular de la varianza (amova) utilizando las poblaciones asignadas originalmente (=individuos de un mismo nido) y agrupando a los individuos según los clados mitocondriales hallados en este trabajo (clados I-III de *N. fulva*), con 999 permutaciones.

Red de haplotipos del gen COI

Las redes de haplotipos permiten analizar y visualizar gráficamente las relaciones de las secuencias de ADN entre poblaciones o regiones geográficas, y permiten evaluar la historia evolutiva reciente de los linajes y/o especies en estudio.

Se realizó una red de haplotipos basada en las secuencias del gen COI utilizando el software PopART 1.7 (Leigh & Bryant, 2015), que implementa el método de Median-Joining. Se eligió agrupar a las secuencias según su pertenencia a poblaciones estimadas a priori.

Filogeografía Bayesiana Continua

Se realizó un análisis filogeográfico continuo utilizando el paquete `geo_sphere` implementado en BEAST v2.6 (Bouckaert et al., 2019) a partir de las secuencias de COI, que se proyectó geográficamente y se visualizó con el servidor SPREAD v4 (<https://spreadviz.org/>). La matriz de datos utilizada contiene las secuencias del territorio nativo identificadas dentro del complejo *N. fulva*, sin incluir a *N. pubens*, separadas por al menos 50 km (N=94). Se seleccionaron los siguientes parámetros para el análisis: modelo de evolución molecular HKY+I; reloj molecular estricto para la matriz COI con distribución log-normal, media 0.01455 y desvío 0.00125, seleccionado la opción media en el espacio real; reloj molecular relajado log-normal para la partición de datos geográficos; tasa de nacimiento-mortalidad (λ) del modelo de especiación de Yule con distribución log-normal con media 2, seleccionando que sea estimada, y desvío de 0.1, seleccionando la opción media en el espacio real; 300 millones de generaciones MCMC muestreando cada 2000 estados.. Para evaluar la convergencia de los parámetros del modelo se utilizó el programa Tracer, en donde se verificó que los valores de ESS (tamaño efectivo de la

muestra) sean mayores a 200. En el caso de los parámetros prior, verosimilitud del árbol, reloj molecular de la partición geográfica, los valores de ESS fueron menores a 200 y mayores a 100.

Resultados

ADN mitocondrial

Los estadísticos que estiman la diversidad y ponen a prueba la desviación de la neutralidad se resumen en la Tabla 3.2. Debido a que en la filogenia estimada en el capítulo anterior se observa una estructuración en linajes monofiléticos y que en uno de ellos se observa un patrón concordante con una posible expansión poblacional (exceso de mutaciones de baja frecuencia, evidenciado por ramas cortas), se realizaron pruebas que permiten comprobar la desviación de los supuestos de neutralidad (población constante, panmixia). Se rechaza la hipótesis nula de neutralidad para los clados I y III, que presentaron valores de los estadísticos de neutralidad concordantes con una expansión poblacional o un barrido selectivo.

Tabla 3.2. Estadísticos de diversidad y pruebas de neutralidad para *N. fulva* basados en el fragmento mitocondrial (COI).

Estadístico	Matriz completa	Clado I	Clado III	Clado II
N	125	68	18	37
Número total de sitios excluyendo datos faltantes y gaps	685	686	688	686
D de Tajima	-0,021 (p=0,60)	-2,374 (p=0,000)	-1,785 (p=0,016)	0,049 (p=0,572)
F de Fu	-8,108 (p=0,90)	-12,082 (p=0,006)	-4,611 (p=0,001)	-2,728 (p=0,193)
R2	0,090 (p=0,55)	0,065 (p=0,099)	0,114 (p=0,544)	0,073 (p=0,000)
Número de sitios polimórficos (S)	80	37	11	49
Promedio de diferencias nucleotídicas (k)	14,712	2,080	1,634	11,899
Diversidad nucleotídica (π)	0,022	0,003	0,002	0,017
Número/Diversidad de haplotipos	50/0,903	20/0,728	9/0,824	22/0,953

Cuando se utilizó el agrupamiento de los individuos siguiendo la estructura de los clados mitocondriales en base a los datos de COI, el F_{st} obtenido fue de 0,770 y para el gen nuclear *wnt*, -0,009. Estos valores indican, para el caso del gen nuclear, que no existe estructuración genética

explicada por los clados, mientras que en el caso del gen COI, el valor de F_{st} cercano a uno indica que existe estructuración o subdivisión en poblaciones (agrupadas en clados). Similarmente, la prueba de X^2 indicó que no existe diferenciación genética cuando se utilizó el marcador *wnt* (X^2 10,085, $p=0,259$) y que hay estructuración genética al utilizar el marcador COI (X^2 234,396, $p=0,000$).

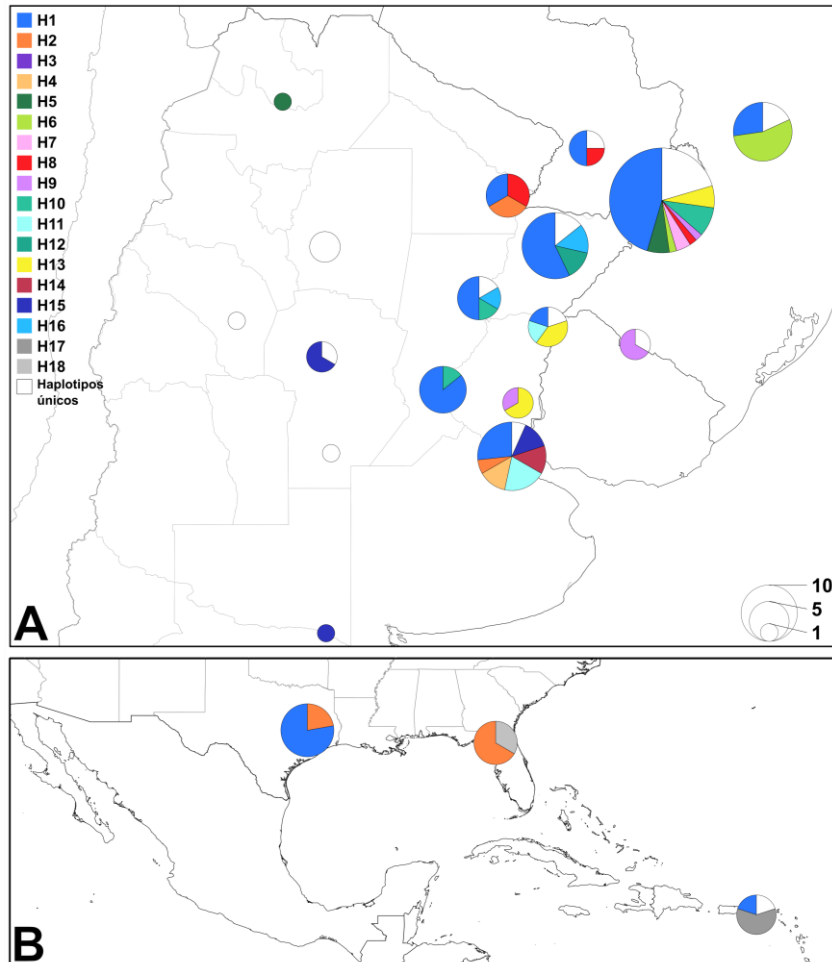


Figura 3.2. Distribución de los haplotipos mitocondriales de *N. fulva* en A: el rango nativo y B: EEUU. El tamaño de los círculos es proporcional al número de muestras.

Microsatélites

Se obtuvieron un total de 144 alelos para los 13 *loci* secuenciados, variando entre 5 (*locus* 3) y 19 (*locus* 11). En general, los *loci* presentaron un 89,9% de polimorfismo y la mayoría de las poblaciones (11) presentaron 1-5 alelos privados. El número de migrantes (N_m) fue estimado en $0,488 \pm 0,051$, mientras que el F_{st} global varió entre $0,0097 \pm 0,133$ y $-0,714 \pm 0,057$ dependiendo del *locus*, siendo el promedio de los *loci* $0,241 \pm 0,028$. Se observó un valor mayor de heterocigotas respecto a lo esperado para todas las poblaciones. El amova indicó que la variabilidad dentro de los individuos representa un 68% de la variabilidad total, mientras que el restante 32% lo ocupa la

variabilidad entre poblaciones. Cuando se agruparon los individuos siguiendo la estructuración encontrada en el gen mitocondrial COI (clados I, II y III de *N. fulva*), el amova detectó que la variabilidad total fue explicada en un 74% por la variación dentro de los individuos, en un 19% por las diferencias entre individuos y en un 6% por la separación en clados. El número de migrantes entre clados fue estimado en $5,205 \pm 0,610$ y el F_{st} global en $0,053 \pm 0,005$, con todos los *loci* presentando valores de F_{st} positivos y cercanos a cero. La heterocigosidad observada fue menor que la esperada en los tres clados. De acuerdo a estos resultados, cuando se agrupan a los individuos teniendo en cuenta los linajes mitocondriales, se encuentra muy baja estructuración (F_{st} cercano a cero) y una estimación de 5,2 migrantes por generación, mientras que, si se dividen a los individuos por poblaciones (=nidos, en su mayoría separados por más de 100 km), se encuentra un nivel de estructuración ligeramente mayor ($F_{st}=0,241$) y bajo número de migrantes entre poblaciones. El análisis de AMOVA, similarmente, sugiere que hay estructuración en poblaciones pero no en los tres clados.

El resultado del análisis realizado en STRUCTURE fue analizado utilizando diferentes criterios para seleccionar el número óptimo de clústeres (Tabla 3.3, gráficos de cada estimador en el anexo A3.1-3). El número óptimo de clústeres fue de 2, según el método de Δk , mientras que los otros métodos estimaron 8-13 clústeres. Se selecciona el valor de $k=13$ como el óptimo, teniendo en cuenta que el muestreo fue desparejo, que los estimadores de Puechmaille (2016) tienen en cuenta ese factor, y que los estadísticos que infieren estructuración poblacional sugieren que las poblaciones en estudio ($n=16$) tienen cierto grado de diferenciación.

Tabla 3.3. Valor óptimo de clústeres (k) para los *loci* microsatélite según los métodos de selección utilizados.

Metodología aplicada	Valor de k óptimo
Δk de Evanno	$k=2$
BIC	$k=8-10$
Puechmaille, 2016	$k=13$ y $k=14$

El número de grupos estimado ($k=13$) resulta en una agrupación que prácticamente diferencia a cada nido como una unidad panmíctica independiente ($n=23$), con algunos casos puntuales donde se evidencia un porcentaje bajo de mezcla (NF022, NF021, NF012, NF007, ColPel). Estos nidos en donde al menos algunas obreras, sino todas, presentan un grado de mezcla, se estimaron como unidades reproductivas independientes, se ubican a distancias geográficas de hasta casi 400 kilómetros. Esto podría ser un indicador de que esos nidos forman parte de una supercolonia. Estos nidos, además, evidencian que el genoma nuclear, representado por los *loci*

microsatélite, presenta señales de mezcla entre los linajes mitocondriales, por ejemplo: NF007 (clado III) cuyos individuos presentan un porcentaje de mezcla con los nidos NF012+NF006+NF003 (clado I).

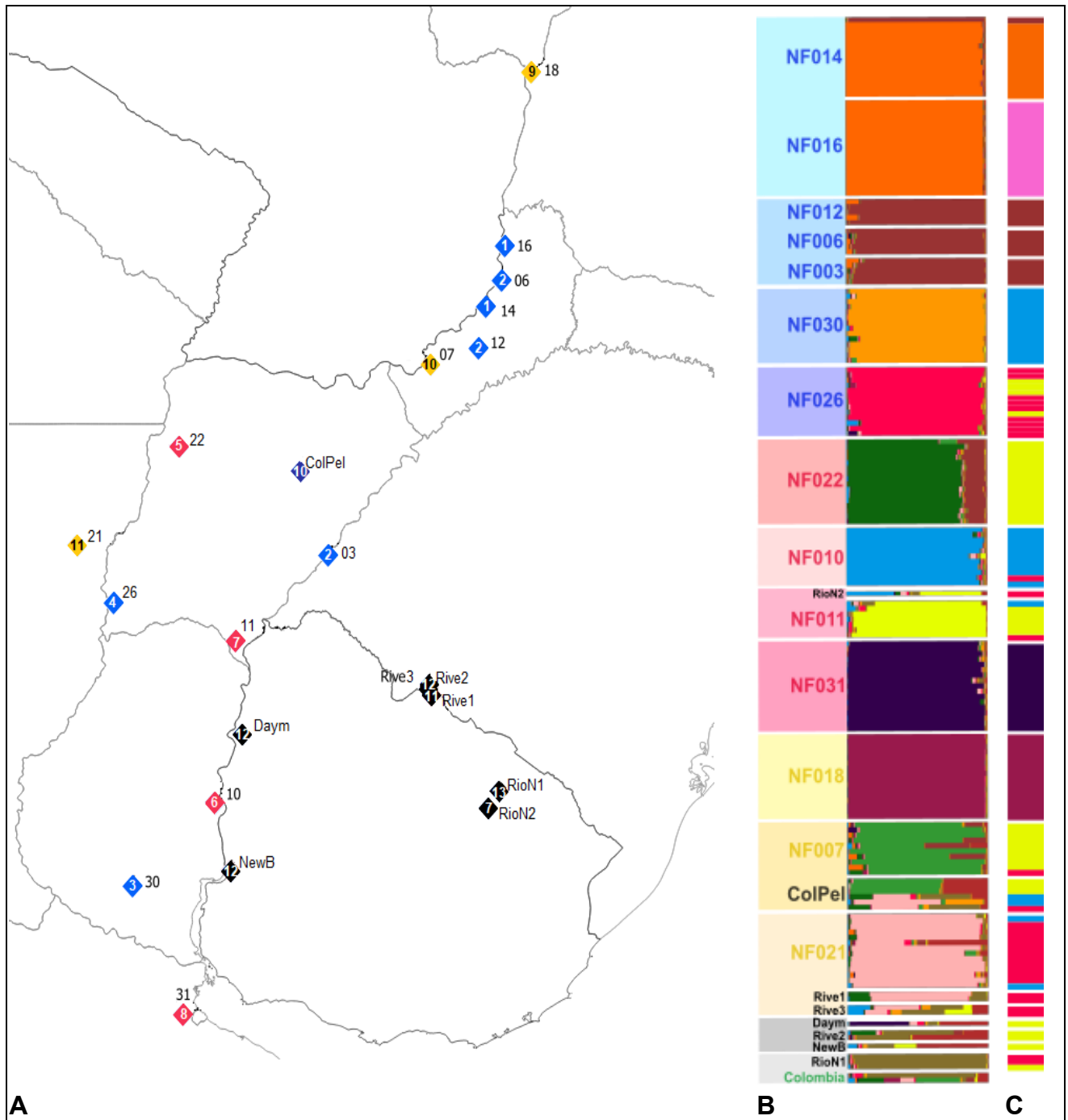


Figura 3.3. A, ubicación geográfica de las poblaciones de *N. fulva* estudiadas con *loci* microsatélite. B, agrupación de los individuos en 13 clústeres (análisis con STRUCTURE). C, agrupación en 8 clústeres (*k-means*). Las barras horizontales representan individuos e indican la proporción de mezcla genética. Los recuadros sobre los nombres de las poblaciones indican cada clúster de STRUCTURE. El color de los símbolos en (A) y las etiquetas de las poblaciones en (B) corresponden a linajes mitocondriales (clados I-III).

Red de haplotipos

Se observó un haplotipo muy frecuente (H1) ubicado en un extremo de la red, y no se presentó ningún haplotipo central (Fig. 3.4). Los haplotipos se distribuyeron en grupos, dos de ellos bien diferenciados y correspondientes a los previamente denominados clado I y III en la filogenia mitocondrial, y un tercer grupo de haplotipos, que en su conjunto se denominaron clado II en la filogenia, pero que en la red se evidencia una mayor diversidad respecto de los otros grupos. Si bien no observamos un haplotipo central, el H1, por estar presente en numerosas poblaciones, ampliamente distribuido y presentar un patrón estrellado, es decir, con muchas conexiones con otros haplotipos, podría considerarse como el grupo más antiguo de la red. Los grupos de haplotipos más cercanamente relacionados, los haplotipos más similares, se encontraron ocupando sitios cercanos entre sí. Esto podría relacionarse con una expansión poblacional reciente, con nuevos haplotipos surgiendo a la par que ocurre la dispersión, pero que todavía no se han fijado debido a que no ha transcurrido el suficiente tiempo. El haplotipo ubicado en Amazonas, Brasil, se presenta como un haplotipo único distantemente relacionado con todas las demás *N. fulva*; está más cercanamente relacionado a los haplotipos que forman el clado I a través de 13 pasos mutacionales.

Las secuencias de *N. fulva* introducidas en EEUU que fueron incluidas en la red, se determinaron como tres haplotipos diferentes dentro del clado I. El haplotipo 1 incluyó secuencias provenientes de poblaciones en Puerto Rico y EEUU (Texas, Luisiana y Mississippi), mientras que las poblaciones de Florida (EEUU) agruparon en otro haplotipo (H2) que difiere en un único paso mutacional respecto del anterior. Una secuencia proveniente de las Islas Vírgenes de los EEUU resultó un haplotipo que difiere en un paso mutacional respecto de las secuencias de Florida. El haplotipo 1 agrupa poblaciones de *N. fulva* en el rango nativo con una distribución que abarca una gran área del noreste argentino y sur de Brasil, en la región que comprende la cuenca del Río de La Plata. El haplotipo 2 está presente en dos poblaciones de Argentina, una en Gualaguay (Entre Ríos) y la otra en el Parque Nacional Chaco, y difiere en solo un paso mutacional de un haplotipo en el norte de Misiones, ambos en Argentina. La población de *N. fulva* de Puerto Rico está más cercanamente relacionada a H2 y a una población en Colonia Pellegrini, en los esteros del Iberá, Corrientes, en ambos casos a un paso mutacional de diferencia.

