

Tesis Doctoral

Estudios ecológicos y genéticos de la hormiga invasora *Wasmannia auropunctata* en Argentina, el límite sur de su distribución nativa

Chifflet, Lucila

2016-03-11

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Chifflet, Lucila. (2016-03-11). Estudios ecológicos y genéticos de la hormiga invasora *Wasmannia auropunctata* en Argentina, el límite sur de su distribución nativa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Chifflet, Lucila. "Estudios ecológicos y genéticos de la hormiga invasora *Wasmannia auropunctata* en Argentina, el límite sur de su distribución nativa". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-11.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Estudios ecológicos y genéticos de la hormiga invasora *Wasmannia auropunctata*
en Argentina, el límite sur de su distribución nativa**

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

Autora: **Lucila Chifflet***

Directora y consejera de estudios: Dra. Viviana Confalonieri *

Director asistente: Dr. Luis A. Calcatera **

* Departamento de Ecología, Genética y Evolución – IEGEBA (UBA– CONICET) – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Ciudad Universitaria, Pab. II. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

**Fundación para el Estudio de Especies Invasivas (FuEDEI), Bolívar 1559, B1686EFA, Hurlingham.

Buenos Aires, 2016

Fecha de defensa: 11 de marzo de 2016.

RESUMEN. La historia evolutiva de especies invasoras en su área nativa puede involucrar procesos clave en su éxito fuera de ésta. *Wasmannia auropunctata* es una hormiga neotropical, que ha invadido diversos sitios tropicales del mundo, aunque recientemente también se estableció en la región Mediterránea. La posible población fuente de esta última invasión se localizó en Argentina, el límite sur de su distribución nativa. Resulta entonces interesante estudiar las poblaciones de *W. auropunctata* en esta región para entender su éxito fuera de la zona intertropical. En este trabajo se estudiaron distintos aspectos -ecológicos, genéticos y comportamentales- de *W. auropunctata* en el límite sur de su distribución nativa, con el fin de entender qué factores son responsables de su éxito y analizar si su historia evolutiva se corresponde con la reciente introducción en el Mediterráneo. Se analizó si las poblaciones en esta región presentan características invasoras, estudiando la asociación entre su dominancia y la perturbación del ambiente, su sistema de reproducción, por medio de microsatélites, y su sistema de organización social, por medio de ensayos de agresión. Se realizó un estudio filogeográfico, utilizando ADN mitocondrial y nuclear, para analizar su historia de dispersión y diversificación. Por medio de un modelado de nicho ecológico se determinaron áreas centrales y marginales de distribución y se analizó cómo cambiaron a lo largo del Cuaternario. Finalmente, se analizó su habilidad competitiva en un ensamble local, utilizando cebos y trampas de caída. *Wasmannia auropunctata* resultó estar ampliamente distribuida en esta región, siendo abundante y dominante en sitios perturbados, principalmente antrópicos. La organización social fue mayormente supercolonial independientemente del nivel de perturbación del ambiente. El sistema de reproducción fue principalmente clonal en sitios antrópicos; mixto en sitios con perturbación antrópica media y en las planicies de inundación; y sexual en sitios naturales. Los marcadores mitocondriales y nucleares corroboraron la existencia de dos clados principales (A y B), como había sido propuesto en otros trabajos. Un análisis filogeográfico bayesiano sugirió que el ancestro común de ambos clados habría existido en el centro de Brasil hace 3,9 millones de años aproximadamente, desde donde el clado A se expandió hacia el norte y el B (el mismo que invadió el Mediterráneo) hacia el sur. El modelado de nicho ecológico sugirió que su diferenciación genética podría estar acompañada de una diferenciación de nicho ecológico, siendo el clado A un linaje tropical y el B un linaje subtropical y templado. Sólo el clado B alcanzó altas latitudes en el sur de Sudamérica, hasta Argentina, caracterizado por un clima más frío que el norte de este continente. Esto es compatible con su posterior establecimiento en la región Mediterránea. *Wasmannia auropunctata* presentó una baja habilidad competitiva, indicando que ésta no es un factor asociado a su éxito. En conjunto, nuestros resultados sugieren que los ambientes naturalmente perturbados (como las planicies de inundación) habrían jugado un papel importante en la aparición de características, como la clonalidad y la supercolonialidad, que posteriormente favorecerían a *W. auropunctata* en ambientes antrópicos, clave para su introducción fuera de su rango nativo. Por otro lado, su expansión natural a altas latitudes hacia el sur de Sudamérica, le habría permitido una adaptación a climas más fríos y con marcada estacionalidad, clave para su establecimiento en la región Mediterránea. El presente estudio refleja la utilidad de la exploración de la historia de vida de una especie invasora dentro de su rango nativo para lograr una mejor comprensión de su escenario de invasión.

Palabras clave: invasiones biológicas, historia evolutiva, filogeografía, clonalidad, supercolonialidad, Sudamérica, habilidad competitiva, expansión demográfica, refugios pleistocénicos.

Ecological and genetic studies of the invasive ant *Wasmannia auropunctata* in Argentina, its native southernmost distribution limit

ABSTRACT. The evolutionary history of exotic species within their native range may involve key processes for colonizing new habitats. Native from the Neotropics, the little fire ant *Wasmannia auropunctata* has invaded many tropical sites around the world, and it has recently been introduced in the Mediterranean region. The putative source population of this last invasion was located in Argentina, its native southernmost distribution limit. Therefore, it is interesting to study the populations of *W. auropunctata* in this region to understand its success outside the tropics. We studied different -biological, genetic and behavioural- aspects of *W. auropunctata* within its native southernmost distribution limit, in order to understand which factors are responsible for its success and analyze whether its evolutionary history agrees with the recent introduction into the Mediterranean. We examined whether the populations in this region have invasive characteristics, studying the association between their dominance and the habitat disturbance, the reproductive system, using microsatellite markers, and the social organization, through aggression tests. We analyzed mitochondrial and nuclear DNA markers, to perform a phylogeographic analysis in order to infer its dispersion and genetic differentiation history. Through an ecological niche modelling, we identified central and marginal distribution areas and analyzed how they changed over the Quaternary. Finally, we analyzed its competitive ability in a local assembly, using baits and pitfall traps. *Wasmannia auropunctata* was widespread at the southernmost limit of its native distribution range, with higher abundances being mainly recorded in anthropic habitats. The social organization was mainly supercolonial in all habitat types. The reproductive system was mainly clonal in anthropic habitats, mixed in partially disturbed sites and floodplains, and sexual in natural sites. The genetic analysis corroborated the existence of two main clades (A and B), as had been proposed in other works. Phylogeographical Bayesian analysis suggested that the common ancestor of both clades would have existed in central Brazil about 3.9 million years ago, from where clade A would have expanded and differentiated northward and clade B (the same that invaded the Mediterranean) southward. The ecological niche modelling suggested that genetic differentiation could be accompanied by a differentiation in the ecological niche requirements, clade A being a tropical lineage and clade B a subtropical and temperate lineage. Clade B was the only one which reached high latitudes in southern South America, which is characterized by colder temperatures than the north of the continent. This agrees with the subsequent establishment in the Mediterranean region. *Wasmannia auropunctata* had a low competitive ability, indicating that interspecific competition is not a factor associated with its success. Taken together, our results suggest that naturally disturbed environments (such as floodplains) may have played an important role in the appearance of features such as clonality and supercoloniality, which would have later favor *W. auropunctata* in anthropic habitats, key to its dispersal outside its native range. Additionally, the natural expansion at high latitudes to the south of South America, would have allowed it to adapt to colder climates and seasonality, key to its later establishment in the Mediterranean region. This study highlights the usefulness and value of exploring the life history and biology of invasive species within their native range to better understand invasion scenario.

Key words: biological invasions, evolutionary history, phylogeography, clonality, supercolony, South America, competitive ability, demographic expansion, Pleistocene refugia.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mis directores, Viviana Confalonieri y Luis Calcaterra, por dirigir esta tesis. Gracias por todo el conocimiento y experiencia que me transmitieron durante estos años, por ayudarme en todas las dificultades que se presentaran, por su dedicación y paciencia. Son dos personas muy importantes en mi formación y me siento muy afortunada de haberlos tenido como directores. Estoy muy feliz de que vamos a seguir trabajando juntos en el posdoctorado.

Luis, este proyecto empezó con vos, y mi gracias se remonta al año 2009, cuando me elegiste como pasante del SABCL. Gracias por haberme iniciado en el mundo de esta pequeña hormiga, por confiar en mí, por incentivar me, por hacerme creer siempre que soy una buena investigadora y ayudarme a tener más confianza en mi misma. Gracias, porque luego de la pasantía, quisiste seguir con este proyecto en el marco de un doctorado y gracias a eso hoy estoy presentando los frutos de los 5 años de tesis. Gracias también por tu amistad, por todos los momentos compartidos, los viajes, los mates y las risas.

Vivi, gracias por interesarte en este proyecto y por aceptar dirigir esta tesis, por enriquecer tanto este trabajo con tu conocimiento y experiencia, que hizo que adquiriera un valor como estudio evolutivo que no hubiese tenido nunca sin tu gran ayuda. Gracias también por tu buena onda, por tu calidez humana, tu comprensión y por preocuparte siempre por mí, por los momentos compartidos, los almuerzos, las risas y las anécdotas.