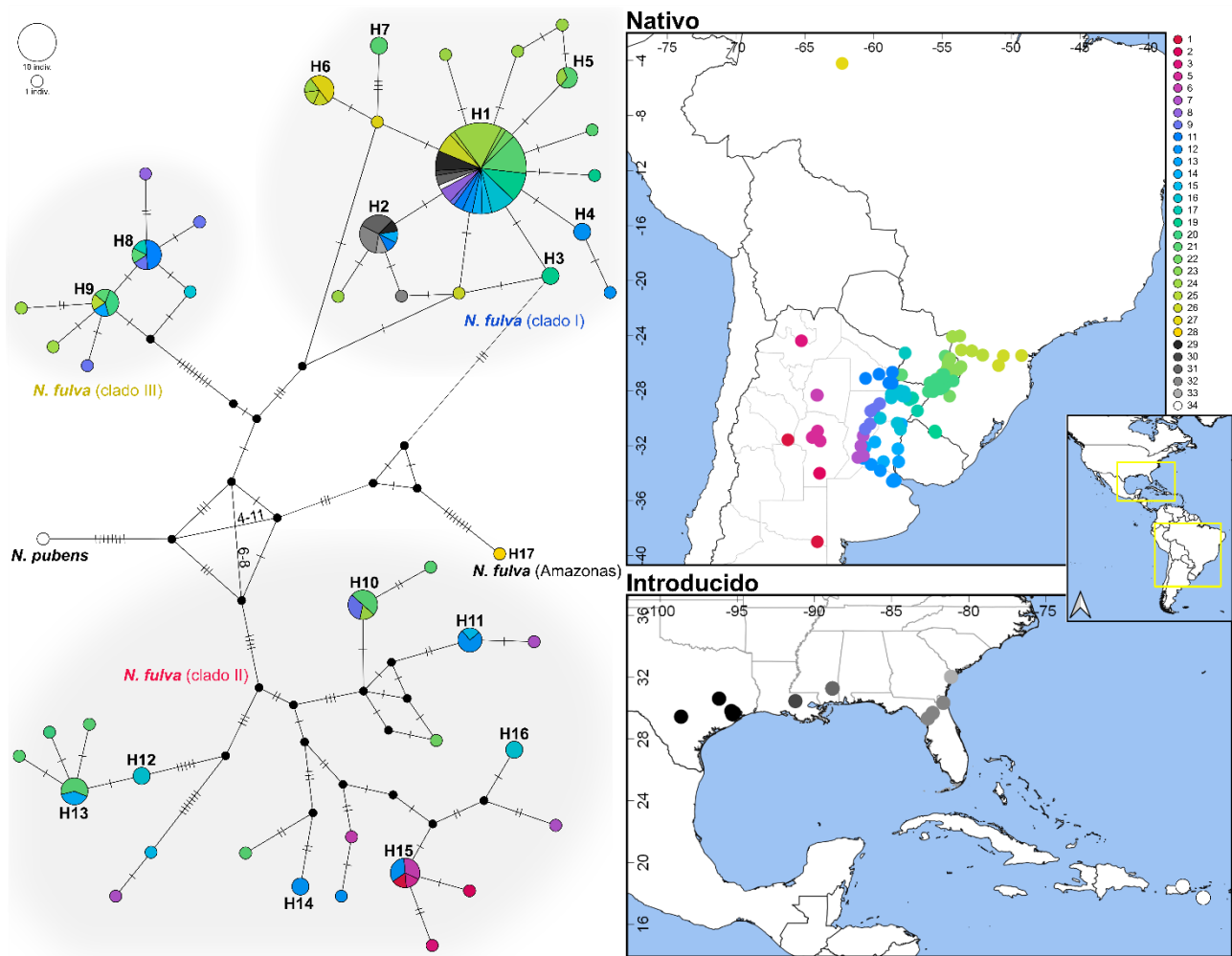
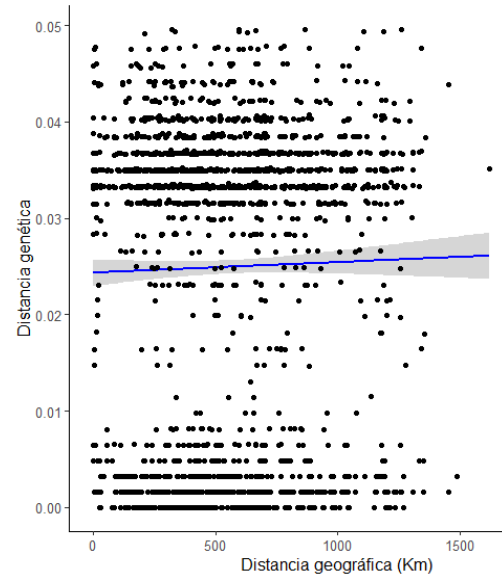
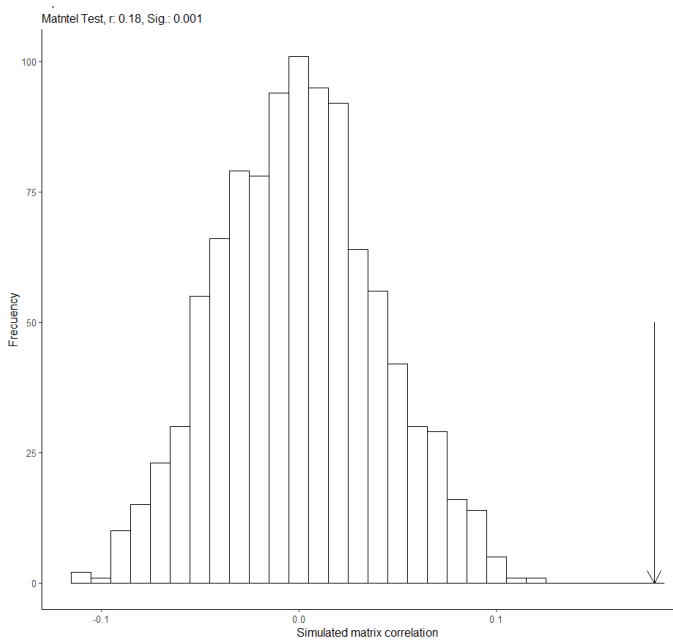


Figura 3.4. Red de haplotipos del gen mitocondrial COI para *N. fulva* y distribución geográfica de las poblaciones incluidas del rango nativo e introducido. Marcadores del mismo color indican pertenencia a una misma población definida por un polígono de 100km² en el rango nativo.

AMOVA y aislamiento por distancia

Mediante análisis de AMOVA se investigaron posibles variables que tengan relación a la distribución geográfica de la variabilidad genética. El mayor porcentaje de la variación puede ser explicado por su agrupamiento en tres clados (77% de la varianza total, $p > 0,009$), y en segundo lugar, las poblaciones, cuando no fueron contrastadas en un mismo análisis con los clados (39-45%, $p > 0,009$), ya que cuando se combinaron ambos niveles de agrupamiento las poblaciones explicaron solamente el 3,7% de la diferenciación ($p > 0,04$). Por otro lado, los otros métodos de agrupamiento puestos a prueba no explicaron de manera significativa la varianza de las muestras (provincias fitogeográficas, 0,9-4,5% $p > 0,1$, y ecorregiones 2,4-20,6% $p > 0,09$). La asociación entre las distancias genéticas y geográficas fue puesta a prueba con un Test de Mantel (Fig. 3.5.A) y una regresión lineal (Fig. 3.5.B), cuyos resultados indican independencia entre esas variables.



A **Figura 3.5.** Pruebas de relación entre la distancia genética y la geográfica para *N. fulva*. A: Test de Mantel, B: regresión lineal.

Filogeografía Bayesiana Continua

La historia evolutiva de *N. fulva* fue estimada mediante un análisis filogeográfico basado en secuencias COI del rango nativo de la especie. El árbol filogenético estimado se muestra en la Figura 3.7 mientras que la hipótesis de diversificación de la especie se muestra en la Figura 3.6, resumida en 5 etapas.

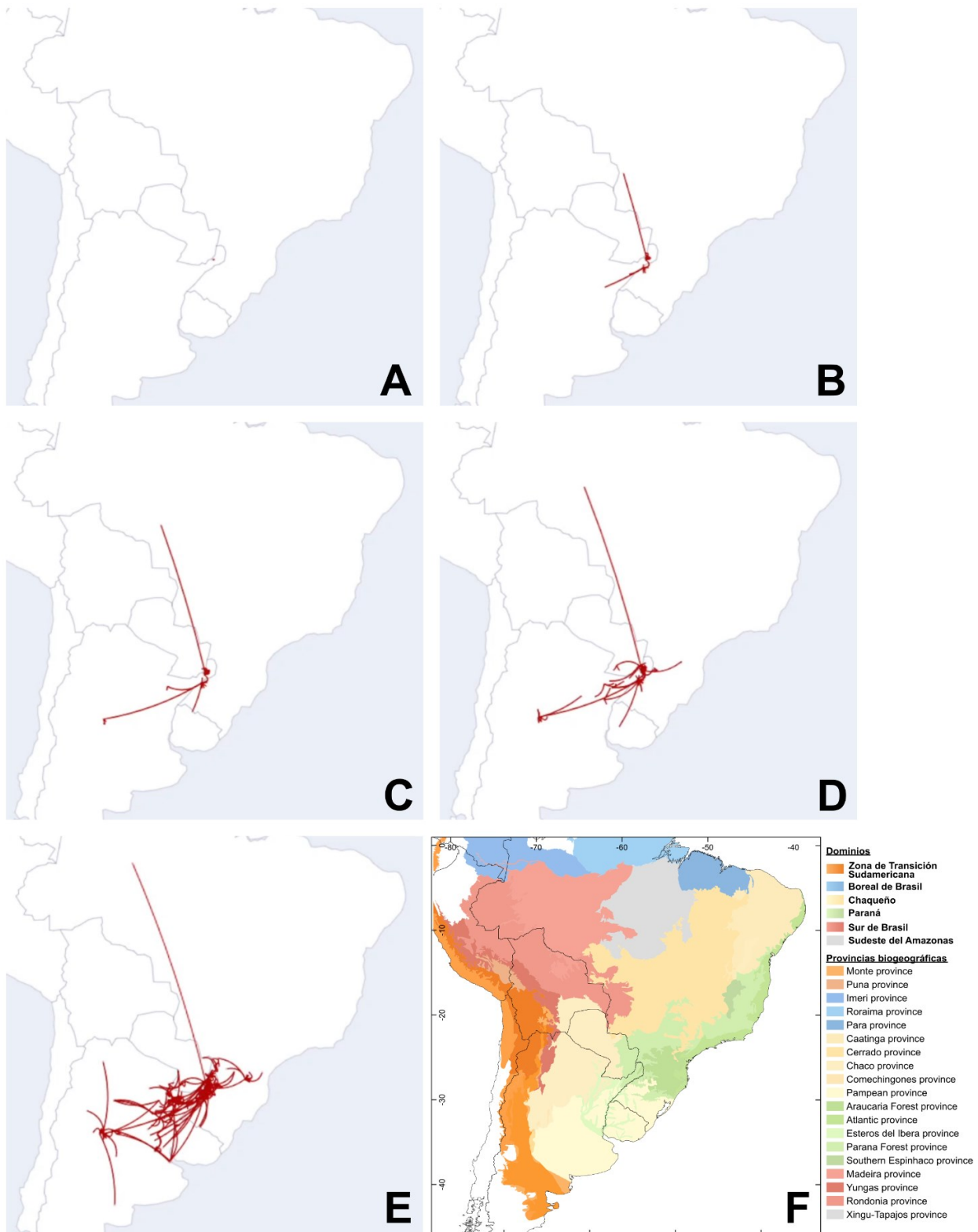


Figura 3.6. A-E: Historia evolutiva de *N. fulva* según el análisis filogeográfico realizado en BEAST2. F: Dominios y provincias biogeográficas del Neotrópico, según Morrone *et al.*, 2022.

En primer lugar, el centro de origen de la especie se estimó en el centro de la provincia de Misiones, Argentina (Fig. 3.A) hace aproximadamente 1,8 millones de años (Tabla 3.). En una segunda etapa, ocurren dos dispersiones en simultáneo, una hacia el norte de Brasil y otra hacia

Corrientes, Argentina (Fig. 3.6.B). La provincia de Misiones, Argentina, se presenta como un centro de diversificación a lo largo de todas las etapas. En una tercera etapa, la expansión continúa hacia el centro de Córdoba (Fig 3.6.C). A partir de este momento, esta región en Córdoba también actúa como un centro de origen secundario y dispersión de esta variante a través de la región oeste de Argentina (Fig. 3.6.D-E). En las siguientes etapas, la dispersión continúa en varias direcciones desde la provincia de Misiones: hacia el sur de Brasil, sur de Paraguay y en Argentina hacia las provincias de Buenos Aires, Corrientes y Misiones (Fig. 3.6.D). Posteriormente, se observan eventos de dispersión muy cercanos temporalmente: reinserciones desde Córdoba hacia el noreste argentino (generando zonas de contacto secundario), colonización de los linajes de la provincia de Corrientes en dirección este y sur, expansión desde Córdoba hacia el noroeste y sur de Argentina, y confluencia de eventos de dispersión desde Misiones, Corrientes y Córdoba hacia el norte de Buenos Aires - CABA-, y también se establecen los linajes en Uruguay y norte de Brasil (Fig. 3.6.E). Según lo propuesto por este análisis, se estima que el linaje registrado en el norte de Brasil, que ocupa la provincia de Madeira, dominio Sur de Brasil, tiene un origen en común con los linajes de Misiones, en Argentina, que pertenece al dominio Paranaense (Fig. 3.6.F). Esta divergencia habría ocurrido hace alrededor de 2,2 millones de años (Tabla 3.4). La divergencia de los linajes del oeste de Argentina, que se distribuyen en el dominio del Chaco, ocurrió hace aproximadamente -1,8 ma, a partir de un origen común en el dominio Paranaense ([clado II + III]).

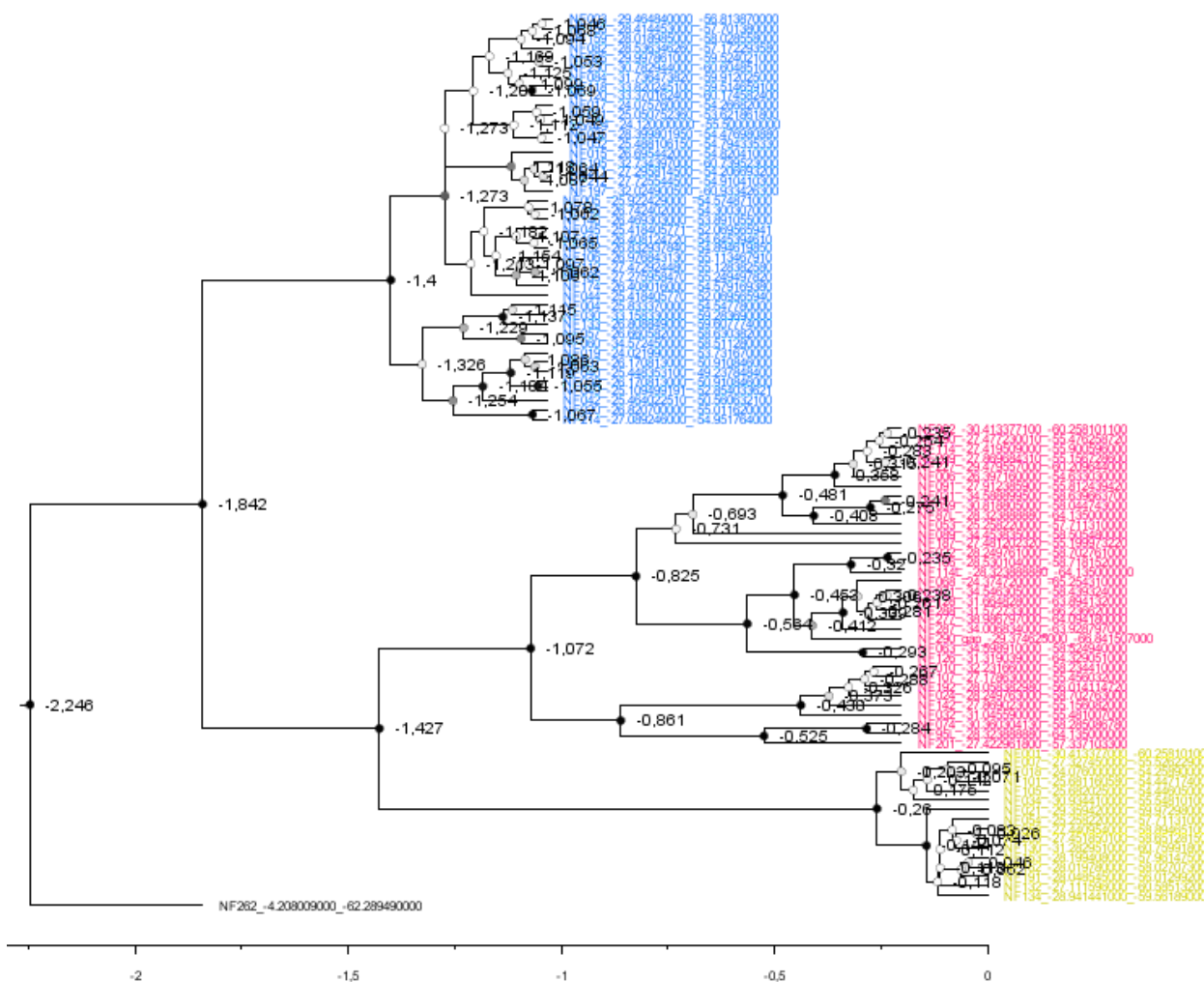


Figura 3.7. Filogenia de *N. fulva* obtenida del análisis filogeográfico en BEAST2. Los linajes mitocondriales se identifican con colores (clados I-III), las barras horizontales indican el intervalo de 95% HPD y entre corchetes se indica el rango de los nodos en millones de años. Los valores de las ramas identifican la probabilidad posterior.

Tabla 3.4. Edad media, intervalo de máxima probabilidad posterior (95% HPD) y ubicación geográfica estimada (latitud / longitud en graos decimales) para los nodos de la filogenia COI obtenida con el análisis filogeográfico realizado en BEAST2. Edades expresadas en millones de años atrás.

Nodo	Edad		Ubicación
	Media	95% HPD	
<i>N. fulva</i> (excepto NF262)	-1,842		-4,21 / -62,29
<i>Nylanderia fulva</i> clado I	-1,4	-(1,399 – 0,886)	-22,21 / -53,14
<i>N. fulva</i> clado II	-1,072	-(0,42 – 1,717)	-27,11 / -52,03
<i>N. fulva</i> clado III	-0,259	-(0,07 – 0,699)	-28,84 / -61,52
[<i>N. fulva</i> clado II + <i>N. fulva</i> clado III]	-1,427	-(0,307 – 1,915)	-22,58 / -53,47

Discusión

Diversidad genética y estructuración poblacional

En conjunto, los resultados sugieren un nivel relativamente alto de estructuración poblacional. Por ejemplo, el estadístico F_{st} que toma valores de 0,2 o 0,7 según el marcador genético usado, y los análisis de AMOVA, que demuestran que la mayor parte de la diferenciación entre las muestras incluidas puede explicarse por la población a la que pertenecen. El alto grado de similitud entre nidos ubicados a cortas distancias podría indicar que la especie presenta bajos niveles de dispersión. El comportamiento de reproducción de la casta reproductiva en *N. fulva* no se conoce con exactitud; si bien se ha observado que las colonias producen individuos reproductivos con alas funcionales (obs. Pers.), aún no se han registrado vuelos nupciales en esta especie. Una posible causa de estos patrones observados podría ser que la especie presenta un mecanismo de fundación por brotación, en donde una o más reinas forman una nueva colonia en un sitio cercano al de la colonia de origen (Fernández, 2003). Este tipo de fundación de nidos es frecuente en otras hormigas invasoras nativas de la cuenca del Plata, por ejemplo, en *Wasmannia auropunctata* (Fournier et al., 2005).

Los valores estimados de divergencia intraespecífica del fragmento COI estudiado se estimaron en 0,5-2,9%, mientras que la divergencia interespecífica varió entre 2,7-8,5%. Al dividir a *N. fulva* en tres clados, estos valores se mantuvieron muy similares: divergencia intraespecífica 0,2-2,9% e interespecífica 2,5-9,3%. Se ha sugerido que los valores máximos de divergencia intraespecífica toman valores menores al 1%, en base a datos de mamíferos, aves, anfibios, insectos, crustáceos y moluscos (Puillandre et al., 2021); este valor se ha implementado como umbral en BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007). En un estudio sobre la diversidad de hormigas en una región hiperdiversa de Argentina, la divergencia intraespecífica media fue de 1,74%, pero encontraron valores mucho más altos (de hasta 11%) en algunos casos, aunque los autores discuten si se trata de complejos de especies. (Hanisch et al., 2017). Se planteó que existe una “zona gris” durante la especiación, durante el cual la resolución taxonómica puede ser controversial, y que comprende valores de divergencia entre 0,5% y 2% (Roux et al., 2016). Las especies tratadas en esta sección han sido consideradas complejos de especies por otros autores previamente, excepto *N. silvestrii*, de la cual no hay ningún antecedente relacionado. De acuerdo a los valores de divergencia encontrados y los umbrales de divergencia discutidos, se desprende que en base a estos datos las especies involucradas no constituirían un complejo de especies.

Microsatélites

Los *loci* microsatélite mostraron un nivel más alto de estructuración en las poblaciones de *N. fulva*, estimando la existencia de 8-13 clústeres con muy bajo nivel de mezcla, entre los individuos/genotipos. Cuando se probó la hipótesis de estructuración genética en tres linajes de acuerdo a lo observado previamente en el ADN mitocondrial, no se encontró que esa agrupación explicara la variabilidad de las muestras. De esta manera, estos marcadores mostraron una mayor estructuración en las poblaciones que la estimada previamente con el fragmento mitocondrial, y con el fragmento nuclear *wnt*. La hipótesis de agrupación propuesta de 8-13 clústeres coincidiría aproximadamente con lo estimado por los algoritmos de delimitación aplicados en el capítulo anterior; al comparar un grupo de muestras que fueron analizadas con ambas metodologías, los algoritmos de delimitación molecular determinaron que las mismas forman parte de 4-5 grupos, mientras que de acuerdo a los microsatélites se agrupan en 6 grupos que corresponden a 6 haplotipos COI. Esto sugiere que la estimación realizada por los algoritmos de delimitación, en principio, sería una sobreestimación del número de especies, ya que separa prácticamente a cada haplotipo mitocondrial como una potencial especie (dos de ellos, por ejemplo, difieren en sólo un paso mutacional), pero a la vez también reflejaría una separación semejante a la encontrada en marcadores más representativos de todo el genoma, como los microsatélites. Adicionalmente, el hecho de que se encontraran muy bajos porcentajes de mezcla entre los individuos de diferentes clústeres puede relacionarse a un marcado aislamiento reproductivo entre estos grupos.

En hormigas invasoras, existe una correlación positiva entre la diversidad, cantidad y distancia de los ambientes que pueden colonizar, con caracteres de historia de vida tales como la poliginia, el generalismo de hábitats y de sitios de nidificación (Bertelsmeier et al., 2017). Sin embargo, en muchos casos no es sencillo detectar estos patrones. Diversos trabajos que exploran la diversidad genética de himenópteros utilizando técnicas de gran representación del genoma, encuentran correspondencia entre linajes y su distribución geográfica que previamente no se detectaba analizando genes individuales. En dos especies de abejas de *Eulaema*, se observó una variación genética en los *loci* UCE menor a la esperada según lo anteriormente detectado con el marcador *barcode*, COI, por lo que concluyen que dichas especies deberían considerarse subespecies (Sandoval-Arango et al., 2023). Existen otros tipos de marcadores genómicos que a diferencia de los UCEs representan regiones aleatorias de todo el genoma, llamados SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). En *Nylanderia fulva*, se exploraron SNPs en un reciente estudio, donde se seleccionaron poblaciones de diferentes estados de los Estados Unidos. Los autores contrastan

sus resultados con los publicados previamente por nuestro grupo, en el que marcadores genéticos puntuales (COI) indican una muy baja diferenciación genética entre poblaciones de toda la extensión del frente de invasión en los EEUU. Hallaron que los 26,657 SNPs analizados presentan una mayor resolución que los otros marcadores, que se traduce en que las poblaciones pertenecientes a distintos estados presentan diferenciación genética (Holt et al., 2023 –preprint-). Es posible, entonces, que aplicar este tipo de metodologías de gran cobertura del genoma amplíe aún más la variabilidad observada en este trabajo, y de mayor soporte a una de las dos hipótesis acerca de la identidad de *N. fulva*, si se considera una única o varias especies.

Análisis filogeográficos

La red de haplotipos mitocondriales muestra en el territorio nativo una gran diversidad de haplotipos, la mayoría en frecuencias bajas, es decir, presentes en 1-2 sitios únicamente. En el extremo opuesto, se detectó un solo haplotipo ampliamente distribuido en la región de estudio, presente en poblaciones distanciadas por más de 1000 km (H1). Este haplotipo es el que presentaron varias de las poblaciones invasoras, en total representadas en sólo tres haplotipos, y que está asociado a la cuenca baja y media del Río de La Plata, que se extiende a través de Argentina, Uruguay, Paraguay y del sur de Brasil. Esa cuenca es una importante vía de navegación, comercio e intercambio de productos entre los cuatro países y con puertos internacionales que conectan con otros continentes (Bertelsmeier et al., 2017).

Los haplotipos invasores se ubicaron dentro de un grupo de poblaciones que se ha denominado el clado I, de acuerdo a evidencias en la filogenia mitocondrial, y difieren en 1-3 pasos mutacionales según lo observado en la red de haplotipos. Las poblaciones de los EEUU y Puerto Rico incluidas en el análisis no pueden relacionarse a una posible población de origen en el rango nativo ya que corresponden al haplotipo de más amplia distribución, o bien porque las poblaciones del rango nativo que comparten ese haplotipo se encuentran muy distantes entre sí. *Nylanderia fulva* comparte su distribución nativa con otras importantes hormigas invasoras a nivel mundial, como *Solenopsis invicta* y *Linepithema humile*. Estudios que han explorado la asociación de las poblaciones invasoras con poblaciones en el rango nativo encontraron que éstas provienen de la misma región (cuenca del Río de La Plata); en el caso de *W. auropunctata*, las poblaciones invasivas se trazaron a Otamendi, sobre la orilla del Río de La Plata en Buenos Aires (Chifflet et al., 2016); en el caso de *L. humile* se localizaron en Otamendi, a pocos kilómetros de Zárate (Vogel et al., 2010), en el caso de *S. invicta* en la provincia de Formosa, Argentina, cerca del puerto de Asunción en Paraguay (Ascunce

et al., 2011). Estas evidencias han llevado a formular la hipótesis de que la cuenca del Río de La Plata es una de las más importantes fuentes de hormigas invasoras a nivel mundial, probablemente promovido por su importancia como vía comercial para el sur de Sudamérica, especialmente en Argentina, y la elevada susceptibilidad de transporte indeseado de hormigas en cargamentos.

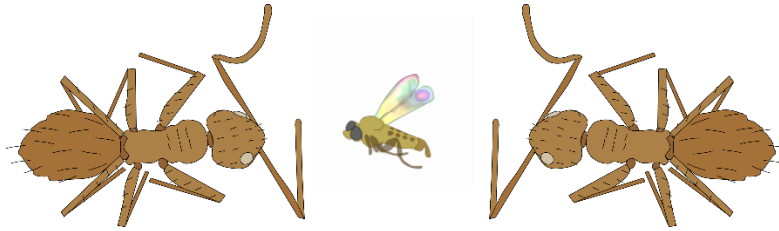
Por otro lado, una muestra proveniente de Amazonas, Brasil (NF262) se posiciona como un haplotipo único, separado de los demás grupos de haplotipos o linajes por al menos 13 pasos mutacionales y con un ancestro común hace 2,2 ma. Esto, además de sugerir que puede existir un cuarto linaje de *N. fulva* presente en Brasil, que no hemos podido capturar por el escaso muestreo realizado en ese país, también podría indicar que allí están presentes los haplotipos más antiguos de la especie.

La historia evolutiva de *N. fulva* fue inferida utilizando el marcador mitocondrial COI indica que su origen estaría localizado en la provincia de Misiones, Argentina (clado I), desde donde se dispersan variantes que llegan a ocupar las regiones más al oeste del país (clado II), y que más adelante tienen un contacto secundario que da origen a lo que hemos considerado el clado III de *N. fulva*. Durante la diversificación de los linajes del oeste (clado II) hacia el sur y norte de Argentina, y los de Misiones hacia el resto de la región mesopotámica, se observa una pérdida de los linajes intermedios, con lo cual es interesante preguntarse si éstos sufrieron algún proceso de extinción; también debe considerarse que dichos linajes intermedios pudieron no haber sido relevados en el presente muestreo. La posición histórica de una variante de Amazonas, Brasil, fue en las primeras etapas de la diversificación de esta especie, con un linaje que se dispersó desde la provincia de Misiones hacia el norte de Brasil. Se conoce que *N. fulva* tiene una distribución amplia y podría estar presente en todo el territorio brasilero desde el río Amazonas hasta el sur del país (ver Fig. 1.2). De este modo, podrían existir haplotipos más antiguos en regiones no muestreadas de Brasil, desde donde la especie se habría dispersado hacia el suroeste hasta Misiones y hacia el noroeste hasta al menos el estado de Amazonas. Este patrón de origen en el planalto brasilero y posterior expansión, se vio en la hormiga invasora *W. auropunctata* (Chifflet et al., 2016). Como se observó en la red de haplotipos de *N. fulva*, la muestra de Amazonas se ubica en un extremo de la red, distantemente relacionada a los demás clados/haplogrupos. Así como en el amplio muestreo que realizamos en el extremo sur del rango nativo de *N. fulva* detectamos más de 30 haplotipos diferentes, sería esperable que exista una diversidad semejante en Brasil que no hemos capturado en este trabajo. Por ello, el origen del linaje de *N. fulva* de Brasil podría haber sido erróneamente estimado en este análisis. La hormiga *W. auropunctata* comparte gran parte de su área de distribución con *N. fulva* y presenta similitudes en su biología. El origen de los clados A y B de esa especie, se estimó en el

centro este de Brasil, en el estado de Tocantins, hace aproximadamente 4 ma, desde donde el clado B dispersó hacia Misiones, Argentina a través de la Mata Atlántica (Chifflet et al., 2016). Si bien la edad estimada del origen de *N. fulva* en este análisis fue hace 2,2 ma, las estimaciones del origen de *N. fulva* basadas en calibraciones con fósiles indican que la especie podría tener al menos 7,8 ma (Williams et al., 2020). Esta estimación mucho menor de las edades podría también indicar que no hemos muestreado el real centro de origen de la especie, sino una etapa posterior de su historia evolutiva. El hecho de que la edad estimada del origen de *N. fulva* en Misiones esté dentro del rango de tiempo estimado de arribo de *W. auropunctata* a esa misma provincia (Chifflet et al., 2016), sugiere que este escenario podría ser posible. La diversificación de la biota Neotropical puede ser generalmente explicada por oscilaciones climáticas y alteraciones del paisaje que ocurrieron a lo largo de la historia; el origen de diversificación de muchos organismos coincide con cambios en el paisaje en la región del Amazonas (Hoorn et al., 2010). En esa región, durante los últimos 3 ma aproximadamente, ocurrieron contracciones y expansiones de bosques que actuaron como refugios de diversidad que habrían moldeado la diversificación de muchos taxones (Hoorn et al., 2010). En el noreste argentino, durante el Plioceno-Pleistoceno, el paisaje del bosque atlántico fue modificado durante los periodos glaciares-interglaciares, formando un paisaje fragmentado y cambiante que podría estar relacionado a especiación por ciclos de vicarianza y divergencia (Trujillo-Arias et al., 2017). Las Yungas forman parte del bosque Andino, un bioma de montaña que presenta niveles altos de endemismo y a la vez coexistencia de especies con diversos orígenes biogeográficos, por lo que se considera una región de elevado interés de conservación (Arana et al., 2021). En *N. fulva*, se estimó que los tres linajes mitocondriales se originaron durante el Pleistoceno, y que el más reciente pudo haberse originado en una zona de contacto secundario de los dos primeros hace solamente 0,26 ma. La llegada de uno de los linajes hacia la región más occidental de Argentina (clado II) podría haber ocurrido por dos caminos, o bien una dispersión desde el bosque Atlántico, moldeada por la fluctuación del paisaje relacionado a la cuenca del Plata, donde la región árida del Chaco habría actuado como una barrera a la dispersión, lo que se relacionaría con el surgimiento de la gran diversidad genética de ese linaje por adaptaciones a diferentes tipos de paisajes durante estos periodos de oscilación históricos. Algunos autores postularon que los ríos Pilcomayo y Bermejo podrían haber constituido corredores entre el Bosque Atlántico y las Yungas durante los periodos glaciares del Pleistoceno, mediante los cuales las especies habrían mantenido contacto entre esas dos regiones; sin embargo, más recientemente esta hipótesis ha sido desacreditada en base a la acumulación de evidencia empírica que respalda la hipótesis alternativa de conexión por el Cerrado (Cabanne et al., 2019). Una explicación alternativa podría ser la llegada del linaje occidental (clado

II) a través de las Yungas, desde Bolivia y Brasil, como parte del continuo del bosque Andino, y que posteriormente tuviera un contacto secundario con el linaje que se dispersó a través del bosque Atlántico, con lo cual la gran diversidad observada en el clado II y distancia respecto del clado I podría haberse generado por la fijación de mutaciones durante la historia de evolución independiente de estos linajes. Es necesario poder incluir más muestreos en Brasil, Bolivia y Paraguay, que también forman parte de la distribución natural de *N. fulva*, ya que permitirían hacer una mejor estimación de los patrones de diversificación de esta especie y estimar con mejor precisión su historia evolutiva.

Capítulo 4: Interacciones bióticas y su potencial influencia en la historia evolutiva de *Nylanderia fulva*



Introducción

La estrecha relación de las hormigas con otros organismos que forman parte de la vida de la colonia es ampliamente reconocida y estudiada, desde la relación entre las hormigas cortadoras y el hongo que cultivan, hasta el parasitoidismo por avispas y fóridos.

Los enemigos naturales son aquellos organismos que coexisten naturalmente con una especie a la que afectan negativamente a través de alguna interacción. Las relaciones parásito-hospedador pueden derivar en procesos de adaptación recíproca de los organismos involucrados, o coevolución, por ejemplo, de caracteres como la resistencia en el hospedador (Mundim & Gibson, 2022). Como este tipo de interacción es siempre negativa para el hospedador (produce su muerte), usualmente este tipo de sistemas parásito-hospedador presentan fuertes evidencias de selección. El concepto del “fenotipo extendido” fue introducido por Dawkins en 1982, y es actualmente interpretado en términos de las relaciones parásito-hospedador como el resultado de la interacción entre el genotipo del parásito y el genotipo del hospedador para moldear el fenotipo de uno u otro integrante de la relación (Lambrechts et al., 2006).

Se ha comprobado que los parásitos y sus hospedadores responden de manera diferente dependiendo del tipo de genotipo que porta cada uno, causando, por ejemplo, que sólo ciertos genotipos puedan infectar a un genotipo del hospedador (Mundim & Gibson, 2022); este tipo de interacción se ha denominado especificidad genotipo-genotipo. Incluso, se conocen sistemas en donde los simbiosomas del hospedador también cumplen un rol en la especificidad del parasitoides, como en los áfidos *Aphis fabae* y sus bacterias parasitoides *Hamiltonella defensa* (Rouchet & Vorburger, 2014).

En una revisión sobre la influencia de los simbiosomas en sus hospedadores, se discute la evidencia de selección indirecta en el ADN mitocondrial que surge del desequilibrio de ligamiento

relacionado con los simbioses heredados por vía materna (Hurst & Jiggins, 2005). Los autores encuentran 17 casos de estudio en los que hubo una reducción en la diversidad genética impulsada por simbioses, o un aumento de la misma, o cambios en la variación del ADN mitocondrial en espacio geográfico o filogenético, por lo que concluyen que estos patrones pueden considerarse relativamente frecuentes.

En los capítulos anteriores, se describen patrones de variabilidad genética en poblaciones de *Nylanderia fulva* en su rango nativo. Estas poblaciones presentan una estructuración a nivel del ADN mitocondrial, que se puede describir como la existencia de tres linajes mitocondriales con una distribución geográfica algo diferenciada, pero que no se recuperan de la misma manera cuando se explora el ADN nuclear. Si bien pueden existir muchos escenarios diferentes que hayan dado lugar a esta variabilidad que se observa a nivel del ADN, en los últimos años se ha reconocido que la influencia de ciertos organismos sobre la historia evolutiva de sus hospedadores deja una señal en el genoma de los mismos que puede detectarse relativamente rápido, en términos de tiempos evolutivos. Por ejemplo, en un estudio sobre las avispas parasitoides de la familia Eucharitidae, que son exclusivos parásitos de hormigas, se encontraron evidencias de un marcado conservacionismo de hospedadores, incluso luego de eventos de dispersión desde el viejo hacia el nuevo mundo (Murray et al., 2013).

Se estudió la diversidad genética de dos organismos relacionados a poblaciones nativas de *N. fulva* en Argentina: la bacteria endosimbionte *Wolbachia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) y el fórido parasitoide *Pseudacteon convexicauda* (Diptera: Phoridae). En ambos casos se realizó el primer estudio filogenético y de su distribución en relación a sus hospedadores para Argentina.

Bacterias endosimbiontes del género *Wolbachia*

Las bacterias *Wolbachia pipientis* son los endosimbiontes más frecuentes en la fauna de artrópodos, aunque también pueden afectar nematodos (Duron et al., 2008). Pertenecen al grupo de las Alphaproteobacteria, son intracelulares obligadas que en los artrópodos se localizan principalmente en las gónadas y tienen un modo de transmisión maternal (es decir, vertical) (Rodríguez, 2013). Recientemente, se descubrió que estas bacterias pueden además transferirse horizontalmente, es decir, entre diferentes hospedadores, a través de mecanismos como la predación e hibridización.

Los simbioses pueden ofrecer protección a sus hospedadores mediante la explotación de un recurso limitante también importante para el parásito (Gerardo & Parker, 2014), con lo cual pueden estar sujetos a un proceso selectivo. Si bien estas relaciones se conocen principalmente en los áfidos, también se ha descrito en *Drosophila melanogaster*. El tipo de protección que se observó en las moscas de la fruta es debido a la competencia por explotación de recurso entre los endosimbioses *Wolbachia* y varios virus de ARN, ya que ambos utilizan el colesterol del hospedador (Caragata et al., 2013). Por otro lado, en los áfidos, ocurre una protección por la bacteria simbiote *Hamiltonella defensa* ante las avispas parasitoides *Aphidius ervi* (Oliver et al., 2005). Los simbioses protectores se favorecen al aumentar el *fitness* de sus hospedadores, por lo que se esperaría que la proporción de hospedadores infectados aumente con el tiempo, y en mayor medida cuando los simbioses efectúan manipulación reproductiva. Se explorará si la posible expansión poblacional reciente en el clado I de *N. fulva* podría relacionarse a la presencia de una variante específica del simbiote *Wolbachia pipientis*.

Moscas parasitoides del género *Pseudacteon*

Las moscas del género *Pseudacteon* son parasitoides comúnmente llamados moscas decapitadoras, que atacan exclusivamente hormigas (Porter, 1998). El ciclo de vida de estas moscas incluye la oviposición sobre una hormiga obrera, y luego de emerger del huevo, la larva parasitoide come su camino hacia el interior de la cabeza de la hormiga donde ocurre la pupación y posterior emergencia de la mosca adulta con la consecuente muerte de la hormiga hospedadora. Se conocen 72 especies de estas moscas, de las cuales más de la mitad atacan hormigas del género *Solenopsis* en Sudamérica. Estos parasitoides son considerados los agentes de control biológico más prometedores para las hormigas de fuego; seis especies han sido utilizadas hasta la fecha como controladores biológicos de esas hormigas en los Estados Unidos (Sánchez-Restrepo et al., 2020). Actualmente se reconoce sólo una especie de *Pseudacteon* que ataca a hormigas del género *Nylanderia* en Sudamérica, *P. convexicauda*, mientras que recientemente se describió una nueva especie, *P. gracilisetus*, en los EEUU que ataca a *N. arenivaga* (Brown et al., 2011). Los fóridos de *P. convexicauda* han sido indicados también como parasitoides de las hormigas de fuego, *Solenopsis* spp., ya que fueron colectados en algunas ocasiones volando sobre obreras de esas hormigas (Porter & Pesquero, 2001). La filogenia de *Pseudacteon* más reciente, indica que *P. convexicauda* es un grupo monofilético y está distantemente relacionado con las demás especies de fóridos de ese género que atacan hormigas de fuego (Sánchez-Restrepo et al., 2020). Además, se pudo comprobar

que esta especie es parasitoide de *N. fulva* mediante un estudio fenológico en Corrientes, Argentina (Gomila et al., 2017).

Los objetivos e hipótesis de trabajo fueron:

6. Estudiar la influencia de enemigos naturales y simbioses sobre la historia evolutiva de *Nylanderia fulva*.

Hipótesis 6.1. La infección por *Wolbachia* podría explicar la separación de clados observada para *N. fulva*.

Hipótesis 6.2. Si los clados de *N. fulva* consisten en entidades biológicas independientes, existen clados monofiléticos de su parasitoide de *Pseudacteon convexicauda* recíprocos (linajes o especies crípticas).

Metodología

Wolbachia

Estos análisis fueron realizados durante una estadía en el Departamento de Evolución y Biodiversidad Animal, en la Universidad de Göttingen, en Alemania, entre septiembre de 2019 y marzo de 2020.

Screening de Wolbachia en nidos de N. fulva

Para detectar la presencia de *Wolbachia* en hormigas de *N. fulva*, se extrajo ADN genómico de las hormigas (1-2 hormigas por nido) utilizando un kit que permite purificar ADN bacteriano de una muestra, GeneMATRIX Tissue and Bacterial DNA purification kit (EurX, Polonia). Para detectar la presencia de *Wolbachia* en una muestra, se realizaron amplificaciones por PCR utilizando el gen *ftsZ*, siguiendo las recomendaciones en Baldo et al., (2006), con modificaciones del protocolo de PCR según se detalla en la Tabla A4.1. Luego, se corroboró el resultado negativo mediante una reacción adicional de PCR usando el gen *coxA* y/o extrayendo ADN de una segunda hormiga del mismo nido. En un total de seis muestras (=nidos) no se detectó infección por *Wolbachia*.