Gracias a Olivier Rey, por tu ayuda y colaboración, por compartir conmigo tus secuencias de COI y los microsatélites, por explicarme todos los protocolos para amplificar los microsatélites y responderme siempre con la mejor onda cualquier duda que me surgiera. También porque tu aporte y tus trabajos, juntos con los de todo el equipo de *Wasmannia* en el CBGP, fueron fundamentales para la realización de esta tesis. Gracias a Arnaud Estoup también, por la colaboración que tuvimos con este proyecto y por compartir ideas de posibles estudios de *Wasmannia* en Argentina.

Gracias a Marcela Rodriguero, por tu gran ayuda en los análisis filogeográficos, sobre todo el bayesiano, y por siempre estar dispuesta a ayudarme con cualquier dificultad que se presentara y con cualquier duda, ya sea con los análisis de datos como también con el trabajo en el laboratorio. Gracias por la buena onda, por los debates acerca de hipótesis evolutivas y por las charlas de la vida.

Gracias a Noelia Guzmán, por enseñarme a extraer ADN, y diversas técnicas de laboratorio, por tu ayuda en el análisis de datos, porque siempre estas ahí, con buena onda, dispuesta a ayudar. Gracias por ayudarme a analizar los microsatélites con el GeneMapper, por dedicarle tiempo, muchas veces dejando de hacer tus cosas. Gracias por las risas, los mates... mate time! Yo lo preparo pero vos cebás...

Gracias a Pablo Dinghi, por enseñarme a hacer PCRs!! y diversas técnicas del laboratorio, por estar también siempre dispuesto a ayudarme en cualquier dificultad que se me presente, en el laboratorio y también con los análisis filogenéticos y diversos programas. Gracias también por tu calidez y por preocuparte siempre por mí.

Gracias a Andrés Sánchez y Sol Porcel, por su gran ayuda en la identificación de las hormigas de los pitfalls. Gracias a Andrés también por aceptar colaborar en los proyectos de *Wasmannia*, por las charlas acerca de hormigas y por ayudarme con algunos análisis estadísticos.

A Daniela Monti, gracias por tu ayuda con los programas estadísticos y con el Corel! Y por tu buena onda, por las risas y los mates.

A Cristian Tomatis, gracias por enseñarme a purificar ADN, a alinear y editar secuencias y por tu gran ayuda para analizar los datos genéticos, por crear un programa para diferenciar los distintos haplotipos, y otro que uniera el Excel con el GoogleEarth para visualizar rápidamente las muestras en el mapa. Gracias por tu buena onda, por cebar mate, se te extraña!

Gracias a Silvia Pietrokovsky, por tu gran ayuda con las traducciones al inglés, tanto en mi primer artículo científico, como con el resumen de esta tesis. Gracias por estar siempre pendiente y dispuesta a ayudar.

Gracias a todos los que integran el lab 60, a Jose, gracias por tu ternura, tu calidez, siempre preocupada porque todos estemos bien; a Juli, por tu buena onda, por los mates, también siempre dispuesta a ayudar; a Francisca, también por tu buena onda; a Pato, aunque no trabajes más acá, compartimos los primeros años de la beca, y también me encantó haber compartido la experiencia en el CADIC; y a todos los que ya nombré, Vivi, Marce, Noe, Pablo, Dani, Andrés y Silvia. Gracias porque son muy buenos compañeros, todos ayudaron a que esta tesis sea posible y hoy esté finalmente presentándola. Es un placer trabajar con ustedes!

Gracias a todas las personas que aportaron muestras de *W. auropunctata* para esta tesis: a Laura Varone, Juan Briano, Priscila Hanish, Francisco Sola, Adriana Aranda, Fabricio Baccaro y Jorge Souza.

Gracias a Juan Briano, por iniciar el proyecto de control biológico de la pequeña hormiga de fuego en el SABCL (actual FuEDEI), y a Peter Follett, por financiarlo hasta el día de hoy.

Gracias a todos los que integran la FuEDEI, por haber compartido el primer año de pasantía, y porque cada vez que paso por allá, me reciben cálidamente.

A Laura Wolfenson, por ayudarme con el análisis de los microsatélites.

A los etceterianos! Ustedes también formaron parte de esta etapa, fue un placer y una experiencia hermosa compartir con ustedes el Curso de Ecología Tropical y Conservación en Costa Rica, fue enriquecedor conocer sus temas de trabajo y sus experiencias, pero lo más importante, compartir tanta alegría y haber generado una linda amistad, sabiendo que en cada país de Latinoamérica que visite, voy a tener un latino a quien llamar!

Al grupo del Ant Course, gracias porque aprendí mucho de ustedes! Y todos, tanto alumnos como profesores, me ayudaron a tratar de ser mejor mirmecóloga.

A Fabiana Cuezco, por la caracterización de los ginandromorfos.

A Alex Wild, por permitirme utilizar sus fotos de *W. auropunctata* en esta tesis.

A las secretarias del EGE, Mabel y Graciela, por atenderme siempre con buena onda. Gracias Graciela por tu paciencia para explicarme todo lo relacionado a los temas administrativos y de plazos para presentar la tesis.

Agradezco a las diversas entidades que financiaron esta tesis, principalmente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca para poder realizar el doctorado y por otorgar subsidios para el proyecto; la Secretaría de Ciencia y Técnica - Universidad de Buenos Aires; la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, Argentina; y el Agricultural Research Service - United States Department of Agriculture (ARS-USDA).

Y agradezco, por último a esas personas tan importantes, que no tienen que ver directamente con esta tesis, pero que sin su apoyo y contención, día a día, es más difícil lograr un objetivo tan importante como este...

A mis queridas compañeras de la facu (Sofi, Carol, Flor, Meli, Aldana, Male, Yami y Jose), gracias por compartir toda esta etapa juntas, algunas desde el CBC y otras desde el primer año de la carrera, gracias por el gran apoyo moral durante estos años, algunas de ustedes becarias como yo, otras en otros temas, otras fuera de la biología, pero todas sabemos de qué se trata esto. Gracias por estar siempre!

A mis queridas Shulas (Caro, Nuri, Flor, Sole y Xime), creo que todavía no saben de qué se trata mi tesis, pero no importa, gracias por su amistad y aguante! Y gracias al Cuartel (Flor, Magui y Euge) por su amistad de tantos años!

A Moh, gracias por tu alegría, por tu empuje y por tu motivación, ya sabés lo importante que fuiste para la finalización de esta tesis!!... Vamos! Ojo del tigre!

Y finalmente, a mi familia, las personas que más amo en el mundo, a mis hermanos, María y Nico, gracias por el apoyo, por ayudarme en lo que sea, porque se que cuento con ustedes siempre. A Mimí, Mima y Bapún, los llevo siempre en el corazón. A Mago, que me acompañó día y noche, en cada momento de escritura.

Y a mamá y papá, no hay nadie en este mundo que se ponga más feliz y sienta más orgullo por mis logros que ustedes. Gracias por tanto amor y por hacerme día a día mejor persona. Gracias por su apoyo, por el aguante siempre, en cualquier cosa que se me ocurra emprender, ustedes están ahí. Gracias por su ayuda, por interesarse en mi trabajo, por preguntarme siempre cómo voy... Mamá, no es *Wasmannia tupungata*, es *auropunctata*! jaja... Los amo con el alma, esta tesis es para ustedes...

A mis papás.

Índice

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 1. Introducción general | 10 |
| Invasiones biológicas | 11 |
| ¿A qué se debe el éxito de una invasión biológica? | 12 |
| Importancia de estudiar las especies invasoras en su ambiente nativo | 13 |
| Las invasiones por hormigas | 14 |
| El caso de la pequeña hormiga de fuego, <i>Wasmannia auropunctata</i> | 16 |
| Características de <i>W. auropunctata</i> | 18 |
| Estructura genética de <i>W. auropunctata</i> | 19 |
| Características asociadas al éxito de <i>W. auropunctata</i> como especie invasora | 20 |
| Características de <i>W. auropunctata</i> en su rango nativo | 21 |
| Características de <i>W. auropunctata</i> en su rango introducido | 23 |
| Escenario de invasión de <i>W. auropunctata</i> | 23 |
| Invasión de <i>W. auropunctata</i> en la región Mediterránea | 24 |
| Objetivos de la tesis e hipótesis de trabajo | 25 |
| Organización de la tesis | 28 |
| CAPÍTULO 2. Distribución de <i>Wasmannia auropunctata</i> en el sur de Sudamérica | 30 |
| Resumen..... | 31 |
| Introducción..... | 31 |
| Materiales y métodos..... | 32 |
| Resultados..... | 34 |
| Discusión..... | 43 |
| CAPÍTULO 3. Sistema de reproducción de <i>Wasmannia auropunctata</i> en el sur de Sudamérica 46 | |
| Resumen..... | 47 |
| Introducción..... | 47 |
| Materiales y métodos..... | 54 |
| Resultados..... | 59 |
| Discusión..... | 67 |
| CAPÍTULO 4. Organización social de <i>Wasmannia auropunctata</i> en Argentina | 72 |
| Resumen..... | 73 |

| | |
|---|------------|
| Introducción..... | 73 |
| Materiales y métodos..... | 75 |
| Resultados..... | 78 |
| Discusión..... | 85 |
| CAPÍTULO 5. Filogeografía de <i>Wasmannia auropunctata</i> en su rango nativo | 89 |
| Resumen..... | 90 |
| Introducción..... | 90 |
| Materiales y métodos..... | 93 |
| Resultados..... | 102 |
| Discusión..... | 118 |
| CAPÍTULO 6. Habilidad competitiva de <i>Wasmannia auropunctata</i> en un ensamble local de su rango nativo | 127 |
| Resumen..... | 128 |
| Introducción..... | 128 |
| Materiales y métodos..... | 131 |
| Resultados..... | 139 |
| Discusión..... | 149 |
| CAPÍTULO 7. Conclusiones generales | 153 |
| INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA | 166 |
| Inf. Sup. Capítulo 2..... | 167 |
| Inf. Sup. Capítulo 3..... | 171 |
| Inf. Sup. Capítulo 5..... | 181 |
| BIBLIOGRAFÍA | 197 |