Tipificación de las cepas mediante PCR

El protocolo usual para determinar cepas o variantes de *Wolbachia* consiste en un sistema multi-locus (MLST) de cinco genes, cuyo protocolo fue estandarizado y se encuentra detallado junto a una base de datos de secuencias de ADN en <https://pubmlst.org/organisms/wolbachia-spp/>. El MLST consiste de los genes *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ* y *fbpA*, y usualmente se complementa con el gen *wsp* debido a que históricamente fue el marcador más utilizado y que presenta gran variabilidad, incluyendo cuatro regiones hiper-variables, HVR1-4 (Baldo et al., 2006). Se realizaron modificaciones a los protocolos estándar publicados en la web mencionada, según se detalla en la Tabla A4.1. La secuenciación fue realizada en ambos sentidos por la empresa Microsynth (Microsynth Seqlab GmbH, Alemania). Las cepas de *Wolbachia* se tipificaron de acuerdo al perfil de alelos MLST mediante el servidor https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_wolbachia_seqdef.

En una muestra, se observaron múltiples picos en los electroferogramas de las secuencias de los genes *coxA*, *ftsZ*, *hcpA*, *wsp* y *glyQ*, lo que puede indicar la presencia de más de una cepa de *Wolbachia* infectando al mismo individuo. En ese caso, se pudieron individualizar las variantes de *coxA*, *ftsZ*, *wsp* y *glyQ* mediante la clonación de los fragmentos en vectores pGEM-T (Promega). Luego, se amplificaron las colonias con los mismos primers y protocolos empleados previamente, obteniéndose dos variantes para *coxA* (NF084a y NF084b) y *glyQ* (NF084c y NF084d), y una sola variante para los otros dos genes, cuya coinfección no se pudo resolver.

Desarrollo de un set de primers para el gen glyQ

En un reciente estudio, se evaluó el desempeño del sistema de marcadores MLST comparado a otros 252 *loci* de copia única obtenidos a partir de genomas completos de *Wolbachia* (Bleidorn & Gerth, 2018). Los autores sugieren una lista calificada de esos *loci* de acuerdo a la capacidad de separación de distintas cepas, la diversidad genética que presentan y a su idoneidad como marcadores filogenéticos. El gen glicina-ARNt ligasa subunidad alpha (*glyQ*) es el mejor rankeado, con lo cual supera en las categorías mencionadas a los cinco marcadores MLST en conjunto. Es por esto que se seleccionó como candidato para diseñar un set de primers y poner a prueba estos resultados con el modelo de estudio de esta Tesis.

Se diseñó el par de primers en el programa Primer Premier v 6.25 (Premier Biosoft International, San Francisco, CA, EEUU) utilizando 11 secuencias del gen *glyQ* del set de datos del trabajo de Bleidorn y Gerth. Se tuvieron en cuenta para la selección de los primers la temperatura de desnaturalización (T_m), la potencial formación de homo- y heterodímeros y de hair-pins. Una vez

obtenidos los primers candidato, se diseñó un protocolo de PCR adecuando la temperatura de annealing de acuerdo a la T_m de los primers y se amplificaron y secuenciaron las muestras como ya fue descrito en la sección anterior. Se comprobó que las secuencias obtenidas fueran de *Wolbachia* mediante el algoritmo BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Filogenia

Se estimó la filogenia de *Wolbachia* mediante ML en el programa IQtree, a partir del alineamiento de los genes MLST concatenados y para el gen glyQ de manera individual, incorporando en el primer caso un outgroup que consiste de cepas de *Wolbachia* que infectan a otras hormigas e insectos (Russell et al., 2009), y en el segundo fragmentos de glyQ obtenidos a partir de genomas publicados de *Wolbachia*.

Fóridos

Colectas

En los sitios con ambientes naturales en donde se encontraron nidos de *Nylanderia* más populosos, donde la probabilidad de encontrar poblaciones de enemigos naturales es alta, se transportó una porción del nido a una bandeja plástica con las paredes entalcadas para evitar el escape de hormigas. Se observó la aparición de fóridos sobrevolando las obreras perturbadas en la bandeja y se colectaron los fóridos con un aspirador. Los fóridos se identificaron bajo lupa utilizando la clave ilustrada de Porter y Pesquero (Porter & Pesquero, 2001).

Filogenia

Se extrajo ADN genómico de los fóridos utilizando el kit Extract-N-Amp Tissue PCR (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). Cada muestra se trituró utilizando pilones plásticos esterilizados (Eppendorf) y se procedió según el protocolo propuesto por el fabricante. Se corroboró mediante espectrometría en un detector Denovix la concentración de nucleótidos totales obtenidos mediante el proceso de extracción. Se amplificaron mediante PCR un fragmento del gen mitocondrial COI (*primers Jerry y Pat*) y un fragmento del gen nuclear *wingless* (*wnt*, *primers 578F y 1032R*). Las reacciones de PCR fueron realizadas tal como fue descrito para las hormigas. Se verificó el

resultado de las amplificaciones con geles de agarosa. Se secuenciaron las amplificaciones con el servicio de MacroGen.

Se alinearon las secuencias de cada gen utilizando el software libre UGENE v. 38.1, mediante el algoritmo Muscle, adicionando secuencias de repositorios de *Pseudacteon* así como del grupo externo. Se estimó la filogenia de los fóridos mediante un análisis Bayesiano en BEAST2, seleccionando el modelo de sustitución GTR, reloj molecular estricto, 8000000 generaciones MCMC, muestreadas cada 5000 estados y se descartó un burn-in del 10%. También se estimó una filogenia bajo el criterio de máxima parsimonia en el programa IQtree, sobre la concatenación de los dos genes, con 1000 repeticiones de *ultra-fast bootstrap*.

Análisis cofilogenético hormigas-fóridos

Se compararon las relaciones filogenéticas relacionando las terminales de hospedador y parasitoide utilizando como input los árboles filogenéticos estimados previamente para ambos organismos. Se utilizó la función *cophylo* del paquete de R *phytools* para graficar las filogenias enfrentadas. Se calculó el estadístico PACO, basado en un análisis de Procrustes, y el test parafit, que dan una estimación de la congruencia entre las filogenias (Balbuena et al., 2013).

Resultados

Wolbachia

Tras comprobar la presencia del gen *ftsZ* de *Wolbachia*, se detectó infección en el 41% de los 34 nidos de *Nylanderia*, con un alto porcentaje de nidos infectados en *N. fulva* (68%) (Tabla 4.1). La distribución de los nidos portadores de *Wolbachia* se extiende por todo el noreste de Argentina (Fig. 4.1).

que sólo hay dos cepas diferentes infectando los clados II y III. Una de las cepas de *Wolbachia* que infecta el clado II de *N. fulva*, wNyla1, es altamente prevalente, infectando seis de los siete nidos inspeccionados. En *Nylanderia silvestrii*, la misma cepa de *Wolbachia* infecta ambos nidos. Cabe señalar que dado que faltan secuencias *gatB* para la mayoría de las muestras, es posible que los resultados sean diferentes y podrían mostrar una mayor variabilidad.

Tabla 4.2. Perfiles alélicos para los genes estudiados en *Wolbachia*: tipo de secuencia MLST (o nombre de la cepa cuando no hubo coincidencias con la base de datos), *wsp*, regiones hiper variables HVR1-4 y alelos glyQ. Los números romanos indican alelos nuevos que no se encuentran en la base de datos de referencia, así como las cepas nuevas wNyla1-14. La muestra N084 presenta coinfección con dos variantes de *Wolbachia*.

Especie hospedadora (clado)	Código	Cepa MLST	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>	<i>wsp</i>	HVR 1	HVR 2	HVR 3	HVR 4
<i>Nylanderia fulva</i> (clado I)	N004	wNyla2	-	15	i	6	1	408	9	9	12	271
	N030	wNyla4	-	15	i	i	1	408	9	9	12	271
	N035	wNyla6	-	20	45	ii	-	351	21	21	25	317
	N047	wNyla7	-	15	i	iii	1	408	9	9	12	271
	N049	wNyla7	-	15	i	iii	1	408	9	9	12	271
	N060	wNyla6	43	20	45	ii	-	351	21	21	25	317
	N077	wNyla7	-	15	i	iii	1	408	9	9	12	271
	N084	wNyla8	-	15	iii	ii	1	351	21	21	25	317
		wNyla9	-	20	iii	ii	1	351	21	21	25	317
	N093	wNyla10	-	15	i	iv	1	ii	9	9	12	130
	N106	wNyla7	-	15	i	iii	1	408	9	9	12	271
	N118	wNyla12	-	ii	i	iii	1	408	9	9	12	271
	N122	wNyla7	-	15	i	iii	1	408	9	9	12	271
N159	wNyla13	-	20	45	vi	-	351	21	21	25	317	
<i>N. fulva</i> (clado III)	N001	wNyla1	-	20	44	37	i	58	37	38	41	317
	N007	wNyla1	-	20	44	37	i	58	37	38	41	317
	N018	wNyla1	-	20	44	37	i	58	37	38	41	317
	N034	wNyla1	-	20	44	37	i	58	37	38	41	317
	N058	wNyla1	-	20	44	37	i	58	37	38	41	317
	N105	wNyla11	-	20	45	v	-	351	21	21	25	317
	N132	wNyla1	-	20	44	37	i	58	37	38	41	317
<i>N. fulva</i> (clado II)	N022	wNyla3	-	20	ii	17	20	50	42	43	9	272
	N031	wNyla5	43	i	45	ii	-	i	21	21	25	317
<i>Nylanderia silvestrii</i>	N064	wNyla14	-	iii	iv	vii	ii	iii	9	9	12	272
	N124	wNyla14	-	iii	iv	viii	ii	iii	9	9	12	272
<i>Paratrechina longicornis</i>	PL150	ST471	168	147	262	132	226	708	242	274	276	308

La variabilidad en el gen *wsp* fue alta, con ocho alelos diferentes encontrados en *Nylanderia spp.*, de los cuales dos son nuevos. Las estimaciones de diversidad de los fragmentos secuenciados muestran que el gen más variable fue *ftsZ*, que presenta once haplotipos diferentes, mientras que

la mayor diversidad nucleotídica se encontró en el gen *wsp* (Tabla 4.3). Comparado con el conjunto de los loci MLST, el fragmento *glyQ* presentó una diversidad general baja, con sólo cinco haplotipos diferentes para *Nylanderia spp.* y sólo nueve sitios segregantes. Sin embargo, el fragmento presenta un porcentaje de sitios segregantes (alrededor del 3%) y una diversidad de nucleótidos (0,01) similares a los de otros genes MLST solos, como *coxA* y *ftsZ*. Además, si se tiene en cuenta el gen *glyQ* a la hora de establecer los tipos de secuencia, el número de haplotipos diferentes dentro de *Nylanderia spp.* se mantiene en 14 al igual que sólo utilizando los loci MLST (Tabla A4.5).

Tabla 4.3. Estimadores de diversidad nucleotídica para los ocho genes de *Wolbachia* estudiados. N: total de secuencias, H: número de haplotipos, L: longitud del fragmento de ADN, s: número de sitios segregantes, π : diversidad nucleotídica.

	<i>gatB</i>	<i>coxA</i>	<i>hcpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>fbpA</i>	MLST	<i>wsp</i>	<i>glyQ</i>
n	2	24	23	24	19	24	24	24
H	2	5	6	11	4	13	7	5
L	369	402	444	435	429	2079	508	333
s	-	11	31	14	32	56	140	9
π	-	0.00914	0.02375	0.01032	0.03353	0.01463	0.09275	0.01014

En la filogenia de los genes MLST de las cepas de *Wolbachia* que infectan a *Nylanderia spp.*, se determinó que todas las cepas pertenecen al supergrupo A, mientras que *P. longicornis* fue infectada con la cepa *wLonF* (ST471), que pertenece al supergrupo F (Figura 4.3). La mayoría de los nidos de los clados I y III de *N. fulva* están infectados cada uno con un linaje único de cepas o variantes de *Wolbachia*, mientras que el clado II alberga dos cepas de *Wolbachia* distantemente relacionadas. Un grupo de nidos de *N. fulva* pertenecientes a los clados I, II y III y distribuidos distantemente (sur de Brasil, Misiones y Buenos Aires en Argentina) comparten la infección del mismo linaje de *Wolbachia* (muestras N031, N035, N060, N105 y N159). Entonces, los cuatro linajes de *Wolbachia* que infectan a *N. fulva* están distantemente relacionados entre sí y no forman una única unidad monofilética. Por ejemplo, una cepa de *Wolbachia* encontrada en un nido de *N. fulva* del clado II está cercanamente emparentada con una cepa encontrada en hormigas de *Pheidole obtuspinosa*. *Nylanderia silvestrii* también está infectada con una única cepa de *Wolbachia* que está más estrechamente relacionada con las que infectan a otras hormigas que con los linajes de infecta a *N. fulva*. Entre las hormigas de otros géneros incluidas en el análisis, se destaca que la cepa encontrada en *Wasmannia auropunctata*, que comparte parte de su rango de distribución con *N. fulva*, es similar a la encontrada en varios nidos de *N. fulva*.

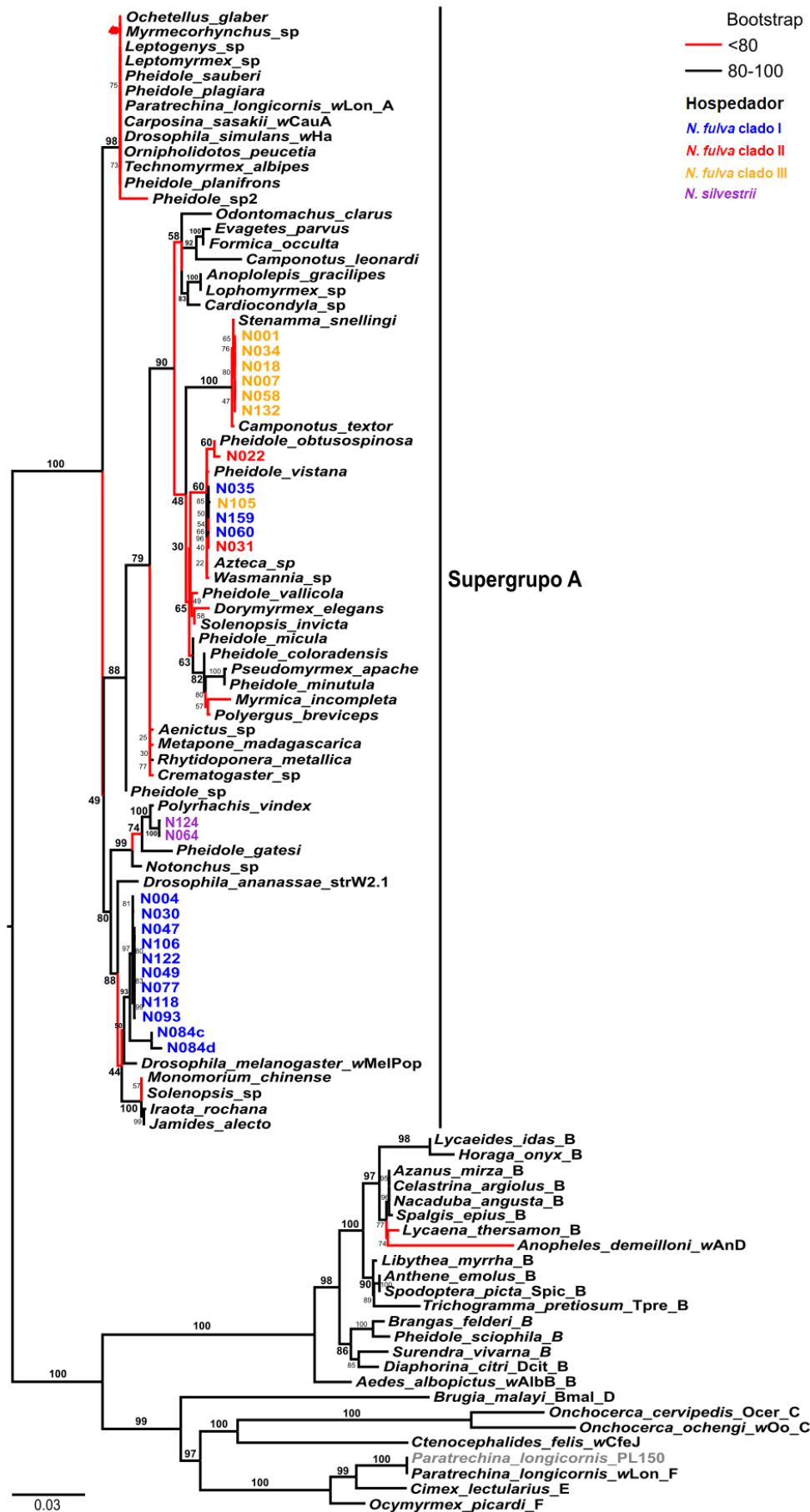


Figura 4.3. Filogenia de ML de *Wolbachia* basada en los loci MLST que incluye cepas que infectan nidos de *Nylanderia* spp.

En cuanto al fragmento del gen glyQ que se puso a prueba en este trabajo, se encontró que, a pesar de haberse obtenido un fragmento de ADN relativamente corto, las relaciones filogenéticas entre las cepas estudiadas se pudieron resolver con buen soporte (Fig. 4.4). Además, se observó una similar relación entre las cepas de *Wolbachia* que infectan nidos de *Nylanderia* spp., con tres linajes de bacterias infectando a *N. fulva* y uno a *N. silvestrii*. Al igual que lo observado en la filogenia basada en los loci MLST, se recuperó un linaje de cepas de *Wolbachia* que infectan nidos de *N. fulva* de diferentes clados; en este caso, con el fragmento glyQ no se recuperó la diferenciación de la cepa que infecta a la muestra N022 como una clado independiente, tal como se observó en la Fig. 4.3. En esta hipótesis también se observa una independencia entre los diferentes linajes de bacterias que infectan a la misma especie (*N. fulva*).

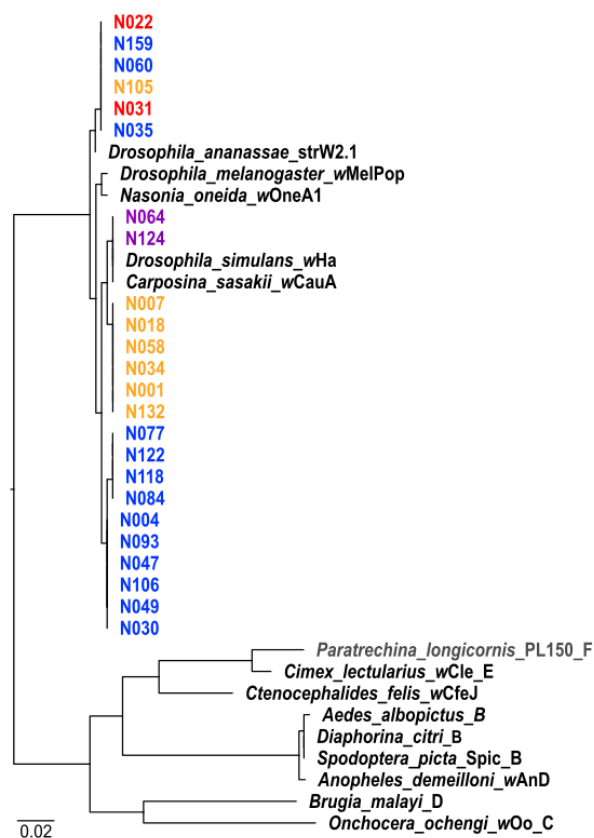


Figura 4.4. Filogenia de ML de *Wolbachia* que infectan especies de *Nylanderia* spp. basada en el gen glyQ. Todos los valores de Bootstrap de soporte de ramas fueron superiores a 70.

Fóridos

Se colectaron fóridos en 17 nidos de *Nylanderia fulva* (Fig. 4.5). Todos fueron identificados morfológicamente como *Pseudacteon convexicauda*. Los fragmentos de ADN estudiados, COI y wnt, presentaron 16 y 4 sitios polimórficos respectivamente. La diversidad nucleotídica fue de 0,009 para

el gen COI y 0,002 para wnt. La hipótesis de neutralidad, puesta a prueba con los estadísticos D de Tajima ($D=1,413$) y F de Fu ($F=1,226$) no fue rechazada ($p>0,1$).

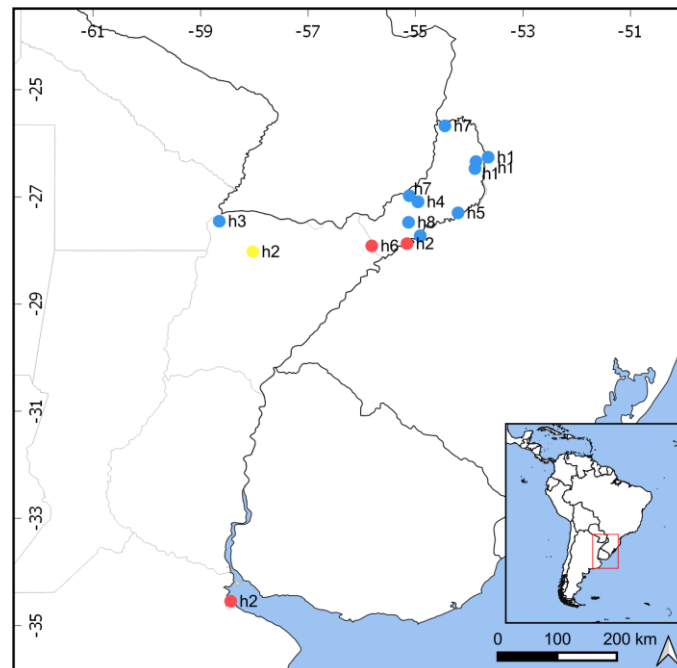


Figura 4.5. Ubicación geográfica de los fósidos incluidos en el análisis filogenético. Se indica el haplotipo mitocondrial de los fósidos (h1-8) y en color el haplotipo mitocondrial del hospedador.

El fragmento del gen COI presentó ocho haplotipos (Fig. 4.6) y el gen nuclear wnt, cuatro. Uno de los haplotipos mitocondriales (h2) lo presentaron fósidos que pertenecen a poblaciones muy distantes, ubicadas en las provincias de Misiones, Corrientes y Buenos Aires (Fig. 4.6). A su vez, este haplotipo se asoció a nidos de *N. fulva* de tres clados diferentes (clados I, II y III). El porcentaje de diferenciación genética dentro de los haplotipos que se asociaron a cada clado de *N. fulva* fue de: 0,64, 0,48 y 0,32, para los clados I, II y III respectivamente. Los haplotipos se diferenciaron en un 0,23-0,26% cuando se compararon de a pares entre los clados.

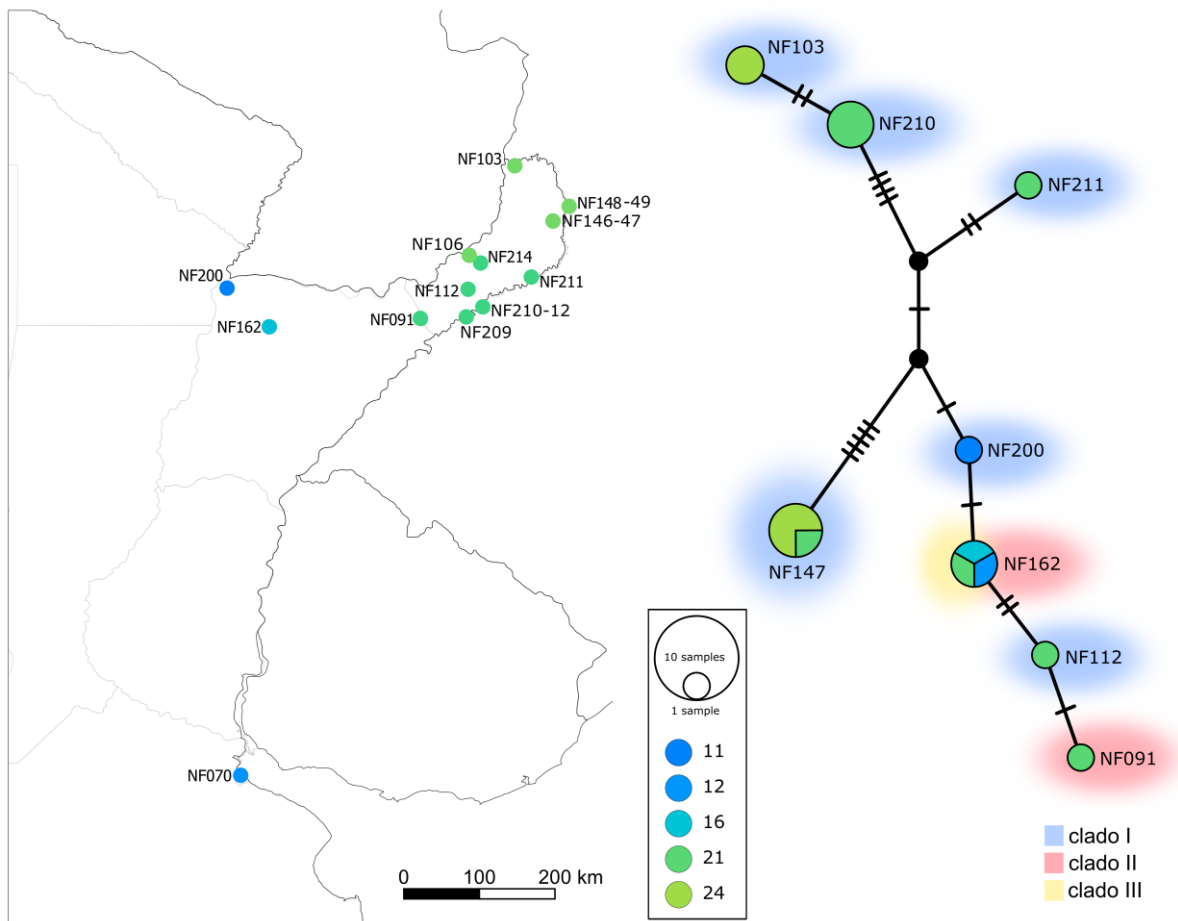


Figura 4.6. Red de haplotipos COI de *Pseudacteon convexicauda* y ubicación geográfica de las muestras/poblaciones incluidas.

La filogenia de *Pseudacteon* spp. basada en ML presenta a *P. convexicauda* como un grupo monofilético con 100% de soporte bootstrap (Figura 4.7). Sin embargo, el soporte fue muy bajo para resolver las relaciones intraespecíficas de los fóridos de esta especie, además de que se observaron algunas politomías.

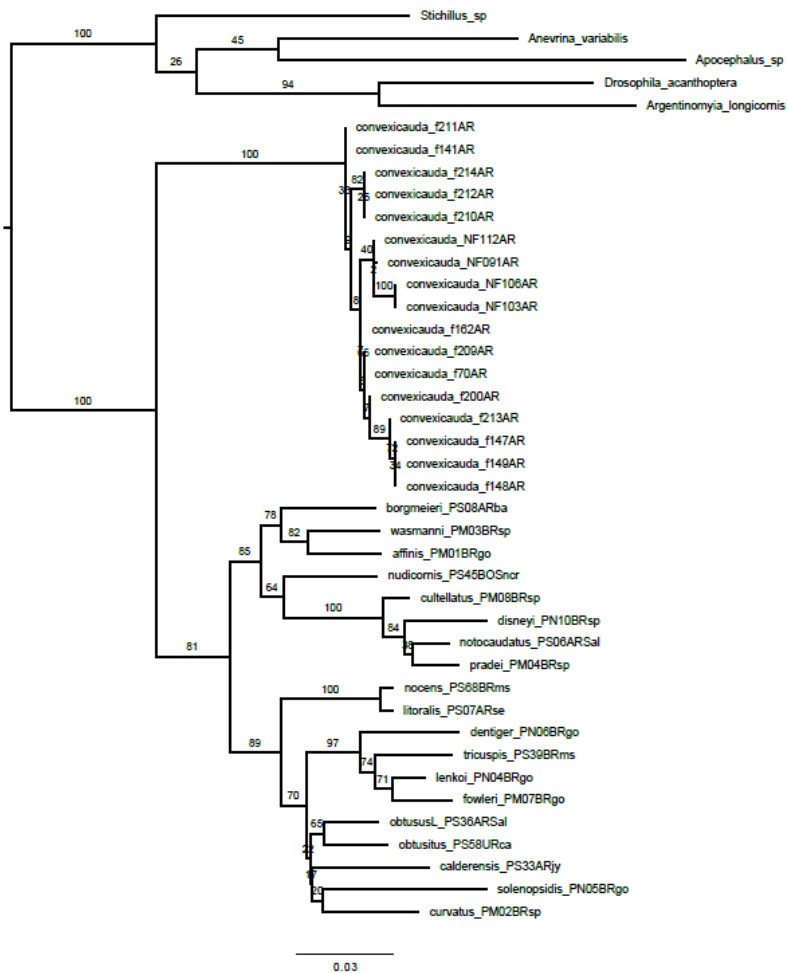


Figura 4.7. Filogenia de ML de fóridos *P. convexicauda*. Se indica el soporte de ultrafast Bootstrap en cada rama.

En la comparación de la topología de la filogenia de los fóridos con la de sus hospedadores (análisis cofilogenético), se observa que los fóridos que se asociaron a cada clado del hospedador se relacionan de manera parafilética (Fig. 4.8). Hubo un alto grado de correlación entre ambas filogenias, evidenciado por el resultado del estadístico “PACo”, ss 0,5375 ($p=0,001$), que mide la congruencia entre las topologías de las filogenias usando un análisis de Procrustes, mientras que el test “parafit” indica el soporte de la hipótesis nula de que la evolución de los dos grupos fue independiente ($p=0,419$).

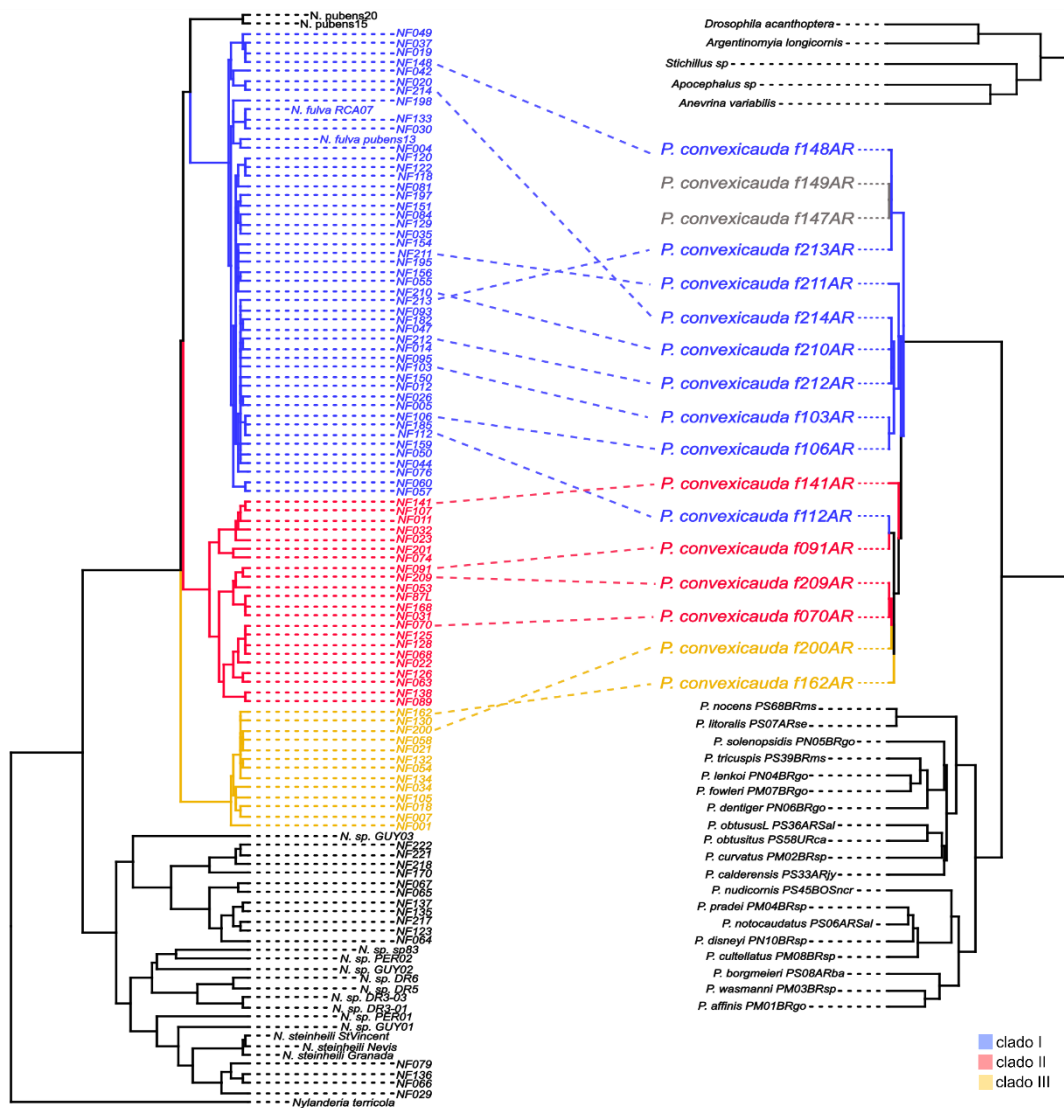


Figura 4.8. Comparación de la filogenia del hospedador (*N. fulva*) y su parasitoides (*P. convexicauda*). Las líneas punteadas que conectan a las dos filogenias unen a cada hospedador con su parasitoides. Los colores respetan la clasificación de *N. fulva* en tres clados mitocondriales.

Discusión

Wolbachia

Hemos detectado por primera vez la infección por *Wolbachia* en la hormiga invasora *Nylanderia fulva* en su rango nativo. Además, se encontró infección de este endosimbionte en otras dos especies, *N. silvestrii*, y en la especie de hormiga invasora *Paratrechina longicornis*. Las cepas que infectan a las especies de *Nylanderia* pertenecen al supergrupo A, mientras que la de *P. longicornis* se identificó como *wLonF*, del supergrupo F. Estos son los primeros registros de infección

por *Wolbachia* para las tres especies en esta región, así como el primer registro confirmado de invasión de *P. longicornis* en Argentina. La cepa que infecta a *P. longicornis*, *wLonF*, es principalmente de transmisión horizontal y está ampliamente distribuida en esta hormiga por todo el mundo (Tseng et al., 2019). Las *Wolbachia* que infectan a las hormigas pertenecen en su mayoría al supergrupo A, en segundo lugar al B y unas pocas excepciones al supergrupo F, concretamente *Paratrechina longicornis* y *Ocymyrmex picardi* (Kelly et al., 2019; Lefoulon et al., 2020). Encontramos que todas las *Wolbachia* que infectan especies de *Nylanderia* pertenecían al supergrupo A, consistente con lo observado en otras hormigas (Russell et al., 2009). No encontramos infección de *Wolbachia* en *Nylanderia guatemalensis*, una especie putativamente invasora en Argentina. Este resultado coincide con el observado en otras especies de hormigas invasoras, cuyas poblaciones introducidas no suelen estar infectadas (Shoemaker et al., 2000; Tsutsui et al., 2003). Además, no encontramos un patrón distintivo de distribución de nidos infectados/no infectados de *Nylanderia* en el área estudiada; se encontraron nidos infectados con *Wolbachia* en todo el noreste de Argentina, sudeste de Brasil y en algunas localidades de Paraguay y Uruguay.

Varios alelos de las muestras infectadas de *Nylanderia* no coincidían con aquellos de la base de datos MLST de *Wolbachia*. Reportamos 14 nuevos tipos de secuencias MLST, que incluyen 17 nuevos alelos: tres para *coxA*, cuatro para *hcpA*, ocho para *ftsZ* y dos para *fbpA*. Además, hallamos dos alelos nuevos para el gen *wsp*.

Diseñamos un nuevo conjunto de primers para un fragmento del gen de la subunidad alfa de la glicina-ARNt ligasa (*glyQ*) y un protocolo de PCR listo para utilizar. Este fragmento presenta cinco haplotipos diferentes para las cepas de *Wolbachia* muestreadas, y coincide en general con las estimaciones de diversidad de otros fragmentos génicos ampliamente utilizados, como *coxA* y *ftsZ*. Cuando se combinó con los *loci* MLST, recuperamos un número de haplotipos, o tipos de secuencia, igual al obtenido por la combinación de los cuatro *loci* MLST secuenciados. Con la disponibilidad de más de 20 genomas de *Wolbachia*, cada vez se cuenta con más información para realizar filogenias de *Wolbachia*. Chung et al. (2018) encontraron más especies de *Wolbachia* al usar genomas completos que el número de supergrupos reconocidos actualmente. En otras bacterias, como *Staphylococcus aureus* o *Haemophilus influenzae*, el sistema MLST se compone de más de cinco genes, por lo que la incorporación de un nuevo gen podría ser una adición interesante para el esquema MLST de *Wolbachia* (Enright et al., 2000; Meats et al., 2003). Además, dado que no se logró amplificar la mayoría de las muestras con uno de los genes MLST, *gatB*, y que los protocolos y primers establecidos aquí para *glyQ* tuvieron éxito, la posibilidad de incluir más genes al sistema

MLST puede ser útil en estos casos para una determinación más exhaustiva de los haplotipos de *Wolbachia*.

Aunque nuestros resultados muestran una alta tasa de infección por *Wolbachia* en algunos linajes de *N. fulva*, existe una limitación en nuestros hallazgos en relación al bajo número de hormigas muestreadas por nido. Las estimaciones de diversidad, así como los valores de prevalencia, deben tomarse como una primera aproximación, ya que deberían inspeccionarse más individuos por nido para comprender plenamente la prevalencia de *Wolbachia* en las poblaciones.

Se exploró la relación de las cepas de *Wolbachia* que infectan a *N. fulva* según los tres linajes propuestos para su hospedador, los clados I a III. Se encontraron cuatro linajes de *Wolbachia* infectando a *N. fulva*, aunque con diferente prevalencia; el clado I tiene el mayor número de nidos infectados, segundo está el clado III, y el clado II con el menor número de nidos infectados.

Encontramos una baja diversidad nucleotídica en los clados I y III de *N. fulva*, lo que puede estar relacionado con una putativa expansión poblacional o cuello de botella poblacional, pero también con invasiones recientes de simbioses, donde los barridos selectivos causan una menor diversidad de ADNmt, por lo que pueden confundirse fácilmente con los efectos de los primeros eventos (Hurst & Jiggins, 2005). En otras especies de insectos con infección parcial por *Wolbachia*, como fue el caso de *N. fulva*, el polimorfismo mitocondrial tiende a ser menor en los linajes infectados; además, en especies hermanas, la infección por *Wolbachia* se ha relacionado con la reducción del tamaño efectivo de la población (Cariou et al., 2017). Estudios recientes sugieren que *Wolbachia* podría causar especiación en su hospedador a través de la partenogénesis inducida; por ejemplo, en el gorgojo *Pantomorus postfasciatus*, todas las poblaciones no sexuales albergan *Wolbachia* mientras que las sexuales no están infectadas, y ambas se comportan como unidades evolutivas independientes (Elias-Costa et al., 2019). En la hormiga invasora *P. longicornis*, se sugirió que una infección ancestral por *Wolbachia* podría estar asociada a una especiación reciente en los clados de estas hormigas (Lee et al., 2020; Tseng et al., 2019). La alta prevalencia de *Wolbachia* en el clado I podría implicar una asociación íntima entre el simbiote y su hospedador, pero se necesitarían pruebas empíricas para explorar esta relación. Además, Eyer et al. (2018) no encontraron pruebas de reproducción partenogenética en *N. fulva*. No encontramos pruebas de desviación de la neutralidad en todos los estadísticos probados dentro de los clados que pudieran asociarse a un barrido selectivo, aunque los valores de los estadísticos fueron negativos, lo que puede relacionarse con un proceso de selección. No descartamos totalmente la posibilidad de un barrido selectivo inducido por *Wolbachia* debido al bajo tamaño del muestreo dentro de los nidos que puede subestimar la variabilidad intraespecífica. No hubo clados de *N. fulva* completamente no

infectados con *Wolbachia*, como ocurrió en otras especies. En conjunto, estos resultados compiten con la hipótesis de un barrido selectivo que afecta a un clado concreto. Se ha planteado la hipótesis de que la transferencia horizontal, así como un cierto grado de mezcla entre poblaciones sexuales y partenogénicas, puede alterar los efectos de una cepa transmitida verticalmente, dando lugar a una fijación incompleta de *Wolbachia* y, por tanto, oscureciendo los efectos del barrido selectivo (Kaur et al., 2021). Experimentos de aislamiento reproductivo podrían proporcionar información útil para validar esta posibilidad.