CAPÍTULO 1

Introducción general



Invasiones biológicas

Una invasión biológica se define como un evento en el que una especie se traslada más allá de su potencial natural de dispersión, estableciéndose en un ecosistema en el que no estaba presente y tornándose abundante en comparación con las poblaciones de su hábitat originario (Lee, 2002; Rey, 2011). Ésta puede producirse cuando al menos una hembra fecundada, o una semilla, de una especie es transportada a un área nueva, a menudo distante, donde sus descendientes proliferan, se dispersan y subsisten en el tiempo (Ricciardi, 2007). Las invasiones biológicas han alterado profundamente la biota del planeta (Simberloff, 1997), no siendo un fenómeno nuevo ni una consecuencia exclusiva de la actividad humana. Los rangos de las especies son naturalmente dinámicos (Lodge, 1993; Sax et al., 2005). Por ejemplo, durante los últimos 20 millones de años, los movimientos tectónicos en la Tierra generaron grandes intercambios bióticos entre diferentes regiones (Vermeij, 1991); en los últimos 10.000 años, durante los ciclos glaciares del Pleistoceno, diversos eventos de expansión y retracción de masas de hielo también generaron cambios en los rangos de todas las especies sobre la Tierra (Lodge, 1993); y en períodos de tiempo más cortos (ej. décadas), los rangos de las especies pueden cambiar naturalmente por factores bióticos o ambientales (Lodge, 1993).

Sin embargo, los cambios en el rango de las especies se han acelerado considerablemente en los últimos 200 años por causa directa de la actividad humana (Lodge, 1993; Ricciardi, 2007). La magnitud geográfica, la frecuencia y el número de especies involucradas en invasiones biológicas han crecido enormemente como consecuencia directa de la expansión del transporte y el comercio (Deyrup et al., 2000; Suarez et al., 2005). Actualmente, todas las regiones del planeta se ven afectadas simultáneamente por las invasiones biológicas y las tasas de invasión modernas son varios órdenes de magnitud más altas que las tasas prehistóricas (Ricciardi, 2007). La actividad humana no solo provoca el intercambio de especies por medio del transporte (ej. introducciones accidentales en viajes comerciales y turísticos, comercio global de organismos vivos (viveros y acuarios), caza y pesca deportiva de animales exóticos que son criados en masa) (Simberloff, 1997), sino también por medio de la creación de grandes canales de intercambio de biota, donde antes existían barreras naturales. Por ejemplo, la creación del canal de Suez en 1869, generó el intercambio entre las biotas del mar Mediterráneo y el mar Rojo; y la creación del canal de Panamá en 1914, generó el intercambio entre los océanos Pacífico y Atlántico (Vermeij, 1991). El cambio climático global y la modificación del ambiente por el hombre también provocan que muchas especies expandan su rango dentro de su área nativa, y otras lo reduzcan (Lodge, 1993; Thomas & Lennon, 1999; Perry et al., 2005). Por todo esto,

la introducción accidental de especies exóticas constituye un problema cada vez más serio que resulta en una homogenización y pérdida de especies nativas a nivel mundial sin precedentes (Vitousek et al., 1997; Clavero & Garcia-Berthou, 2005; Lockwood et al., 2007; Sax & Gaines, 2008).

Las especies invasoras son consideradas una amenaza importante para la conservación de la biodiversidad ya que afectan a todo tipo de ecosistemas, causando además enormes pérdidas económicas y problemas sanitarios (Pimentel et al., 2011). Asimismo, causan miles de millones de dólares en pérdidas por año en concepto de inspecciones para prevenir el ingreso de especies no deseadas, programas de erradicación y control, reducción de productividad y restauración de hábitats (Pimentel et al., 2000). El daño ambiental se manifiesta principalmente en la reducción de biodiversidad y extinción de especies, ya que los invasores desplazan y reducen las poblaciones de las especies nativas (Kupferberg, 1997), por medio de depredación, competencia o modificación del ambiente (Lodge, 1993). Consecuentemente, modifican las estructuras tróficas dentro de las comunidades e inducen perturbaciones que afectan a los ecosistemas (Lodge, 1993; Vitousek et al., 1996).

¿A qué se debe el éxito de una invasión biológica?

No todas las especies introducidas en un nuevo ambiente logran establecerse con éxito y proliferar (Williamson & Fitter, 1996). La mayoría de las especies no sobrevive al viaje, otras lo hacen pero no consiguen establecerse en el nuevo ecosistema por falta de espacio, de recursos, por competencia con los organismos nativos, por depredación, por enfermedades o por limitaciones generadas por factores ambientales de tipo físico (ej. temperatura) (Lodge, 1993). Existen especies que eventualmente se naturalizan y mantienen niveles poblacionales que no interfieren sobre el ecosistema (Lodge, 1993); otras desarrollan su ciclo de vida pero posteriormente desaparecen, en una o más generaciones por fenómenos de estocasticidad ambiental o demográfica (factores azarosos que inducen fuertes fluctuaciones poblacionales) (Lodge, 1993).

Uno de los principales objetivos en el estudio de invasiones biológicas es entender por qué ciertas invasiones biológicas prosperan y otras no. En este sentido, tanto las características de la especie invasora como las de la comunidad invadida son claves para que una invasión sea exitosa y ambas determinan cuál será el impacto de una invasión sobre la comunidad (Lodge, 1993). Las especies depredadoras, por ejemplo, son las que más impacto tienen sobre las comunidades invadidas.

Otras características generalmente compartidas por las especies invasoras exitosas (aunque existen excepciones) son: i) estrategia de supervivencia “r”, la cual es típica de especies que habitan ambientes inestables, poseen una tasa de reproducción elevada, produciendo un gran número de crías, inversión de poca energía en la reproducción, organismos de tamaño pequeño, tiempo de vida corto; ii) tasa de dispersión alta, iii) plasticidad fenotípica, iv) rango nativo amplio, v) alta diversidad genética, vi) reproducción asexual y vii) comensalismo con el hombre (Lodge, 1993). Los invasores exitosos son en general especies que en su lugar de origen tienen cierta predisposición a ser transportadas por humanos y a soportar las difíciles condiciones o procesos de selección que se dan durante el transporte, introducción, establecimiento y dispersión (Suarez & Tsutsui, 2008). El éxito también puede asociarse al número de veces que una especie es introducida, ya que a mayor número de propágulos (estructuras capaces de reproducirse y diseminarse) la especie aumenta su probabilidad de establecerse (Lockwood et al., 2005). El éxito de muchas especies invasoras también se ha adjudicado capacidades competitivas superiores en relación a las especies nativas (Bruno et al., 2005).

Por su parte, las comunidades blanco también juegan un papel clave ya que la probabilidad de éxito de una invasión disminuye en las comunidades con una alta riqueza específica. Por ejemplo, las invasiones son más comunes en islas, debido a que éstas poseen una menor riqueza específica que los ambientes continentales y, en general, presentan especies menos adaptadas a una gran diversidad de competidores y no poseen depredadores capaces de desplazar a los invasores. Por lo tanto estas comunidades, son más vulnerables a una invasión (Lodge, 1993).

Por otro lado, uno de los mecanismos comúnmente aceptados, clave para explicar el éxito de las invasiones por especies exóticas es el propuesto por la hipótesis de “Liberación de los Enemigos Naturales” (Keane & Crawley, 2002). Esta hipótesis postula que las especies invasoras experimentan, tras su introducción en una región fuera de su área nativa, una liberación de la regulación que sobre ellas ejercían sus enemigos naturales (depredadores, herbívoros, parásitos o patógenos), lo que favorece el aumento de sus abundancias y la expansión de su rango en el área invadida.

Importancia de estudiar las especies invasoras en su ambiente nativo

A la fecha, la mayoría de los estudios sobre invasiones biológicas se han focalizado en analizar distintos aspectos de la biología de las especies invasoras dentro de su rango introducido (Elton, 1958;

Richardson et al., 2000; Sakai et al., 2001; Holway *et al.*, 2002; Colautti & MacIsaac, 2004; Williams & Smith, 2007). Esto se debe a que siempre se consideró que los principales cambios evolutivos sufridos por las especies invasoras, clave para su éxito, ocurrían en el área introducida, ya que allí éstas deben enfrentarse con condiciones ambientales (bióticas y abióticas) y demográficas (ej. reducción del tamaño poblacional y variabilidad genética, proceso denominado “cuello de botella”) nuevas y críticas (Sakai et al., 2001; Foucaud et al., 2013). Por su parte, tradicionalmente se ha considerado al área nativa de las especies invasoras como un área homogénea, tanto en términos de hábitat como de las características biológicas de las especies (Colautti & MacIsaac, 2004; Falk-Petersen et al., 2006; Richardson & Pyšek, 2006).