No fue posible conocer la coinfección de *Wolbachia* y fóridos en un mismo genotipo del hospedador, debido a que los fóridos fueron colectados atacando nidos como menor unidad de muestreo, mientras que las bacterias se identificaron a nivel de un individuo. Esta interacción puede aportar información valiosa para el desarrollo de estrategias de control biológico utilizando estos fóridos, si se detectara que la presencia de *Wolbachia* en el hospedador se asocia a algún detrimento sobre la efectividad del ataque de los fóridos. Este tipo de interacciones se ha observado, por ejemplo, en *Drosophila* infectadas con *Spiroplasma*, que se creería libera toxinas que disminuyen el fitness de nematodos parásitos, y en *Drosophila* infectadas con *Wolbachia* que competirían por el recurso del hospedador (colesterol) con virus patógenos (Gerardo & Parker, 2014).

Fóridos

La presencia de los fóridos *Pseudacteon convexicauda* en 17 nidos de *Nylanderia fulva* en tres provincias de Argentina, amplía la distribución conocida para esta especie. Se conocían algunos registros puntuales para esta especie de fórido en la provincia de Corrientes, Argentina, y fue mencionada su presencia San Pablo, Brasil, con lo cual su distribución parece coincidir con la de las demás especies de *Pseudacteon* de la región, que solapan por completo su distribución (Porter, 1998). Inicialmente, esta especie fue mencionada como enemigo natural de *Solenopsis*, pero hasta la fecha no se tiene registro de oviposición en las hormigas de fuego, sino que solo se registró sobrevolando a las obreras. Teniendo en cuenta que escasos casos de especies de este género tienen más de un hospedador de diferente género, y que las demás especies de *Pseudacteon* simpátricas que comparten una misma especie hospedadora presentan división de su nicho, ya sea por estar activas en diferente momento del día, atacar diferentes tamaños de obreras o a obreras que cumplen diferentes funciones dentro de la colonia (Porter, 1998), que se ha comprobado el ciclo de vida de estos fóridos sobre *N. fulva* y que encontramos solamente una especie de fórido

sobrevolando obreras de *N. fulva* en los 17 nidos inspeccionados, y ninguna otra especie de *Pseudacteon*, a pesar de que en esos sitios se distribuyen al menos otras siete especies, es que se considera muy poco probable que *P. convexicauda* sea efectivamente un parasitoide de las hormigas de fuego.

En el análisis filogenético realizado, se recuperó un único linaje monofilético que incluye a todas las muestras de *P. convexicauda*. Cuando se analizó la congruencia entre los linajes de esos fóridos con los clados del hospedador, no se detectó una congruencia evidente. Tampoco se encontró un patrón de congruencia al estudiar las relaciones de los haplotipos mitocondriales de los fóridos, que podrían presentar una mayor señal genética por su mayor tasa de mutación. Las relaciones intraespecíficas no pudieron ser estimadas con exactitud en la filogenia, al igual que se observó en otro trabajo donde se utilizaron los mismos marcadores de ADN (Sánchez-Restrepo et al., 2020).

La mayor parte de las especies conocidas de *Pseudacteon* pueden distinguirse fácilmente por la forma del oviscapo de las hembras (Porter & Pesquero, 2001). Sin embargo, la especie *P. gracilisetus* fue la primera especie de fórido en la que este carácter no fue suficiente para diferenciarla de *P. convexicauda*, especie con la cual se la confundió hasta la descripción realizada por Brown y colaboradores (2011). Estos fóridos atacan a *N. arenivaga* en los EEUU, con lo cual no comparten su distribución natural con *P. convexicauda*. Las diferencias que permiten separar a esas especies son el tamaño de las setas que recubren al ovipositor y las del sexto segmento, en las hembras (Brown et al., 2011). En un reciente trabajo, se estudiaron las relaciones filogenéticas de las especies de *Pseudacteon* que atacan hormigas de fuego *Solenopsis* spp.; descubren más de un linaje independiente por debajo del nivel de especie, e infieren que podrían existir más especies crípticas de los fóridos que las conocidas actualmente (Sánchez-Restrepo et al., 2020). En conclusión, existe la posibilidad de que haya algún nivel de variabilidad no detectado en los fóridos que atacan a los diferentes clados de *Nylanderia fulva*. Esta hipótesis puede ponerse a prueba utilizando técnicas tales como la microscopía electrónica de barrido o, más detalladamente, obteniendo imágenes en 3D a partir de tomografías.

Finalmente, nuestros resultados podrían también formar parte del compendio de estudios que indican que la asociación entre parásitos y sus hospedadores artrópodos sería moldeada no por la afinidad filogenética entre ellos, sino por una similitud ecológica (Murray et al., 2013).

Integración de los principales resultados y conclusiones generales

En este trabajo se exploraron diferentes metodologías para poner a prueba y/o encontrar evidencia sobre la hipótesis de que la especie *Nylanderia fulva* podría considerarse o no un complejo de especies. Si bien esta pregunta es interesante desde el punto de vista de la sistemática, en particular esta especie es relevante por ser una especie introducida e invasora en gran parte del continente Americano e islas del Caribe, que podría además alcanzar otras regiones del mundo (ya se registró su presencia en Europa, aunque las poblaciones parecen no haber prosperado). Estas hormigas presentan una preocupación en las regiones donde han invadido, por su naturaleza exógena, así como representan una clara amenaza a la biodiversidad y producción económica local, con lo cual el interés por el freno en su expansión es elevado. Se tomó como definición de especie aquella formulada por de Queiroz (2007): las especies son linajes de metapoblaciones que evolucionan independientemente. Dicha definición o concepto de especie generalizado se ve complementado por diferentes líneas de evidencia acerca de la separación de esos linajes (De Queiroz, 2007). A partir de una primera exploración sobre la diversidad de especies de *Nylanderia* en el sur de Sudamérica, encontramos una gran variabilidad dentro de lo considerado *Nylanderia fulva* a nivel del ADN mitocondrial. Esta evidencia fue un disparador para evaluar la estructuración genética de la especie y detectar posibles señales de procesos evolutivos relacionados a esa estructuración. Definimos a *N. fulva* como el conjunto de tres linajes mitocondriales monofiléticos, los clados I a III, y se exploró su asociación con otras fuentes de información. Los principales resultados se resumen a continuación:

- El ADN nuclear, estudiado mediante 13 *loci* microsatélites presenta señales de estructuración poblacional. Existirían al menos 8 a 13 clusteres o poblaciones en el noreste de Argentina y Uruguay. Muestran evidencias de que la especie tendría una organización social supercolonial.
- Los algoritmos de delimitación de especies aplicados sugieren un elevado número de especies, dentro de *N. fulva* se estimaron entre 8 y 13 posibles especies. En *N. pubens*, podrían definirse dos especies. Estos algoritmos, al menos aplicados a estas muestras y genes, no serían de utilidad para predecir especies ya que no estarían detectando adecuadamente el límite entre la variabilidad intra- e interespecífica.
- La variabilidad intraespecífica de *N. fulva* se estimó, en base al gen COI, en 1,6%, en *N. guatemalensis* 2,9% y en *N. silvestrii* 5,9%.

- A pesar de que se observa que uno de los clados de *N. fulva* es el único distribuido más hacia el oeste de Argentina (clado II), y el clado I el único, en apariencia, en el sur de Brasil, no encontramos soporte para una distribución de la variabilidad genética asociada a la distribución geográfica.
- Las pruebas de neutralidad indican evidencias de expansión poblacional o barrido selectivo en el clado I. Esto podría estar relacionado con la historia evolutiva de la especie en la región estudiada, que indica que el clado I se dispersa hacia toda la región mesopotámica en un corto período de tiempo evolutivo.
- Diversas fuentes de información presentan señales de estructuración poblacional en *N. fulva*: con loci microsatélite se estimaron 8-13 unidades panmícticas con muy bajo número de migrantes, mediante análisis moleculares de la varianza se determinó que la mayor variabilidad observada puede ser explicada por la organización en poblaciones, en comparación a regiones geográficas delimitadas por variables bioclimáticas, el estadístico F_{st} fue de 0,24 en base a los microsatélites y 0,77 en base al gen COI, en la red de haplotipos COI, todas las nuevas variantes aparecen en poblaciones cercanas geográficamente (lo que sugiere bajos niveles de dispersión).
- Los organismos con estrecha relación a *N. fulva*, *P. convexicauda* y *Wolbachia*, si bien presentaron señales que indicarían coevolución con su hospedador, muestran evidencias que sugieren reproducción entre, al menos, una fracción de las poblaciones de su hospedador que pertenecen a diferentes clados mitocondriales.

El conjunto de resultados indica que la estructuración poblacional de *N. fulva* en su rango nativo es marcada, y que la organización social de la especie podría describirse como supercolonial. El ADN mitocondrial presenta señales de selección o barrido selectivo en el clado I. Sin embargo, algunas poblaciones podrían experimentar cierto grado de mezcla, como se observó en los genotipos nucleares y porque algunas poblaciones están infectadas con una misma cepa de *Wolbachia*, de transferencia casi exclusivamente vertical. La variación intraespecífica detectada en *N. fulva* es relativamente alta, y resulta en la división en muchas especies cuando se aplican algoritmos de delimitación molecular. Este tipo de aproximaciones ha sido de mucha utilidad, mismo en la separación de *N. fulva* de su especie hermana y críptica, *N. pubens*, como de otras especies y géneros del grupo *Prenolepis*. Es posible que utilizando otro tipo de marcadores, con mayor representación del genoma, se obtengan resultados diferentes (aunque no siempre es el caso, como en Williams et al., 2022). La diferencia marcada entre linajes mitocondriales dentro de *N. fulva*, así como la cercana relación de los haplotipos COI de esa especie con los de *N. pubens*, mientras que

otras fuentes de información muestran evidencia de ausencia de barreras a la reproducción (fóridos, *Wolbachia*, aislamiento por distancia), indican evidencias que sugieren la potencial existencia de más de una unidad evolutiva independiente, por un lado, o de simplemente poblaciones con cierto grado de independencia entre sí, por el otro. Es posible que esta especie se encuentre en la “zona gris” mencionada por Roux y cols. (2016), y algunas de sus (meta)poblaciones estén atravesando un proceso de especiación que aún no se ha fijado, pero que puede reflejarse a través de los patrones observados en el ADN descritos en este trabajo. Asimismo, lo observado en el ADN mitocondrial podría reflejar la historia evolutiva de la especie, donde grupos de linajes estuvieron separados durante algún período, diferenciándose por vicarianza, pero que retomaron contacto y no ha transcurrido el tiempo suficiente para borrar la evidencia de dichos eventos. Un estudio taxonómico que abarque la mayor área posible de la distribución natural de la especie puede ayudar a distinguir las diferencias morfológicas, si es que existen, entre los linajes o potenciales especies del complejo *N. fulva*. Los análisis filogeográficos basados en hipótesis, que incorporan diferentes estimaciones de la demografía de las especies, pueden ser de utilidad para discernir entre las hipótesis contrastantes que se plantean sobre la historia evolutiva de *N. fulva*.

Bibliografía

- Aldana, R. C., Baena, M. L., & Chacón de Ulloa, P. (1995). Introducción de la hormiga loca (*Paratrechina fulva*) a la Reserva Natural Laguna de Sonso (Valle del Cauca, Colombia). *Bol. Mus. Entomol. Univ. Valle*, 3(1)(1), 15–28.
- Allio, R., Schomaker-Bastos, A., Romiguier, J., Prosdocimi, F., Nabholz, B., & Delsuc, F. (2020). MitoFinder: Efficient automated large-scale extraction of mitogenomic data in target enrichment phylogenomics. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 892–905. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13160>
- Angulo, E., Hoffmann, B. D., Ballesteros-Mejia, L., Taheri, A., Balzani, P., Bang, A., Renault, D., Cordonnier, M., Bellard, C., Diagne, C., Ahmed, D. A., Watari, Y., & Courchamp, F. (2022). Economic costs of invasive alien ants worldwide. *Biological Invasions*, 24(7), 2041–2060. <https://doi.org/10.1007/s10530-022-02791-w>
- Arana, M. D., Natale, E., Ferretti, N., Romano, G., Oggero, A., Posadas, P., & Morrone, J. J. (2021). Esquema Biogeográfico de la República Argentina. In *Opera Lilloana* (Vol. 56).
- Arcila, A. M., & Quintero, M. P. (2005). Impacto e historia de la introducción de la hormiga loca (*Paratrechina fulva*) a Colombia. *Grupo de Investigacion En Hormigas, Universidad Del Valle, May*.
- Arcusa, J. M. (2011). *Fenología invernal y primaveral temprana de las tres especies dominantes de hormigas (Hymenoptera; Formicidae) del humedal de la Sierra La Brava, Partido de Balcarce, Provincia de Buenos Aires*.
- Ascunce, M. S., Yang, C. C., Oakey, J., Calcaterra, L., Wu, W. J., Shih, C. J., Goudet, J., Ross, K. G., & Shoemaker, D. W. (2011). Global invasion history of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Science*, 331(6020), 1066–1068. <https://doi.org/10.1126/science.1198734>
- Awise, J. C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1nzfgj7>
- Baldo, L., Hotopp, J. C. D., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C. J., Tettelin, H., & Werren, J. H. (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7098–7110. <https://doi.org/10.1128/AEM.00731-06>
- Baty, J. W., Bulgarella, M., Dobelmann, J., Felden, A., & Lester, P. J. (2020). Viruses and their effects in ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, 30, 213–228. https://doi.org/10.25849/myrmecol.news_030:213

- Bertelsmeier, C., Ollier, S., Liebhold, A., & Keller, L. (2017). Recent human history governs global ant invasion dynamics. *Nature Ecology and Evolution*, *1*(7). <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0184>
- Bleidorn, C., & Gerth, M. (2018). A critical re-evaluation of multilocus sequence typing (MLST) efforts in *Wolbachia*. *FEMS Microbiology Ecology*, *94*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix163>
- Branstetter, M. G., Longino, J. T., Ward, P. S., & Faircloth, B. C. (2017). Enriching the ant tree of life: enhanced UCE bait set for genome-scale phylogenetics of ants and other Hymenoptera. *Methods in Ecology and Evolution*, *8*(6), 768–776. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12742>
- Brown, B. V., Schneider, S. A., & LaPolla, J. S. (2011). A New North American Species of *Pseudacteon* (Diptera: Phoridae), Parasitic on *Nylanderia arenivaga* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *104*(1), 37–38. <https://doi.org/10.1603/an10081>
- Bruch, C. (1915). Catálogo sistemático de los Formícidos argentinos. *Revista Del Museo de La Plata*, *19*(2), 211–234.
- Cabanne, G. S., Campagna, L., Trujillo-Arias, N., Naoki, K., Gómez, I., Miyaki, C. Y., Santos, F. R., Dantas, G. P. M., Aleixo, A., Claramunt, S., Rocha, A., Caparroz, R., Lovette, I. J., & Tubaro, P. L. (2019). Phylogeographic variation within the Buff-browed Foliage-gleaner (Aves: Furnariidae: *Syndactyla rufosuperciliata*) supports an Andean-Atlantic forests connection via the Cerrado. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *133*, 198–213. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.01.011>
- Calcaterra, L. A., Cuezco, F., Cabrera, S. M., & Briano, J. A. (2010). Ground Ant Diversity (Hymenoptera: Formicidae) in the Iberá Nature Reserve, the Largest Wetland of Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*, *103*(1), 71–83. <https://doi.org/10.1603/008.103.0110>
- Caragata, E. P., Rancès, E., Hedges, L. M., Gofton, A. W., Johnson, K. N., O'Neill, S. L., & McGraw, E. A. (2013). Dietary Cholesterol Modulates Pathogen Blocking by *Wolbachia*. *PLoS Pathogens*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003459>
- Cariou, M., Duret, L., & Charlat, S. (2017). The global impact of *Wolbachia* on mitochondrial diversity and evolution. *Journal of Evolutionary Biology*, *30*, 2204–2210. <https://doi.org/10.1111/jeb.13186>
- Chifflet, L., Rodriguero, M. S., Calcaterra, L. A., Rey, O., Dinghi, P. A., Baccaro, F. B., Souza, J. L. P., Follett, P., & Confalonieri, V. A. (2016). Evolutionary history of the little fire ant *Wasmannia*

- auropunctata before global invasion: Inferring dispersal patterns, niche requirements and past and present distribution within its native range. *Journal of Evolutionary Biology*, 29(4), 790–809. <https://doi.org/10.1111/jeb.12827>
- das Chagas Rabelo, R. (2015). *Estudo sobre as formigas (hymenoptera: formicidae) da reserva mocambo, Belém, Pará, Brasil*. Universidade do Estado do Pará.
- De Queiroz, K. (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879–886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- de Zolessi, L. C., de Abenante, Y. P., & Philippi, M. E. (1987). Lista sistemática de las especies de formícidos del Uruguay. *Comunicaciones Zoológicas Del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 11(165), 1–9.
- Della Lucia, T. C. M. (2003). Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. In F. Fernández (Ed.), *Introducción a las hormigas de la región Neotropical* (pp. 337–349).
- Demétrio, M. F., Silvestre, R., De Souza, P. R., & Aoki, C. (2017). Inventário da fauna de formigas (Hymenoptera, Formicidae) no Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia - Serie Zoologia*, 107, 1–12. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2017126>
- Do Prado, L. P., Feitosa, R. M., Triana, S. P., Gutiérrez, J. A. M., Rousseau, G. X., Silva, R. A., Siqueira, G. M., Dos Santos, C. L. C., Silva, F. V., Da Silva, T. S. R., Casadei-Ferreira, A., Da Silva, R. R., & Andrade-Silva, J. (2019). An overview of the ant fauna (Hymenoptera: Formicidae) of the state of Maranhão, Brazil. *Papeis Avulsos de Zoologia*, 59, 0–4. <https://doi.org/10.11606/1807-0205/2019.59.38>
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., & Hurst, G. D. (2008). The diversity of reproductive parasites among arthropods: Wolbachia do not walk alone. *BMC Biology*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-27>
- Elias-Costa, A. J., Confalonieri, V. A., Lanteri, A. A., & Rodriguero, M. S. (2019). Game of clones: Is Wolbachia inducing speciation in a weevil with a mixed reproductive mode? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 133, 42–53. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2018.12.027>
- Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., & Spratt, B. G. (2000). Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus Aureus*. *J Clin Microbiol*, 38(3), 1008–1015. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1008-1015.2000>
- Eyer, P. A., McDowell, B., Johnson, L. N. L., Calcaterra, L. A., Fernandez, M. B., Shoemaker, D., Puckett, R. T., & Vargo, E. L. (2018). Supercolonial structure of invasive populations of the