Sin embargo, hoy en día esta visión cambió y se sabe que las áreas nativas, en realidad, constituyen hábitats heterogéneos, ocupados por poblaciones ecológicamente heterogéneas que están constantemente sujetas a diferentes presiones ambientales (ej. Winkler et al., 2008). Muchas especies invasoras han sufrido procesos evolutivos dentro de su rango nativo que son clave en su éxito fuera del mismo (Facon et al., 2006; Bossdorf et al., 2008; Lee & Gelembiuk, 2008). Por lo tanto, hoy se reconoce la importancia de estudiar también el área nativa de estas especies para entender el éxito de las invasiones biológicas (Sakai et al., 2001; Bossdorf et al., 2005; Pedersen et al., 2006).

Por otro lado, diversos estudios señalan la importancia del papel del hombre en el surgimiento de los cambios evolutivos que promueven una invasión (King & Tschinkel, 2008; Leprieur et al., 2008). El uso de la tierra por el hombre y la modificación de ecosistemas provoca el desplazamiento de muchas especies, pero favorece a algunas pocas que logran adaptarse a dichos hábitats antrópicos (Olden et al., 2004; Ekroos et al., 2010; Hufbauer *et al.*, 2012; Foucaud *et al.*, 2013). Las poblaciones adaptadas a los ambientes modificados por el hombre son susceptibles a tornarse invasivas en cualquier otro sitio (Ehrlich, 1989).

Las invasiones por hormigas

Las hormigas son organismos fundamentales para mantener la integridad de los ecosistemas, por su gran abundancia, riqueza específica y porque llevan a cabo funciones esenciales (Folgarait, 1998). Sin embargo, cuando las hormigas se tornan invasoras, pueden representar una grave amenaza para la biodiversidad de los ecosistemas invadidos, así como para intereses humanos como la agricultura y la salud pública (Williams, 1994; Holway *et al.*, 2002; O’Dowd *et al.*, 2003). Del total de

12600 especies de hormigas identificadas, más de 200 fueron introducidas en ambientes exóticos (Suarez et al., 2010). No todas ellas han causado un impacto ecológico o económico significativo (McGlynn, 1999), pero un pequeño número se han vuelto sumamente invasivas (Holway et al., 2002). Diecinueve de estas especies están listadas como altamente problemáticas por la Unión Internacional por la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (SSC Invasive Species Specialist Group, 2012), entre las cuales se encuentran la hormiga colorada *Solenopsis invicta*, la hormiga argentina *Linepithema humile*, la hormiga loca *Anoplolepis gracilipes*, la hormiga cabezona *Pheidole megacephala* y la pequeña hormiga de fuego *Wasmannia auropunctata* (Lowe et al., 2000; Holway et al., 2002).

La introducción accidental de algunas especies de hormigas ha causado una pérdida de biodiversidad de hormigas y otros artrópodos en los territorios invadidos (Ward, 1987; Porter y Savignano, 1990; Human & Gordon, 1996; Holway, 1998), así como también la disminución y extinción local de plantas, aves, reptiles y mamíferos (Holway et al., 2002; Lach & Hooper-Bui, 2010). Diversos estudios señalan a las hormigas exóticas como la causa de declinación de la fauna de vertebrados e invertebrados nativos, disminución de dispersión de semillas, con su consecuente impacto en la estructura de la vegetación nativa, pérdidas en la productividad agropecuaria (directamente por medio del consumo de cultivos o indirectamente por el aumento asociado de áfidos y cochinillas). Además, afectan las propiedades del suelo y pueden interferir en las interacciones mutualistas de otras especies de hormigas con plantas y otros artrópodos (Holway et al., 2002). De esta manera, las hormigas exóticas representan un grave problema a nivel mundial, pudiendo causar daños irreparables en los ecosistemas (Cole et al., 1992).

Muchas hormigas invasoras son denominadas “hormigas vagabundas” (*tramp ants*), las cuales se caracterizan por poseer un conjunto de rasgos que facilitan su dispersión por medio del hombre y su establecimiento en nuevas áreas biogeográficas (Passera, 1994; Holway & Suarez, 1999). Se trata de especies con dieta generalista y oportunistas a la hora de elegir dónde nidificar. Los nidos suelen ser efímeros, mudando su ubicación con frecuencia y expandiéndose a nuevos sitios, lo que puede generar la existencia de nidos sin reinas pero con obreras y larvas, interconectados entre sí (polidomia) (Debout et al., 2007). Las colonias poseen más de una reina (son políginas), y nuevas colonias suelen ser fundadas por brotación (una reina inseminada abandona el nido con un grupo de obreras y funda un nuevo nido muy próximo al anterior) (Heinze et al., 2006); es decir, no poseen vuelos nupciales, como la mayoría de las hormigas (Hölldobler & Wilson, 1990).

El caso de la pequeña hormiga de fuego, *Wasmannia auropunctata*

La pequeña hormiga de fuego, *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863) (Hymenoptera: Formicidae), es una hormiga de origen neotropical que en los últimos cien años ha sido dispersada en el resto de las regiones tropicales del mundo por el transporte comercial (Wetterer & Porter, 2003). Por su severo impacto en el ecosistema, *W. auropunctata* es considerada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) una de las cien más peligrosas especies invasoras del mundo (Lowe et al., 2000). Se le ha atribuido la reducción de la diversidad de especies de hormigas, la disminución de la abundancia global de insectos voladores y arborícolas, y la eliminación de poblaciones de arácnidos (Lubin, 1984; Le Breton et al., 2003; Walker, 2006; Berman et al., 2013). También existen reportes que denuncian el ataque de *W. auropunctata* a reptiles, aves y mamíferos nativos (Roque-Albelo & Causton, 1999; Wetterer et al., 1999; Jourdan et al., 2001; Walsh et al., 2004). *Wasmannia auropunctata* es considerada una de las especies exóticas de hormigas más dañinas de las islas del Pacífico (Loope & Krushelnycky, 2007). Con la excepción del microhimenóptero parasitoide *Orasema minutísima* (Hymenoptera: Eucharitidae) en el trópico (Heraty, 1994), no se ha encontrado al momento un potencial enemigo natural para combatir a esta plaga.

Wasmannia auropunctata es la única especie, dentro de su género, que ha logrado un gran éxito ecológico (Longino & Fernandez, 2007). Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en la región neotropical: desde México hasta el norte de Argentina. Sin embargo, no resulta claro aun si la especie es efectivamente nativa en toda esta región y cuán extenso era su rango nativo antes de la influencia de la actividad humana (Wetterer & Porter, 2003).

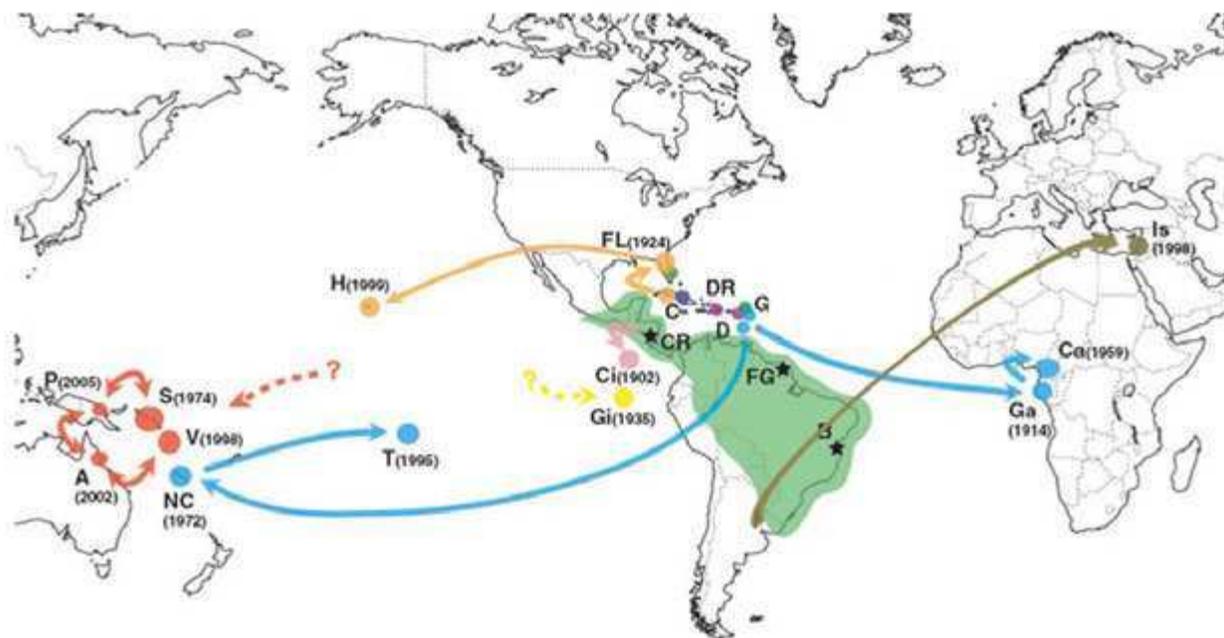


Figura 1.1. Mapa de la distribución de *W. auropunctata* y sus rutas de introducción (Foucaud et al., 2010a; modificado por Coulin, 2013). El área verde delimita la distribución nativa descrita por Wetterer & Porter (2003). Los círculos representan poblaciones introducidas con distinto origen, representado por las flechas, y el presumible año de introducción entre paréntesis. Las estrellas negras representan poblaciones muestreadas por Foucaud et al. (2010a), CR: Costa Rica, FG: Guyana Francesa, B: Brasil. Las letras al lado de los círculos coloreados representan el nombre del estado/país donde la especie fue introducida, A: Australia, P: Papúa Nueva Guinea, S: Islas Salomón, V: Vanuatu, NC: Nueva Caledonia, T: Tahití, H: Hawái, FL: Florida, C: Cuba, DR: República Dominicana, D: Dominica, G: Guadalupe, Ci: Isla del Coco, Gi: Galápagos, Ga: Gabón, Ca: Camerún, Is: Israel.

Durante los últimos 100 años, *W. auropunctata* se ha convertido en una plaga, tanto en su área nativa (ej. en plantaciones de cacao en Colombia y Brasil; Posada *et al.*, 1976; Delabie, 1989; de Souza *et al.*, 1998), como también fuera de la región neotropical. Invadió diversas islas del Caribe y del Pacífico (incluyendo las Islas Galápagos, Hawái, Nueva Caledonia, Islas Salomón, Tahití y Vanuatu), islas atlánticas subtropicales (Bermuda y Bahamas) y Estados Unidos (Florida y California) (Wetterer & Porter, 2003; Foucaud et al., 2010a) (Figura 1.1). En África ha invadido tanto ambientes antrópicos como bosques nativos en Gabón (Santschi, 1914; Wetterer et al., 1999; Wetterer y Porter, 2003; Walsh et al., 2004; Walker, 2006; Ndoutoume & Mikissa, 2007), y más tarde plantaciones de cacao en Camerún (de Miré, 1969). También se la ha encontrado en invernaderos que recrean ambientes tropicales en Gran Bretaña y Canadá (Ayre, 1977). En el año 2005, *W. auropunctata* fue registrada por primera vez en la región Mediterránea, en Israel (Vonshak *et al.*, 2010), lo cual

demuestra su potencial para invadir también regiones no tropicales del mundo. Resulta curioso que una especie de origen tropical y subtropical pueda establecerse exitosamente en regiones con un clima tan distinto a los de su área nativa, caracterizadas por temperaturas más frías y marcada estacionalidad.

Características de Wasmannia auropunctata

Wasmannia auropunctata pertenece a la subfamilia Myrmicinae, posee obreras pequeñas (~1,5 mm de largo; Figura 1.2a) y reinas de mayor tamaño (~4,5mm; Figura 1.2b) (Wetterer & Porter, 2003). Posee hábitos oportunistas de nidificación y alimentación (Tennant, 1994); suele anidar debajo de piedras, debajo y dentro de troncos, ramas y restos vegetales (Wetterer & Porter, 2003). Las colonias pueden ser monóginas (poseer una sola reina) o políginas (poseer más de una reina) y sus colonias se reproducen por brotación (Wetterer & Porter, 2003). Las obreras de *W. auropunctata* se alimentan comúnmente de nectarios extraflorales vegetales y del exceso de azúcar secretado por homópteros, como áfidos, cochinillas, escamas y moscas blancas (Wetterer & Porter, 2003). En cuanto a su comportamiento, *W. auropunctata* no es una especie agresiva; las obreras se mueven lentamente y al ser molestadas buscan esconderse (Kusnezov, 1951).



Figura 1.2. Obreras de *Wasmannia auropunctata* (a) (Foto: www.alexanderwild.com); reinas, obreras y crías (b) (Foto: Queller, 2005).

Estructura genética de *Wasmannia auropunctata*

La evidencia obtenida a partir del estudio del ADN mitocondrial (ADNmt) sugiere que *W. auropunctata* se divide en dos clados principales (A y B). El clado A se distribuye en Centroamérica y el norte de Sudamérica, el clado B se encuentra en el sur de Sudamérica, y ambos se superponen en Brasil y Ecuador (Mikheyev & Mueller, 2007). La mayoría de las poblaciones introducidas pertenecen al clado A, excepto el este africano, Nueva Caledonia, Tahití e Israel, que fueron invadidos por poblaciones del clado B (Figura 1.3) (Mikheyev & Mueller, 2007; Rey *et al.* 2012).

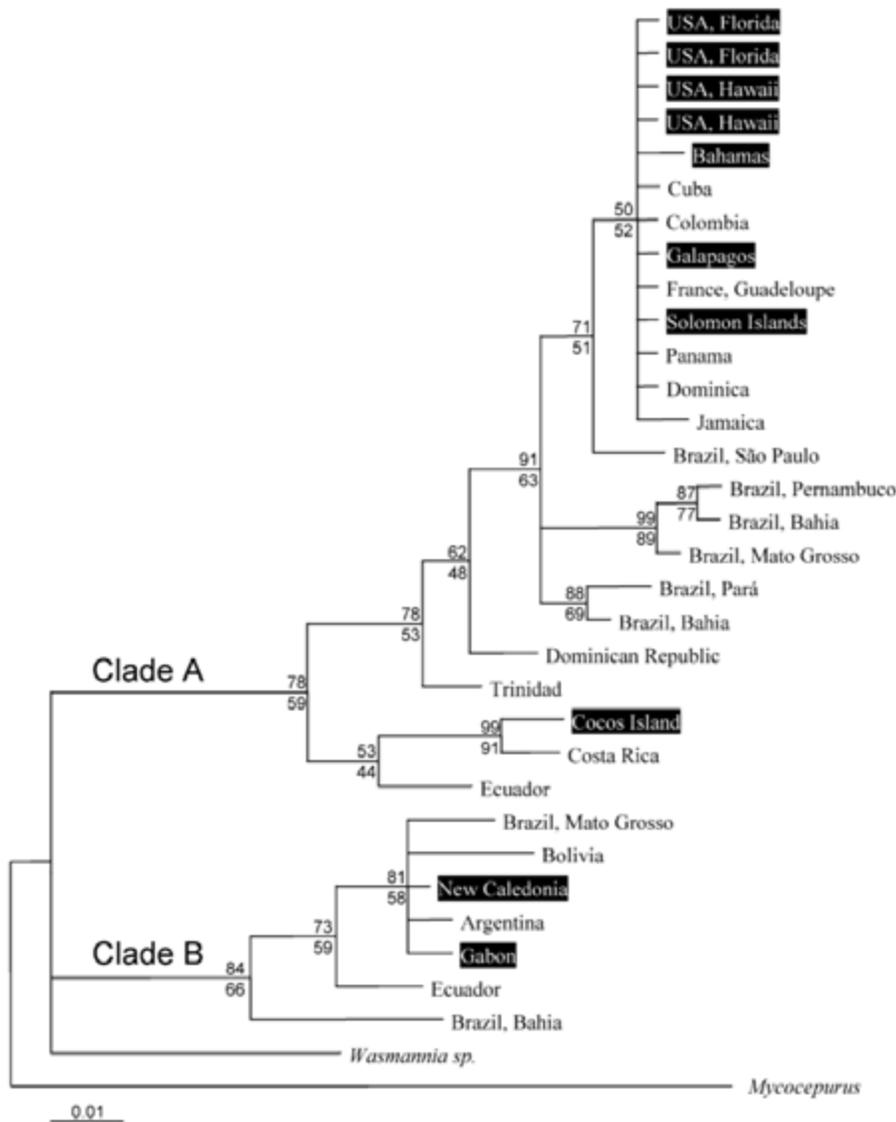


Figura 1.3. Relaciones filogenéticas entre poblaciones nativas e introducidas (resaltadas en negro) de *Wasmannia auropunctata*, basadas en un análisis bayesiano, obtenido por Mikheyev & Mueller, 2007).

*Características asociadas al éxito de *Wasmannia auropunctata* como especie invasora*

Wasmannia auropunctata posee muchos rasgos, compartidos con otras especies de hormigas altamente invasoras, que pueden explicar en parte su éxito (Brandão & Paiva, 1994; Passera, 1994). Los hábitos generalistas de alimentación le permiten prosperar en una amplia gama de condiciones ambientales (Smith, 1942; Kusnezov, 1951; Way & Bolton, 1997) y los hábitos generalistas de nidificación, junto con la construcción de nidos de poca profundidad, le permiten explotar una muy amplia serie de cavidades superficiales naturales como también cualquier tipo de producto o estructura construida por el hombre (Deyrup et al., 2000). A su vez, los nidos son altamente móviles, pudiendo trasladarlos a sitios más favorables cuando esto es posible. Las colonias, o fragmentos de ellas, a menudo se mueven a nuevos objetos que llegan a su territorio; si los mismos son luego transportados a otros sitios, la colonia de *W. auropunctata* viaja con ellos (Wetterer & Porter, 2003). Además, la poliginia, junto con el tamaño pequeño de las obreras y grande de las reinas, provoca una tasa alta de producción de obreras y de crecimiento colonial y poblacional (Wetterer & Porter, 2003).

Algunos autores sugieren que *W. auropunctata* muestra un alto nivel de agresión contra otras especies de hormigas, lo que les permite excluirlas por completo y dominar una zona (Brandão & Paiva, 1994; Way & Bolton, 1997; Delsinne et al., 2001; Le Breton et al., 2003). El pequeño tamaño de las obreras podría ser un rasgo que le permitiría ganar un combate con otras especies de hormigas (McGlynn, 1999).

Otra característica asociada a su éxito como invasora es su organización social unicolonial, en la que individuos de diferentes nidos se mezclan libremente formando una gran supercolonia altamente competitiva (Wetterer & Porter, 2003). Este rasgo parece conferir una gran ventaja a las poblaciones de *W. auropunctata* introducidas, gracias a la disminución en la competencia intraespecífica y la mayor eficiencia al competir con otras especies de hormigas (Holway & Suarez, 2004). La falta de territorialidad entre sus colonias permite que las poblaciones alcancen densidades mucho más altas que las colonias territoriales (Hölldobler & Wilson, 1977).