- tawny crazy ant *Nylanderia fulva* in the US. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 2007.
<https://doi.org/10.1186/s12862-018-1336-5>
- Ezard, T., Fujisawa, T., & Barraclough, T. (2021). *splits: SPecies' Limits by Threshold Statistics* (1.0-20/r56).
- Fernández, F. (2000). Notas taxonómicas sobre la “hormiga loca” (Hymenoptera: Formicidae: *Paratrechina fulva*) en Colombia. In *Rev. Colomb. Entomol.* (Vol. 26, pp. 145–149).
- Fernández, F. (2003). Introducción a las hormigas de la región Neotropical. *Director*, 19(5), 398.
- Flucher, S. M., Krapf, P., Arthofer, W., Suarez, A. V., Crozier, R. H., Steiner, F. M., & Schlick-Steiner, B. C. (2021). Effect of social structure and introduction history on genetic diversity and differentiation. *Molecular Ecology*, March, 1–17. <https://doi.org/10.1111/mec.15911>
- Fontenla, J., & Matienzo, Y. (2011). Hormigas Invasoras Y Vagabundas De Cuba. *Fitosanidad*, 15(4), 253–259.
- Forel, A. (1915). Formicides d’Afrique et d’Amerique. In *Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles* (Vol. 50, pp. 335–364).
- Fournier, D., Estoup, A., Orivel, J., Foucaud, J., Jourdan, H., Le Breton, J., & Keller, L. (2005). Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. *Nature*, 435(7046), 1230–1234.
<https://doi.org/10.1038/nature03705>
- Fu, Y. X. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133, 693–709.
- Garnas, J. R., Auger-Rozenberg, M.-A., Roques, A., Bertelsmeier, C., Wingfield, M. J., Saccaggi, D. L., Roy, H. E., & Slippers, B. (2016). Complex patterns of global spread in invasive insects: eco-evolutionary and management consequences. *Biological Invasions*, 18(4), 935–952.
<https://doi.org/10.1007/s10530-016-1082-9>
- Gerardo, N. M., & Parker, B. J. (2014). Mechanisms of symbiont-conferred protection against natural enemies: An ecological and evolutionary framework. *Current Opinion in Insect Science*, 4(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2014.08.002>
- Gomila, C., LeBrun, E. G., Plowes, R. M., & Folgarait, P. J. (2017). Primer registro de una mosca parasitoide (Diptera: Phoridae) especialista de *Nylanderia fulva* (Hymenoptera: Formicidae): ciclo de vida, dimorfismo sexual y fenología. *VI Reunion Argentina de Parasitoidologos*, 10.
- Gotzek, D., Brady, S. G., Kallal, R. J., & LaPolla, J. S. (2012). The Importance of Using Multiple Approaches for Identifying Emerging Invasive Species: The Case of the Raspberry Crazy Ant in the United States. *PLoS ONE*, 7(9), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045314>
- Guilherme, D. R., Pequeno, P. A. C. L., Baccaro, F. B., Franklin, E., dos Santos Neto, C. R., & Souza, J. L. P. (2022). Direct and indirect effects of geographic and environmental factors on ant beta

diversity across Amazon basin. *Oecologia*, 198(1), 193–203. <https://doi.org/10.1007/s00442-021-05083-7>

Hanisch, P. E., Lavinia, P. D., Suarez, A. V., Lijtmaer, D. A., Leponce, M., Paris, C. I., & Tubaro, P. L. (2017). Mind the gap! Integrating taxonomic approaches to assess ant diversity at the southern extreme of the Atlantic Forest. *Ecology and Evolution*, 7(23), 10451–10466. <https://doi.org/10.1002/ECE3.3549>

Hawkins, B. A., Field, R., Cornell, H. V., Currie, D. J., Guégan, J. F., Kaufman, D. M., Kerr, J. T., Mittelbach, G. G., Oberdorff, T., O'Brien, E. M., Porter, E. E., & Turner, J. R. G. (2003). ENERGY, WATER, AND BROAD-SCALE GEOGRAPHIC PATTERNS OF SPECIES RICHNESS. *Ecology*, 84(12), 3105–3117. <https://doi.org/10.1890/03-8006>

Hernández, C. P., Martínez, Y. P., Insuasty, O., Gómez, L. A., Camacho, J. A., & Manrique, R. (2002). Efecto del control de malezas y la fertilización nitrogenada sobre la población de homiga loca, *Paratrechina fulva* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 28(1), 83–90.

Holway, D. A., Lach, L., Suarez, A. V., Tsutsui, N. D., & Case, T. J. (2002). The causes and consequences of ant invasions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 181–233. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150444>

Hurst, G. D. D., & Jiggins, F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: The effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1572), 1525–1534. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3056>

ISAC, I. S. A. C. (2016). Invasive Species Impacts on Infrastructure. In *Doi.Gov* (pp. 1–12). U.S. Department of the Interior.

Josens, R., Sola, F. J., Marchisio, N., Di Renzo, M. A., & Giacometti, A. (2014). Knowing the enemy: ant behavior and control in a pediatric hospital of Buenos Aires. *SpringerPlus*, 3, 229. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-229>

Josens, R., Sola, F., Lois-Milevich, J., & Mackay, W. (2017a). Urban ants of the city of Buenos Aires, Argentina: species survey and practical control. *International Journal of Pest Management*, 63(3), 213–223. <https://doi.org/10.1080/09670874.2016.1239035>

Josens, R., Sola, F., Lois-Milevich, J., & Mackay, W. (2017b). Urban ants of the city of Buenos Aires, Argentina: species survey and practical control. *International Journal of Pest Management*, 63(3), 213–223. <https://doi.org/10.1080/09670874.2016.1239035>

- Kallal, R. J., & Lapolla, J. S. (2012). Monograph of nylanderia (Hymenoptera: Formicidae) of the world, part II: Nylanderia in the nearctic. *Zootaxa*, 9(3508), 1–64.
- Kaur, R., Shropshire, J. D., Cross, K. L., Leigh, B., Mansueto, A. J., Stewart, V., Bordenstein, S. R., & Bordenstein, S. R. (2021). Living in the endosymbiotic world of Wolbachia: A centennial review. *Cell Host and Microbe*, 29(6), 879–893. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.006>
- Kelly, M., Price, S. L., de Oliveira Ramalho, M., & Moreau, C. S. (2019). Diversity of Wolbachia Associated with the Giant Turtle Ant, *Cephalotes atratus*. *Current Microbiology*, 76(11), 1330–1337. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01722-8>
- Kempf, W. W. (1972). Catálogo Abreviado das formigas da Região Neotropical (Hymenoptera: Formicidae). In *Studia Entomologica* (Vol. 15, pp. 1–344).
- Kumar, S., LeBrun, E. G., Stohlgren, T. J., Stabach, J. A., McDonald, D. L., Oi, D. H., & LaPolla, J. S. (2015). Evidence of niche shift and global invasion potential of the tawny crazy ant, *Nylanderia fulva*. *Ecology and Evolution*, 5(20), 4628–4641. <https://doi.org/10.1002/ece3.1737>
- Kusnezov, N. (1978). *Hormigas argentinas: clave para su identificacion* (R. Golbach, Ed.). Fundacion Miguel Lillo.
- Lach, L., Parr, C. L., & Abbott, K. L. (2009). Ant Ecology. *Ant Ecology*, 1–424. <https://doi.org/10.1093/ACPROF:OSO/9780199544639.001.0001>
- Lambrechts, L., Fellous, S., & Koella, J. C. (2006). Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends in Parasitology*, 22(1), 12–16. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2005.11.008>
- LaPolla, J. S. (2009). Taxonomic Revision of the Southeast Asian Ant Genus *Euprenolepis*. *Zootaxa*, 2046(1), 1–25. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2046.1.1>
- Lapolla, J. S., Brady, S. G., & Shattuck, S. O. (2010a). Phylogeny and taxonomy of the *Prenolepis* genus-group of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Systematic Entomology*, 35(1), 118–131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.00492.x>
- Lapolla, J. S., Brady, S. G., & Shattuck, S. O. (2010b). Phylogeny and taxonomy of the *Prenolepis* genus-group of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Systematic Entomology*, 35(1), 118–131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.00492.x>
- Lapolla, J. S., Brady, S. G., & Shattuck, S. O. (2011a). Monograph of *Nylanderia* (Hymenoptera: Formicidae) of the World: *Zootaxa*, 9(3110), 1–9.

- Lapolla, J. S., Brady, S. G., & Shattuck, S. O. (2011b). Monograph of Nylanderia (Hymenoptera: Formicidae) of the World: An introduction to the systematics and biology of the genus. *Zootaxa*, 3110, 1–9. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3110.1.1>
- Lapolla, J. S., & Kallal, R. J. (2019). Nylanderia of the world Part III: Nylanderia in the West Indies. *Zootaxa*, 4658(3), 401–451. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4658.3.1>
- LeBrun, E. G., Abbott, J., & Gilbert, L. E. (2013). Imported crazy ant displaces imported fire ant, reduces and homogenizes grassland ant and arthropod assemblages. *Biological Invasions*, 15(11), 2429–2442. <https://doi.org/10.1007/s10530-013-0463-6>
- LeBrun, E. G., Plowes, R. M., Folgarait, P. J., Bollazzi, M., & Gilbert, L. E. (2019). Ritualized aggressive behavior reveals distinct social structures in native and introduced range tawny crazy ants. *PLoS ONE*, 14(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225597>
- Lee, C. C., Lin, C. Y., Tseng, S. P., Matsuura, K., & Yang, C. C. S. (2020). Ongoing coevolution of wolbachia and a widespread invasive ant, *Anoplolepis gracilipes*. *Microorganisms*, 8(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101569>
- Lefoulon, E., Foster, J. M., Truchon, A., Carlow, C. K. S., & Slatko, B. E. (2020). The Wolbachia Symbiont: Here, There and Everywhere. In M. Kloc (Ed.), *Symbiosis: Cellular, Molecular, Medical and Evolutionary Aspects* (1st ed., Vol. 69, pp. 423–451). Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-51849-3>
- Leigh, J. W., & Bryant, D. A. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116.
- Luo, A., Ling, C., Ho, S. Y. W., & Zhu, C. D. (2018). Comparison of methods for molecular species delimitation across a range of speciation scenarios. *Systematic Biology*, 67(5), 830–846. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy011>
- Lutinski, J. A., Ahlert, C. C., De Freitas, B. R., Trautmann, M. M., Tancredo, S. P., & Mello Garcia, F. R. (2015). Ants (Hymenoptera: Formicidae) in hospitals of southern Brazil. *Revista Colombiana de Entomologia*, 41(2), 235–240.
- MacGown, J. A., & Layton, B. (2010). The invasive raspberry crazy ant, *Nylanderia* sp. near *pubens* (Hymenoptera: Formicidae), reported from Mississippi. *Midsouth Entomol.*, 3(1)(January 2010), 44–47.
- Martínez Montoya, Y. P. (2008). *Contribución al conocimiento del género Paratrechina Montschulsky (1863) (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae) de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia.

- Mcdonald, D. L. (2012). *Investigation of an invasive ant species: Nylanderia fulva Colony extraction, management, diet preference, fecundity, and mechanical vector potential* (Issue December). Texas A&M University.
- Meats, E., Feil, E. J., Stringer, S., Cody, A. J., Goldstein, R., Kroll, J. S., Popovic, T., & Spratt, B. G. (2003). Characterization of Encapsulated and Noncapsulated Haemophilus Influenzae and Determination of Phylogenetic Relationships by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol*, *41*(4), 1623–1636. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/jcm.41.4.1623-1636.2003>
- Morrone, J. J., Escalante, T., Rodriguez-Tapia, G., Carmona, A., Arana, M., & Mercado-Gomez, J. D. (2022). Biogeographic regionalization of the Neotropical region: New map and shapefile. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, *94*(1), e20211167. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220211167>
- Mundim, F. M., & Gibson, A. K. (2022). A diverse parasite pool can improve effectiveness of biological control constrained by genotype-by-genotype interactions. *Evolutionary Applications*, *15*(12), 2078–2088. <https://doi.org/10.1111/EVA.13501>
- Murray, E. A., Carmichael, A. E., & Heraty, J. M. (2013). Ancient host shifts followed by host conservatism in a group of antparasitoids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *280*. <https://doi.org/0.1098/rspb.2013.0495>
- Nieves-González, J. J. (1999). *Manejo: Prevención y control de la hormiga loca*.
- Oliveira, M. A., Delia Lucia, T. M. C., Marinho, C. G. S., Delabie, J. H. C., & Morato, E. R. (2009). Ant diversity in an area of the Amazon Forest in acre, Brazil. *Sociobiology*, *54*(1), 243–267.
- Oliver, K. M., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2005). Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(36), 12795–12800. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0506131102/ASSET/DE82E7F3-6BFB-48D2-828B-3446C12A1EE1/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0350593720002.JPEG>
- Olson, D. M., Dinerstein, E., Wikramanayake, E. D., Burgess, N. D., Powell, G. V. N., Underwood, E. C., D’Amico, J. A., Itoua, I., Strand, H. E., Morrison, J. C., Loucks, C. J., Allnutt, T. F., Ricketts, T. H., Kura, Y., Lamoreux, J. F., Wettengel, W. W., Hedao, P., & Kassem, K. R. (2001). Terrestrial ecoregions of the world: A new map of life on Earth. *BioScience*, *51*(11), 933–938. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0933:TEOTWA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0933:TEOTWA]2.0.CO;2)
- Pagés, H., Aboyou, R., Gentleman, R., & DebRoy, S. (2019). *Biostrings: Efficient manipulation of biological strings* (2.54.0).

- Pazmiño-Palomino, A., Mendoza, J., & Brito-Vera, G. A. (2020). First Record of Invasive Tawny Crazy Ant *Nylanderia fulva* (Mayr) (Hymenoptera: Formicidae) in Continental Ecuador and Notes on Its Ecology in Sugarcane Crops. *Neotropical Entomology*, *49*(1), 147–150. <https://doi.org/10.1007/s13744-019-00709-1>
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, *6*, 288–295.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, *28*, 2537–2539.
- Pesquero, M. A., Elias Filho, J., Carneiro, L. C., Feitosa, S. B., Oliveira, M. A. C., & Quintana, R. C. (2008). Formigas em ambiente hospitalar e seu potencial como transmissoras de bactérias. *Neotropical Entomology*, *37*(4), 472–477. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2008000400017>
- Porter, S. D. (1998). Biology and Behavior of Pseudacteon Decapitating Flies (Diptera: Phoridae) That Parasitize *Solenopsis* Fire Ants (Hymenoptera: Formicidae). *The Florida Entomologist*, *81*(3), 292–309.
- Porter, S. D., & Pesquero, M. A. (2001). Illustrated Key to Pseudacteon Decapitating Flies (Diptera: Phoridae) That Attack *Solenopsis saevissima* Complex Fire Ants in South America. *The Florida Entomologist*, *84*(4), 691. <https://doi.org/10.2307/3496403>
- Prebus, M. M. (2021). Phylogenomic species delimitation in the ants of the *Temnothorax salvini* group (Hymenoptera: Formicidae): an integrative approach. *Systematic Entomology*, *46*(2), 307–326. <https://doi.org/10.1111/syen.12463>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*(2), 945–959. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/155.2.945>
- Puechmaille, S. J. (2016). The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular Ecology Resources*, *16*(3), 608–627. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12512>
- Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, *21*(2), 609–620. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
- Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, *19*(12), 2092–2100.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding. *Molecular Ecology Notes*, *7*(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2007.01678.X>

- Rentaría, M. (2007). Ecología molecular. In *Ecología Molecular* (Issue May).
- Resende, H. C., Yotoko, K. S. C., Delabie, J. H. C., Costa, M. A., Campiolo, S., Tavares, M. G., Campos, L. A. O., & Fernandes-Salomão, T. M. (2010). Pliocene and Pleistocene events shaping the genetic diversity within the central corridor of the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, *101*(4), 949–960. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01534.x>
- Rodriguero, M. S. (2013). Wolbachia, a pandemic with potential. *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, *72*(3–4), 117–137.
- Rouchet, R., & Vorburger, C. (2014). Experimental evolution of parasitoid infectivity on symbiont-protected hosts leads to the emergence of genotype specificity. *Evolution*, *68*(6), 1607–1616. <https://doi.org/10.1111/EVO.12377>
- Roux, C., Fraïsse, C., Romiguier, J., Anciaux, Y., Galtier, N., & Bierne, N. (2016). Shedding Light on the Grey Zone of Speciation along a Continuum of Genomic Divergence. *PLOS Biology*, *14*(12), e2000234. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.2000234>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-García, A. (2017). DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *34*, 3299–3302.
- Russell, J. A., Goldman-Huertas, B., Moreau, C. S., Baldo, L., Stahlhut, J. K., Werren, J. H., & Pierce, N. E. (2009). Specialization and geographic isolation among Wolbachia symbionts from ants and lycaenid butterflies. *Evolution*, *63*(3), 624–640. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00579.x>
- Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S., Lodge, D. M., Molofsky, J., With, K. A., Baughman, S., Cabin, R. J., Cohen, J. E., Ellstrand, N. C., McCauley, D. E., O’Neil, P., Parker, I. M., Thompson, J. N., & Weller, S. G. (2001). The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *32*(November), 305–332. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114037>
- Sánchez-Restrepo, A. F., Chifflet, L., Confalonieri, V. A., Tsutsui, N. D., Pesquero, M. A., & Calcaterra, L. A. (2020). A species delimitation approach to uncover cryptic species in the South American fire ant decapitating flies (Diptera : Phoridae : *PLoS ONE*, *15*(7), e0236086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236086>
- Sandoval-Arango, S., Branstetter, M. G., Cardoso, C. F., & López-Urbe, M. M. (2023). Phylogenomics reveals within species diversification but incongruence with color phenotypes

- in widespread orchid bees (Hymenoptera: Apidae: Euglossini). *Insect Systematics and Diversity*, 7(2), 1–13. <https://doi.org/10.1093/isd/ixad005>
- Schwarzfeld, M. D., & Sperling, F. A. H. (2015). Comparison of five methods for delimitating species in *Ophion* Fabricius, a diverse genus of parasitoid wasps (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 93, 234–248. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.08.003>
- Sharma, S., Oi, D. H., & Buss, E. A. (2013). Honeydew-Producing Hemipterans in Florida Associated with *Nylanderia fulva* (Hymenoptera: Formicidae), an Invasive Crazy Ant. *Florida Entomologist*, 96(2), 538–547. <https://doi.org/10.1653/024.096.0219>
- Shoemaker, D. D., Ross, K. G., Keller, L., Vargo, E. L., & Werren, J. H. (2000). Wolbachia infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis* spp.). *Insect Molecular Biology*, 9(6), 661–673.
- Snelling, R. R., & Hunt, J. H. (1975). The ants of Chile. *Revista Chilena de Entomologia*, 9, 63–129.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Trager, J. C. (1984). A revision of the genus *Paratrechina* (Hymenoptera: Formicidae) of the continental United States. In *Sociobiology* (Vol. 9, pp. 49–162).
- Tseng, S. P., Wetterer, J. K., Suarez, A. V., Lee, C. Y., Yoshimura, T., Shoemaker, D. W., & Yang, C. C. S. (2019). Genetic Diversity and Wolbachia Infection Patterns in a Globally Distributed Invasive Ant. *Frontiers in Genetics*, 10(September), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00838>
- Tsutsui, N. D., Kauppinen, S. N., Oyafuso, A. F., & Grosberg, R. K. (2003). The distribution and evolutionary history of Wolbachia infection in native and introduced populations of the invasive argentine ant (*Linepithema humile*). *Molecular Ecology*, 12(11), 3057–3068. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01979.x>
- Van Driesche, R. G., & Bellows, T. S. Jr. (1996). Biological Control. In *Nucl. Phys.* (1st ed.). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1157-7>
- Vogel, V., Pedersen, J. S., Giraud, T., Krieger, M. J. B., & Keller, L. (2010). The worldwide expansion of the Argentine ant. *Diversity and Distributions*, 16(1), 170–186. <https://doi.org/10.1111/J.1472-4642.2009.00630.X>
- Wachkoo, A. A., & Bharti, H. (2015). Taxonomic review of ant genus *Nylanderia* Emery, 1906 (Hymenoptera: Formicidae) in India. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 8(2), 105–120. <https://doi.org/10.1016/j.japb.2015.04.007>