Recientemente se descubrió que esta especie posee dos tipos de poblaciones en cuanto a su sistema reproductivo: poblaciones sexuales (clásicas en himenópteros) donde obreras (estériles) y reinas se producen por reproducción sexual y machos por partenogénesis arrenótoca; y poblaciones clonales, en las cuales las reinas y los machos se reproducen clonalmente y las obreras estériles se producen sexualmente, al igual que en la mayoría de las especies de hormigas (Fournier et al. 2005a;

Foucaud et al., 2007). Se considera que la reproducción clonal otorga ventajas demográficas, ayudando a que las poblaciones se vuelvan numéricamente dominantes, a diferencia de poblaciones sexuales de la misma especie (Maynard Smith, 1978). En insectos sociales la clonalidad aumentaría la tasa de crecimiento colonial (Vorburger et al., 2003) y el potencial de dispersión (Sakai et al., 2001). Aún no se conoce el origen de la clonalidad en *W. auropunctata*.

Características de Wasmannia auropunctata en su rango nativo

Wasmannia auropunctata se encuentra, en su rango nativo, en dos tipos principales de hábitat: 1) en bosques primarios, sin modificación humana, donde tiende a ocupar regiones naturalmente perturbadas como planicies de inundación y 2) en áreas con gran actividad antrópica como ciudades, plantaciones y costados de caminos. A su vez se encontró que esta especie posee dos tipos de poblaciones, ecológicamente distintas, asociadas a cada tipo de hábitat: por un lado poblaciones **dominantes** (caracterizadas por alta densidad de nidos, reinas, obreras y crías), asociadas a ambientes antrópicos y a una baja riqueza específica de hormigas y, por otro lado, poblaciones **no dominantes** (con baja densidad de nidos, reinas, obreras y crías) asociadas a ambientes no perturbados por el hombre (Orivel et al., 2009). La perturbación humana dispara aumentos poblacionales de *W. auropunctata*, por lo que, en su área de distribución natural, esta especie es considerada como una especialista en perturbaciones (Majer & Delabie, 1999). El éxito de *W. auropunctata* en hábitats perturbados puede deberse, en parte, a las densidades más altas de homópteros que se alimentan de plantas de crecimiento secundario, representando una abundante fuente de hidratos de carbono, que puede provocar que *W. auropunctata* alcance poblaciones extremadamente densas (Deyrup et al., 2000).

Foucaud et al. (2009) estudiaron poblaciones de *W. auropunctata* en Guyana Francesa y Bahía, en Brasil, y encontraron que las poblaciones clonales se asocian mayormente a hábitats antrópicos, mientras que las sexuales se asocian a hábitats naturales, sugiriendo que la perturbación humana del ambiente proporciona condiciones ambientales que favorecen el establecimiento de poblaciones clonales. También observaron que las parejas (machos – reinas) de nidos clonales estaban genéticamente menos relacionadas entre sí que las parejas de nidos sexuales; como consecuencia, las obreras de nidos clonales son más heterocigotas que las de nidos sexuales. Propusieron entonces que la clonalidad permitiría mantener determinados genotipos en los machos y en las hembras, generando

obreras altamente heterocigotas. En particular, durante la evolución de esta especie, la clonalidad podría haber sido seleccionada en ambientes perturbados gracias a que mantiene combinaciones alélicas beneficiosas en esos ambientes. El alto nivel de heterocigosis en las obreras podría permitirle a *W. auropunctata* enfrentar las condiciones ambientales extremas presentes en los hábitats antrópicos (ej. Ferreira & Amos, 2006). Por otro lado, Foucaud et al. (2009) hallaron que tanto las poblaciones dominantes de *W. auropunctata*, como las no dominantes, y tanto las sexuales como las clonales, formaban supercolonias (Figura 1.4), por lo cual, contrariamente a lo esperado, la unicolonialidad no sería un factor que dispara la dominancia ecológica de las poblaciones nativas de *W. auropunctata*. En cambio, la unicolonialidad sí sería beneficiosa al promover la expansión de rango de poblaciones previamente dominantes. De hecho, diversos estudios señalan que la unicolonialidad sería beneficiosa en las últimas etapas del proceso de invasión (cuando la especie ya está establecida) ya que la ventaja de reducir la competencia intraespecífica, propia de la unicolonialidad, se alcanza cuando las poblaciones invasoras se vuelven más densas (Mooney & Hobbs, 2000; Sakai et al., 2001).

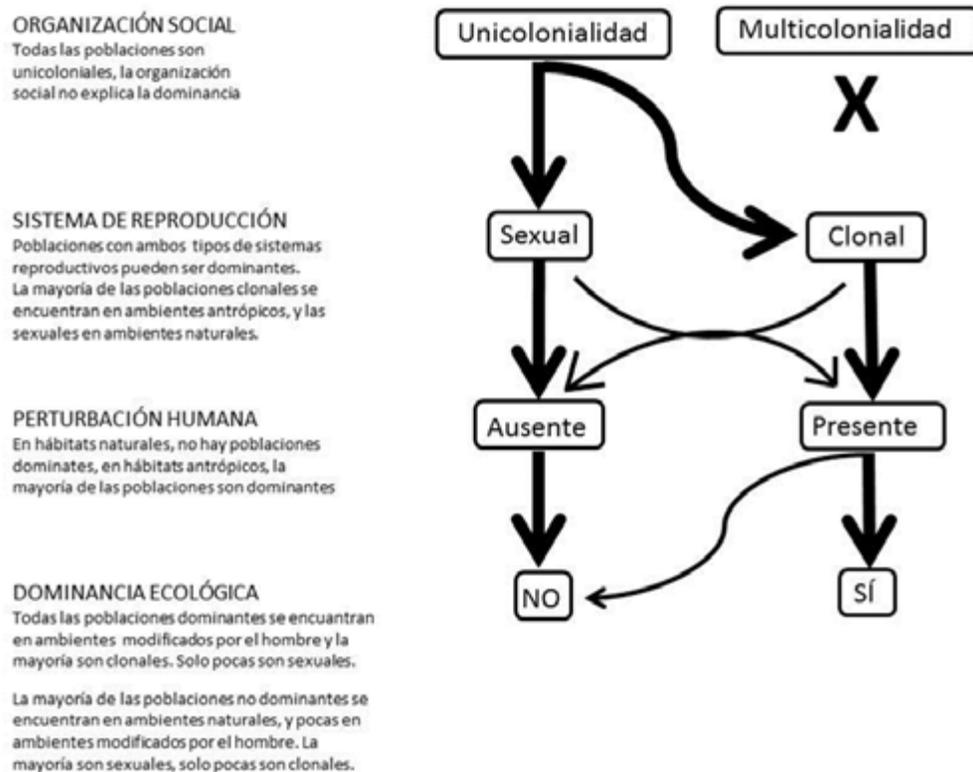


Figura 1.4. Esquema que representa las relaciones entre la dominancia ecológica de poblaciones de *Wasmannia auropunctata*, con la organización social, el sistema de reproducción y la perturbación humana del ambiente, inferido por Foucaud et al. (2009). Las flechas más gruesas representan eventos frecuentes y las flechas finas eventos raros.

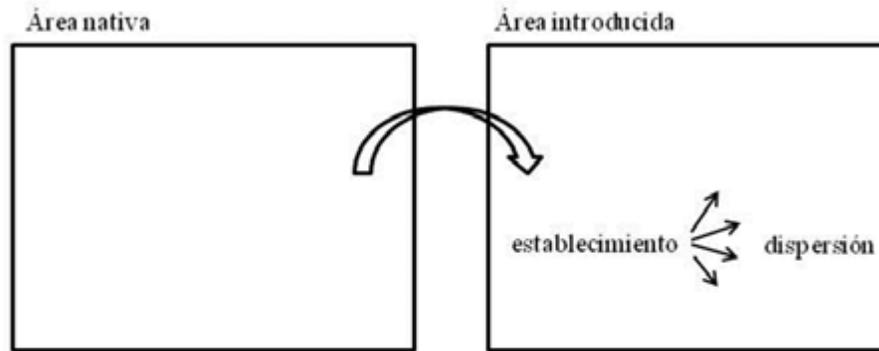
Características de Wasmannia auropunctata en su rango introducido

Todas las poblaciones introducidas de *W. auropunctata* son ecológicamente dominantes (Orivel et al., 2009) y poseen una organización social supercolonial (Le Breton et al., 2004; Vonshak et al., 2009) al igual que las poblaciones nativas presentes en ambientes antrópicos (Foucaud et al., 2009). Foucaud et al. (2010a), analizando poblaciones de *W. auropunctata* en 16 países del rango introducido (Figura 1.1), descubrieron que todas las poblaciones introducidas son clonales. Los niveles de heterocigosis de obreras de las poblaciones introducidas (todas clonales) son iguales a los de las poblaciones nativas clonales, y ambos son mayores a los de poblaciones nativas sexuales (Foucaud et al., 2010a). Foucaud et al. (2010a) sugieren que la clonalidad se originó en ambientes naturales, y ha sido seleccionada en ambientes antrópicos en el rango nativo. Resulta interesante desentrañar qué factores contribuyeron a la aparición de clonalidad en poblaciones naturales de *W. auropunctata* dentro de su área de distribución nativa.

Escenario de invasión de Wasmannia auropunctata

Una visión tradicional del proceso de invasiones biológicas supone un único paso, donde una especie exótica proveniente de un área distante se establece y se extiende en un área introducida (ej. gracias a que allí no posee enemigos naturales, o gracias a cambios adaptativos sufridos en el área introducida) (Figura 1.5a) (Richardson et al., 2000; Sakai et al., 2001; Colautti & MacIsaac, 2004). Foucaud et al. (2010a) en cambio, sugieren que en *W. auropunctata*, las poblaciones introducidas se originaron a partir de poblaciones nativas dominantes. Por lo tanto, a diferencia del modelo de invasión clásico (escenario de “un paso”), el escenario de invasión de *W. auropunctata* sería de “dos pasos”, donde primero colonizó áreas antrópicas en su rango nativo y posteriormente se estableció en áreas antrópicas en su rango introducido (Figura 1.5b). Así, *W. auropunctata* constituye un modelo muy interesante de especie invasora que ha sufrido importantes cambios en su ambiente nativo antes de su dispersión a largas distancias en el resto del mundo. Es interesante conocer cómo se produjo la transición de las poblaciones no dominantes a dominantes en el área de distribución nativa de esta especie, como factor clave en su éxito como especie invasora y como elemento clave en el estudio de invasiones biológicas (Foucaud et al., 2009).

(a) Visión tradicional de escenarios de invasiones biológicas: “un paso”



(b) Visión alternativa ilustrada para *W. auropunctata*: “dos pasos”

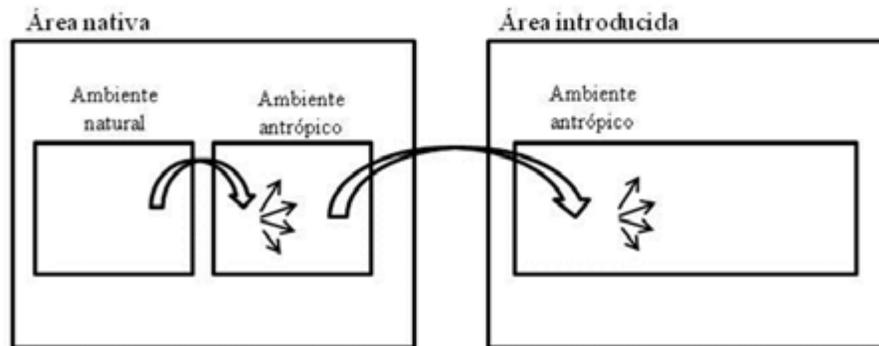


Figura 1.5. Esquema que representa: a) la visión tradicional de los escenarios de invasiones biológicas y b) el escenario de “dos pasos”, que explica, de manera más parsimoniosa, la invasión de *Wasmannia auropunctata* en el mundo (extraído de Foucaud et al., 2010a).

Invasión de Wasmannia auropunctata en la región Mediterránea

Wasmannia auropunctata se ha establecido en alrededor de 100 localidades en Israel (Vonshak et al., 2009, 2012). Un análisis genético indica que se trata de una única introducción, ya que hay un único genotipo de hembra y un solo genotipo de macho a lo largo de todo el país, y ambos se reproducen clonalmente (Vonshak et al., 2009). A su vez, la ausencia de agresión entre las obreras sugiere que la población introducida constituye una única supercolonia (Vonshak et al., 2009). En un estudio realizado en cooperación entre la FuEDEI y el Centre de Biologie et de Gestion des populations (CBGP- Montpellier, Francia) se identificó la posible población fuente de la invasión en Israel en el centro-este de Argentina, en la región de Zárate (Camping Las Tejas), provincia de Buenos

Aires (Rey et al., 2012). Dicha población posee la misma secuencia del gen mitocondrial COI (haplotipo) y prácticamente el mismo genotipo multilocus nuclear (compuesto por 12 marcadores microsátélites), que la población presente en Israel. A partir de experimentos realizados en el laboratorio, donde se sometió a obreras de distintas poblaciones de *W. auropunctata*, tanto nativas como introducidas y de origen tropical, subtropical y templado, (introducidas: Israel, Florida, Nueva Caledonia, Camerún; nativas: Guyana Francesa y Zárate, Argentina), se observó que las obreras de Argentina e Israel sobrevivían mejor y se recuperaban más rápido, luego de permanecer 16 horas a 2°C (*shock* de frío), que las de regiones tropicales, tanto nativas como introducidas (Rey et al., 2012). Este experimento sugirió entonces que la población introducida en Israel es más tolerante al frío que las poblaciones tropicales de *W. auropunctata* y que la introducción en Israel habría seguido un escenario de invasión mediado por una adaptación a temperaturas más frías en el límite sur de distribución nativa (ej. en la región alrededor de Zárate), previamente al establecimiento en la región Mediterránea.

Es por esto que Argentina constituye una región clave en la historia evolutiva de *W. auropunctata*, y en su capacidad de colonizar ambientes templados, por poseer condiciones ambientales más extremas, con un clima estacional, templado y relativamente más seco que las regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica. A pesar de los numerosos estudios realizados sobre *W. auropunctata* en el norte de Sudamérica, nada se conoce sobre la biología de esta especie en Argentina, el extremo sur de su distribución nativa. En particular, si en Argentina se encuentra la población fuente de la invasión en Israel, las poblaciones de *W. auropunctata* en esta región deberían presentar las características de poblaciones invasoras: ser ecológicamente dominantes (poseer alta densidad de nidos, obreras, reinas y crías), presentar clonalidad y supercolonialidad. Por otro lado, si *W. auropunctata* sufrió una adaptación a climas más fríos en su rango nativo, esto debería reflejarse en su historia evolutiva desde su origen y a través de su dispersión y diversificación en el Neotrópico.

Objetivos de la tesis e hipótesis de trabajo

El objetivo central de esta tesis doctoral es completar el escenario de invasión de *W. auropunctata* en la región Mediterránea analizando, por un lado, si en Argentina existen poblaciones con características invasoras, es decir, poblaciones ecológicamente dominantes, de reproducción clonal y organización social supercolonial. Corroborar esto dará sustento a la hipótesis del escenario

de invasión de “dos pasos” postulada por Foucaud et al. (2010a). Por otro lado, se desea analizar la historia evolutiva de *W. auropunctata* en su rango nativo, en un contexto filogeográfico, para evaluar si la introducción en el Mediterráneo es consistente con una dispersión natural gradual de *W. auropunctata* a latitudes mayores en su rango nativo, lo cual apoyaría la hipótesis que postula que la especie se adaptó progresivamente a temperaturas más frías hacia el sur de Sudamérica. Esta adaptación es posible ya que en *W. auropunctata* se mantiene la reproducción sexual. Finalmente, se desea descartar la habilidad competitiva de *W. auropunctata* como un factor importante que explique su éxito como invasora, postulando que logra invadir zonas modificadas por el hombre, gracias a la exclusión de sus hormigas competidoras y no gracias a poseer la capacidad de desplazarlas. Para cumplir con estos objetivos, se estudiará de manera multidisciplinaria la biología de *W. auropunctata* en el límite sur de su distribución nativa, es decir, la región fuente de la introducción en el Mediterráneo, abordando aspectos genéticos y ecológicos.

En general, responder estas tres preguntas será un importante aporte para dilucidar cuáles son los principales mecanismos que determinan el éxito de *W. auropunctata* como especie invasora y entender cómo logró una hormiga de origen tropical y subtropical, establecerse exitosamente en la región Mediterránea, caracterizada por clima templado.

Los tres objetivos generales y particulares, junto con las hipótesis y predicciones asociadas se detallan a continuación:

- **Objetivo 1. Determinar si en Argentina existen poblaciones de *W. auropunctata* con características de poblaciones invasoras (ecológicamente dominantes, mayormente clonales y supercoloniales).** (Capítulos 2, 3 y 4).

Para ello será necesario:

- a) Determinar la distribución y abundancia de *W. auropunctata* en el límite sur de su distribución nativa.
- b) Estudiar si en Argentina existen poblaciones ecológicamente heterogéneas (dominantes y no dominantes) asociadas a la perturbación del hábitat (antrópico o natural). Predicción: Se espera que *W. auropunctata* posea poblaciones dominantes en ambientes antrópicos y no dominantes en ambientes naturales.

- c) Analizar el sistema reproductivo de las poblaciones de *W. auropunctata* mediante marcadores microsatélites. Predicción: Se espera que las poblaciones en ambientes antrópicos presenten una mayor incidencia de clonalidad y las que se encuentran en hábitats naturales presentan una mayor incidencia de sexualidad.
- d) Conocer la organización social de *W. auropunctata* en Argentina. Predicción: Se espera que la organización social sea mayormente supercolonial tanto en áreas antrópicas como naturales.
- e) Adicionalmente se buscarán enemigos naturales en la región (potenciales agentes de control biológico, tales como patógenos y parasitoides).

- ***Objetivo 2: Estudiar la historia evolutiva de la especie y evaluar si se corresponde con una adaptación a climas más fríos en su rango nativo, clave para su establecimiento en la región Mediterránea.***(Capítulo 5)

Hipótesis: *W. auropunctata* se originó en regiones tropicales y posteriormente se dispersó a regiones de clima templado. Esta dispersión natural habría estado acompañada por una adaptación a climas más fríos, la cual sería clave para su establecimiento en ambientes con condiciones climáticas similares, como las que existen en la región Mediterránea.