- Wang, Z., Moshman, L., Kraus, E. C., Wilson, B. E., Acharya, N., & Diaz, R. (2016). A review of the tawny crazy ant, *Nylanderia fulva*, an emergent ant invader in the southern United States: Is biological control a feasible management option? *Insects*, *7*(4).
<https://doi.org/10.3390/insects7040077>
- Ward, P. S. (2000). Broad-scale patterns of diversity in leaf-litter ant communities. In D. Agosti, J. D. Majer, L. A. Alonso, & T. R. Schultz (Eds.), *Ants: Standard methods for measuring and monitoring biodiversity* (pp. 99–121). Smithsonian Institution Press.
- Wild, A. L. (2007a). A catalogue of the ants of Paraguay (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*, *55*(1622), 1–55. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1622.1.1>
- Wild, A. L. (2007b). A catalogue of the ants of Paraguay (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*, *55*(1622), 1–55. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1622.1.1>
- Williams, J. L., & Lucky, A. (2020). Non-native and Invasive *Nylanderia* Crazy Ants (Hymenoptera: Formicidae) of the World: Integrating Genomics to Enhance Taxonomic Preparedness. *Annals of the Entomological Society of America*, *113*(4), 318–336.
<https://doi.org/10.1093/aesa/saz039>
- Williams, J. L., Zhang, Y. M., LaPolla, J. S., Schultz, T. R., & Lucky, A. (2022). Phylogenomic Delimitation of Morphologically Cryptic Species in Globetrotting *Nylanderia* (Hymenoptera: Formicidae) Species Complexes. *Insect Systematics and Diversity*, *6*(1).
<https://doi.org/10.1093/ISD/IXAB027>
- Williams, J. L., Zhang, Y. M., Lloyd, M. W., LaPolla, J. S., Schultz, T. R., & Lucky, A. (2020). Global domination by crazy ants: phylogenomics reveals biogeographical history and invasive species relationships in the genus *Nylanderia* (Hymenoptera: Formicidae). *Systematic Entomology*, *45*(4), 730–744. <https://doi.org/10.1111/syen.12423>
- Wright, S. (1943). Isolation by Distance. *Genetics*, *28*(2), 114.
<https://doi.org/10.1093/GENETICS/28.2.114>
- Zenner-Polania, I. (1990). Biological aspects of the “hormiga loca”, *Paratrechina* (*Nylanderia*) *fulva* (Mayr). In R. K. Vander Meer, K. Jaffe, & A. Cedeno (Eds.), *Applied Myrmecology: A World Perspective* (pp. 290–297). Westview Press.
- Zhao, L., Chen, J., Jones, W. A., Oi, D. H., & Dress, B. M. (2012). Molecular Comparisons Suggest Caribbean Crazy Ant From Florida and Raspberry Crazy Ant From Texas (Hymenoptera: Formicidae: *Nylanderia*) Are the Same Species. *Molecular Ecology and Evolution*, *41*(4), 1008–1018. <https://doi.org/10.1603/en11287st1>

Anexo

Material suplementario

Capítulo 2

A2.1. Metodología aplicada para amplificar por PCR muestras con ADN degradado:

- Aumento de la temperatura de annealing de 50 a 52°C, en pasos de a un grado, y templado de ADN de 4 ul (en vez de 1 ul en protocolo COI). La temperatura de annealing aumenta la especificidad de la reacción, mientras que mayor cantidad de templado puede aumentar el total de replicación. En algunos casos se obtuvo amplificación, pero en otros no para ambos genes COI y wnt.
- Aumento de la cantidad de repeticiones de los ciclos de replicación de 35 a 40, aumento del tiempo de annealing en 30 segundos y templado de ADN de 4 ul. Las repeticiones del ciclo de amplificación pueden aumentar la cantidad de producto final, mientras que el tiempo de annealing mayor puede dar lugar a que más polimerasa se una al templado de ADN cuando esta unión no es tan específica (por la degradación de ADN). Se probó tanto en muestras que anteriormente amplificaron con el protocolo usual como en muestras problemáticas, para el gen COI. En las primeras, se obtuvo una amplificación aparentemente normal*, mientras que en las últimas se obtuvo en algunos casos dos bandas de producto, y en otros una sola banda que se secuenció correctamente. El aumento del tiempo de annealing y de los ciclos puede favorecer el emparejamiento inespecífico del primer, obteniéndose más de una banda de amplificado. * no se comprobó el resultado mediante secuenciación.
- PCR anidada: Realizar una segunda PCR utilizando como templado el resultado de la primera, primero amplificando con primers que amplifican un fragmento, y en un segundo paso con primers internos al fragmento amplificado. La primera ronda de PCR se realizó con la siguiente modificación del protocolo original y utilizando los primers LCO y Pat: 40 ciclos en total, annealing durante 1 min 30 seg y elongación durante 1 min 30 seg. La segunda ronda de PCR se realizó usando como templado 2,5 ul del amplificado de la PCR anterior, usando los primers Jerry y Pat y con la siguiente modificación del protocolo: 30 ciclos de desnaturalización por 30 seg, annealing por 30 seg y elongación por 2 min. Se obtuvieron amplificaciones dobles en algunas muestras y simple banda en otras; se incluyeron en las pruebas muestras no problemáticas, que amplificaron correctamente con el nuevo protocolo.

- En conclusión, en algunos casos se logró amplificar con las modificaciones del protocolo de PCR y en otros no, cada muestra se comportó diferente, no se pudo seleccionar una de las modificaciones que rindiera más resultados positivos que otra.

Tabla A2.1. Selección de outgroups y especies de *Nylanderia* neotropicales y su origen geográfico.

<i>Lasius niger</i>	Eurasia
<i>Prenolepis imparis</i>	Norteamérica
<i>Euprenolepis procera</i>	Indomalasia
<i>Zatania albimaculata</i>	Antillas
Ny088_N_lucayana	Bahamas (Antillas)
<i>N concinna</i>	EEUU
<i>N caerulea</i>	República Dominicana
<i>Nylanderia vividula</i>	Americana
<i>N dodo</i>	Madagascar
<i>N faisonensis</i>	Islas Mascareñas (Africa)
N steinheili StVincent	San Vicente (Antillas)
Ny056_N_steinheili	Florida, EEUU
Ny093_N_guatemalensis	San Vicente (Antillas)
Ny104_N_guatemalensis	Santa Lucía (Antillas)
Ny102_JKW1	Montserrat (Antillas)
N_pubens20	Saint Kitts (Antillas)
N_pubens19	Anguilla (Antillas)
N_pubens15	Anguilla (Antillas)
<i>N esperanza</i>	República Dominicana
Ny086_N_cf-fulva	Saint Martin (Antillas)
Ny087_N_pubens	Florida, EEUU
pubens22	Florida, EEUU
pubens23	Florida, EEUU
pubens02	Florida, EEUU
pubens13	Islas Vírgenes de los EEUU
fulva24	Paraguay
Ny054	Texas, EEUU
Ny055	Florida, EEUU
Ny067	Puerto Rico
Ny085	Méjico
Ny112_FG05	Guyana Francesa
Ny123	Cuba
Ny191	Mississippi, EEUU
Ny128_Col2	Colombia
N_GUY01	Guyana
N_GUY02	Guyana
N_GUY03	Guyana
N_PER01	Perú
N_PER02	Perú
Ny188_FG07	Guyana Francesa
N. sp83	Bahamas (Antillas)

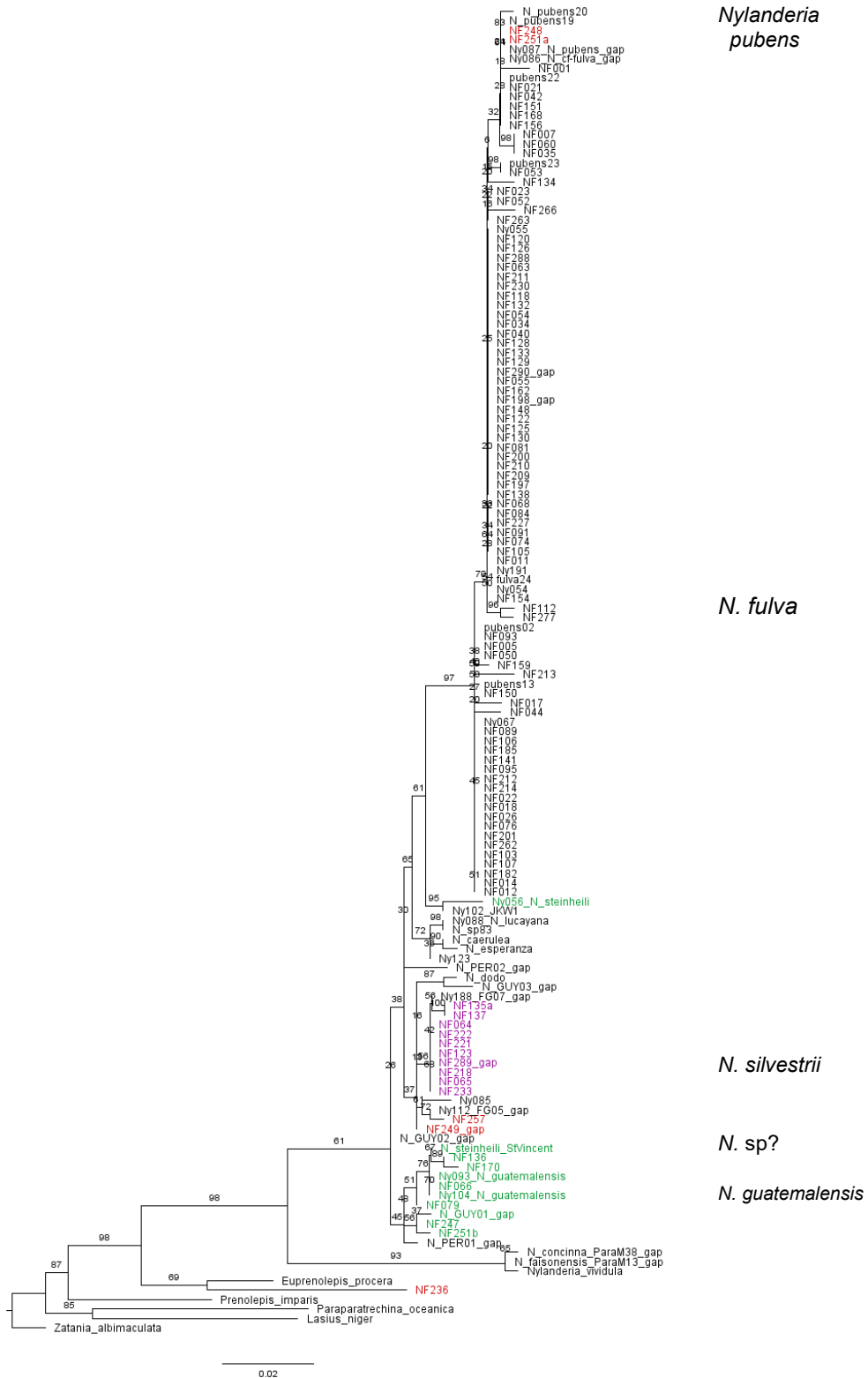


Figura A2.2. Filogenia de *Nylanderia* spp. de máxima verosimilitud estimada en base al gen *wingless*. Los valores de soporte de ultrafast Bootstrap se indican en las ramas. Se colorearon las secuencias propias que representan especies diferentes a *N. fulva*.

Capítulo 3

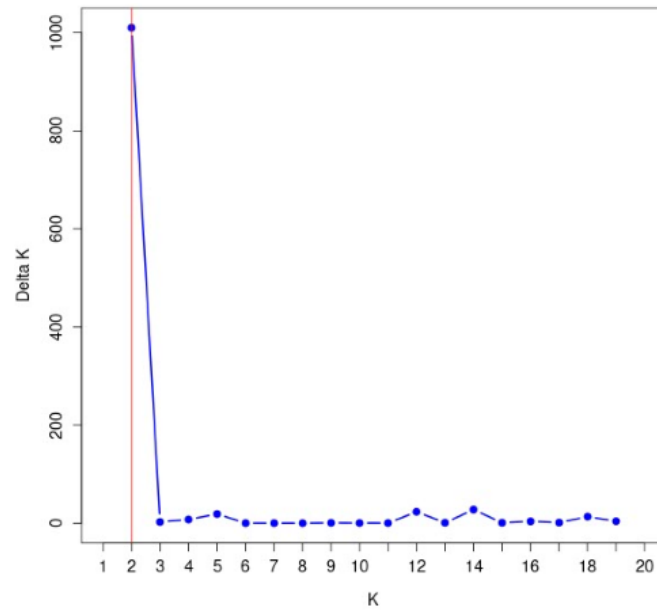


Figura A3.1. Estimador Δk de Evanno (2015) para el número óptimo de clústeres k en el set de datos microsátélites.

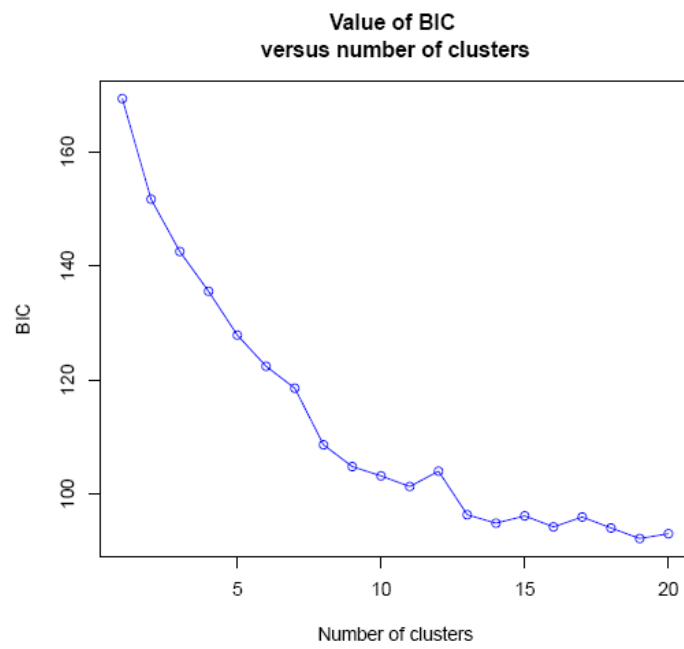


Figura A3.2. Valores de BIC para los números de clústeres de k en el set de datos microsátélites.

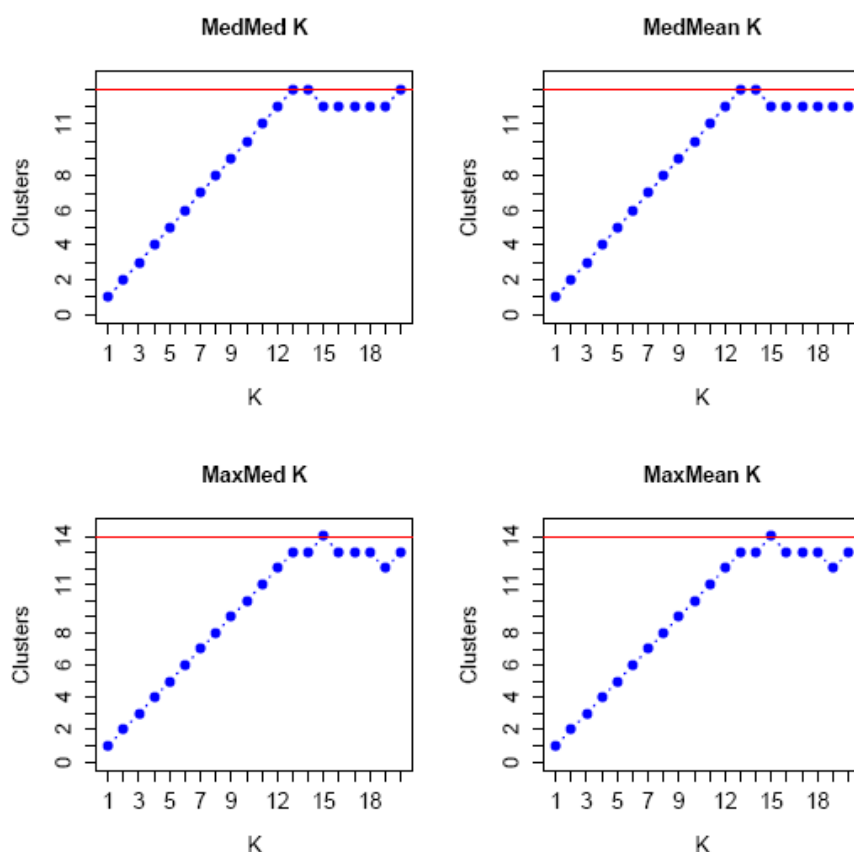


Figura A3.3. Estimadores desarrollados por Puechmaille (2016) para el valor de k óptimo en el set de datos microsatélites.

Capítulo 4

Tabla A4.1. Protocolos de PCR para amplificar los fragmentos de genes MLST, *wsp*, y *glyQ* de *Wolbachia*.

Protocolo	Primer	Temperatura de Annealing (°C)	Secuencias de los primer (5'-3')
Baldo <i>et al.</i> 2006	<i>fbpA</i>	56 y 57	Forward (F): GCTGCTCCRCTTGGYWWTGAT Reverse (R): CCRCCAGARAAAAYACTATTC
	<i>ftsZ</i>	51	F: ATYATGGARCATATAAARGATAG R: TCRAGYAATGGATTRGATAT
	<i>glyQ</i>	51	F: GCAATGGAATGGAAGTAACACAG R: YTCACACCAAGCACACCTCT
	<i>wsp</i>	51	F: GTCCAATARSTGATGARGAAAC R: CYGCACCAAYAGYRCTRTRAAA
	<i>coxA</i>	54	F: TTGGRGCRATYAACTTTATAG R: CTAAGACTTTKACRCCAGT
Baldo <i>et al.</i> 2006 ¹ modificado: - 94°C por 2 min. - 35 ciclos de: 94°C por 1 min. Annealing por 1 min. 72°C por 1 min. - 72°C por 10 min.	<i>hcpA</i>	54	F: GAAATARCAGTTGCTGCAAA R: GAAAGTYRAGCAAGYTCT
Asimakis <i>et al.</i> 2019 ²	<i>gatB</i>	53 y 58	F: GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT R: TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA

¹ Baldo, L., Hotopp, J. C. D., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C. J., Tettelin, H., & Werren, J. H. (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol.*, 72 (11):7098-7110. doi:10.1128/AEM.00731-06

² Asimakis, E. D., Doudoumis, V., Hadapad, A. B., Hire, R. S., Batargias, C., Niu, C., Khan, M., Bourtzis, K., & Tsiamis, G. (2019). Detection and characterization of bacterial endosymbionts in Southeast Asian tephritid fruit fly populations. *BMC Microbiol.*, 19 (Suppl 1):1-18. doi:10.1186/s12866-019-1653-x

Tabla A4.5. Tipificación de cepas de *Wolbachia* que infectan distintas especies de *Nylanderia* de acuerdo al perfil MLST, el perfil extendido MLST+glyQ y el gen glyQ. * la muestra NF084 está coinfectada con al menos dos cepas distintas de *Wolbachia*.

Hospedador (clado)	Código	Cepa MLST	ID alelos glyQ	Cepa MLST+glyQ
<i>Nylanderia fulva</i> (clado I)	N004	wNyla2	2	wNyla2
	N030	wNyla4	2	wNyla4
	N035	wNyla6	3	wNyla6
	N047	wNyla7	2	wNyla7
	N049	wNyla7	2	wNyla7
	N060	wNyla6	3	wNyla6
	N077	wNyla7	4	wNyla8
	N084*	wNyla8	3, 4	wNyla9
		wNyla9		wNyla10
	N093	wNyla10	2	wNyla11
	N106	wNyla7	2	wNyla7
	N118	wNyla12	4	wNyla13
	N122	wNyla7	4	wNyla8
N159	wNyla13	3	wNyla14	
<i>N. fulva</i> (clado III)	N001	wNyla1	1	wNyla1
	N007	wNyla1	1	wNyla1
	N018	wNyla1	1	wNyla1
	N034	wNyla1	1	wNyla1
	N058	wNyla1	1	wNyla1
	N105	wNyla11	3	wNyla12
	N132	wNyla1	1	wNyla1
<i>N. fulva</i> (clado II)	N022	wNyla3	3	wNyla3
	N031	wNyla5	3	wNyla5
<i>Nylanderia silvestrii</i>	N064	wNyla14	5	wNyla15
	N124	wNyla14	5	wNyla15