Para ello será necesario:

- a) Analizar el pasado filogeográfico de la especie, su origen y patrón de dispersión a lo largo de su rango nativo por medio de marcadores moleculares, tanto mitocondriales como nucleares.
- b) Evaluar si las poblaciones presentes en Argentina son nativas o introducidas, analizando si el ingreso de la especie en esta región fue reciente, mediado por la actividad antrópica, o si ocurrió en una escala temporal evolutiva mediante una dispersión natural. Hipótesis 2b: Las poblaciones argentinas de *W. auropunctata*, que se encuentran en ambientes no tropicales, con condiciones ambientales más extremas, estacionalidad y un clima templado y seco, habrían llegado por dispersión natural en tiempos evolutivos, adaptándose entonces a estas condiciones extremas, lo que habría favorecido su posterior establecimiento en la región Mediterránea. Predicción: La diversidad genética en Argentina será alta, reflejando que no se trata de poblaciones introducidas, pero menor a la de las áreas de origen de la especie, por tratarse de una región colonizada recientemente en tiempos evolutivos.

c) Por medio de un modelado de nicho ecológico, estudiar i) su distribución actual, con el fin de identificar regiones centrales y marginales de distribución; ii) su distribución pasada -a lo largo de las fluctuaciones del Cuaternario- con el fin de identificar refugios pleistocénicos de la especie; iii) diferencias de distribución entre los clados A y B, evaluando si existe diferenciación de nicho que explique que el clado B ocupa regiones templadas, a diferencia del A que es exclusivamente tropical/subtropical. Predicciones: i) Argentina constituirá una región marginal de distribución de *W. auropunctata* por tratarse del límite sur de distribución nativa y una región de clima templado, ii) La distribución de *W. auropunctata* se verá afectada por las fluctuaciones climáticas durante el cuaternario y será posible identificar refugios pleistocénicos; iii) La distribución actual y los refugios pleistocénicos del clado A serán distintos a los del clado B, sugiriendo una diferenciación de nicho ecológico entre ambos clados.

- **Objetivo 3: Evaluar la habilidad competitiva de *W. auropunctata* en relación con otras especies de hormigas con las que coexiste.** (Capítulo 6)

Hipótesis: *W. auropunctata* raramente desplaza otras especies de un hábitat, por el contrario coloniza sitios libres de competidores, generalmente, sitios perturbados o modificados por el hombre, gracias a su mayor tolerancia fisiológica a ambientes extremos y no por ser una competidora superior.

Para ello se analizará su capacidad para descubrir y dominar fuentes de alimento en un ensamble de hormigas donde *W. auropunctata* coexista e interactúe con otras especies de hormigas. Predicción: Se espera que *W. auropunctata* posea una baja habilidad para descubrir y dominar recursos y que no sea capaz de desplazar a otras especies de los mismos.

Organización de la tesis

Para una mejor organización de la información, la tesis está dividida en siete capítulos. El capítulo 1 contiene una introducción general al tema de estudio con los objetivos generales de la tesis, los objetivos específicos y sus hipótesis asociadas. Los siguientes cinco capítulos contemplan los tres objetivos generales y las distintas preguntas desarrolladas en la tesis: el capítulo 2 analiza la distribución, dominancia ecológica y enemigos naturales de *W. auropunctata* en el sur de

Sudamérica; el capítulo 3 estudia su sistema de reproducción; el capítulo 4 analiza el tipo de organización social en Argentina; el capítulo 5 constituye un análisis filogeográfico utilizando marcadores moleculares y un modelado de nicho ecológico; y el capítulo 6 estudia la habilidad competitiva de *W. auropunctata* en un ensamble local en Argentina.

Si bien todos los capítulos están relacionados entre sí y toda la tesis guarda un hilo conductor, donde cada capítulo deja una pregunta abierta para el siguiente capítulo, se decidió estructurar cada capítulo con su propio resumen, introducción, metodología, resultados y discusión, para lograr que cada uno tenga cierta independencia, y así facilitar lecturas posteriores de capítulos específicos. Finalmente, el capítulo 7 contiene una integración final de todos los capítulos, con las conclusiones y resultados más relevantes de la tesis. Luego, se presenta una sección de información suplementaria de cada capítulo, y, por último, toda la bibliografía citada.

CAPÍTULO 2

Distribución de *Wasmannia auropunctata* en el sur de Sudamérica



Resumen. Se determinó la distribución de *W. auropunctata* en Argentina y países limítrofes como Uruguay, Paraguay, Bolivia y Brasil. Se analizó si en esta región existen poblaciones dominantes y no dominantes y se evaluó su asociación con el nivel de perturbación del ambiente. *Wasmannia auropunctata* resultó ampliamente distribuida en Argentina, pero fue abundante solo en ambientes perturbados, principalmente antrópicos como ciudades, parques y costados de caminos. En menor medida fue encontrada en sitios perturbados naturalmente, como la planicie de inundación del Río Paraná. *Wasmannia auropunctata* fue muy poco común en hábitats naturales con poca perturbación humana, como bosques primarios. La dominancia se asoció positivamente con el nivel de perturbación del ambiente. Esta especie habita las zonas más húmedas de la región, como la Pampa, el Espinal, la Selva Paranaense, las Yungas y la Mata Atlántica. En el Gran Chaco Sudamericano fue muy poco abundante (solo se la encontró en ambientes con abundante vegetación y humedad). En las ecorregiones del Monte y Patagonia estuvo prácticamente ausente, salvo un sitio irrigado artificialmente. Su distribución en Argentina se extiende hasta los 34°51'S, encontrándose hasta la localidad de Lozano, en la provincia de Buenos Aires. El área de distribución nativa de *W. auropunctata* parece haberse extendido hacia el sur durante los últimos 50 años. Se encontraron ginandromorfos en dos sitios antrópicos (Colón, en Argentina, y San Sebastián, en Brasil), lo cual constituye uno de los pocos hallazgos de esta clase de especímenes de *W. auropunctata* en la naturaleza.

Introducción

Los registros de *W. auropunctata* en el Neotrópico señalan su ocurrencia en la región subtropical de Sudamérica, en el sur de Paraguay y Brasil y el norte de Argentina y Uruguay, y sugieren que la especie sería nativa de esta región (Wetterer & Porter, 2003). El primer mapa de distribución de *W. auropunctata* en Argentina fue elaborado por Kusnezov (1951), quien mostró la existencia de la especie en tres regiones separadas: 1) desde el este de Brasil, llegando al noreste de Argentina, en las provincias de Formosa, Chaco, Santa Fe, Misiones, Corrientes y Entre Ríos, llegando hasta los 32°40'S, 2) desde el este de Bolivia y oeste de Paraguay, alcanzando Argentina a través de Jujuy y Salta hasta los 27°30'S en Tucumán, y 3) una pequeña región, en la provincia de Córdoba entre los 30° y 32°20'S. Estos primeros registros sugieren que los ~32°40'S representarían el extremo latitudinal sur de distribución de esta especie. En Uruguay solo existen pocos registros de *W. auropunctata*, en el norte del país (Kusnezov, 1951; De Zolessi et al., 1989). En Brasil, existen registros de *W. auropunctata* en diez estados, incluidos los estados del sur, como Río Grande del Sur, Santa Catarina, Paraná, San Pablo, Río de Janeiro y Mato Grosso (Kempf, 1972; Brandão, 1991).

Calcaterra et al. (2009) llevaron a cabo un muestreo de *W. auropunctata* a lo largo sitios naturales del noroeste y noreste de Argentina, utilizando métodos de colecta de hormigas de la hojarasca mediante tamices y cebos. Encontraron que la distribución de *W. auropunctata* en Argentina

llegaba hasta una latitud de 34°13'S (dos grados más que la registrada por Kusnezov (1951)), encontrándose entre los 45 y 750 metros de altitud. El ecosistema donde *W. auropunctata* fue más común fue el Chaco/ Espinal, y en mucha menor medida se la encontró en las Yungas y la Selva Paranaense. Sin embargo, en ninguno de los sitios *W. auropunctata* mostró gran abundancia numérica.

El objetivo de este capítulo es ampliar los muestreos de *W. auropunctata* en el límite sur de su distribución nativa, realizando búsquedas exhaustivas en Argentina y en países limítrofes (Uruguay, Paraguay, Bolivia y Brasil), tanto en sitios naturales como antrópicos. También se buscaron enemigos naturales, potenciales agentes de control biológico, en esta región. Se analizó si en esta región existen poblaciones dominantes y no dominantes, y se estudió si existe una asociación entre estas características ecológicas y el nivel de perturbación del ambiente. También se analizó si existe relación entre la poliginia y la perturbación del ambiente. En ambientes antrópicos se espera hallar poblaciones dominantes y mayor incidencia de poliginia, mientras que en ambientes naturales se espera hallar poblaciones no dominantes y mayor incidencia de monoginia.

Materiales y Métodos

Se realizaron relevamientos de campo para estudiar la presencia y abundancia de *W. auropunctata* en distintos ambientes (naturales y antrópicos con distinto grado de perturbación) abarcando desde bosques primarios hasta ambientes urbanos altamente modificados. El estudio se llevó a cabo principalmente dentro del área de distribución de *W. auropunctata* en Argentina y países limítrofes: Uruguay, Brasil, Paraguay y Bolivia. Los muestreos fueron hechos a través de rutas principales y caminos secundarios. Se buscaron nidos en ambientes con distinto nivel de perturbación: dentro de los lugares con bajo nivel de perturbación antrópica se muestreó en bosques primarios y secundarios (región de Yungas en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy y Selva Paranaense en Misiones), a lo largo de la planicie de inundación del río Paraná y bosques en galería cerca de ríos. Dentro de lugares con mayor nivel de perturbación antrópica se muestreó en parques, plazas y veredas de ciudades, cultivos y costados de rutas.

El método de colecta en cada sitio consistió en ~45 minutos de búsqueda manual en troncos, debajo de piedras y en la hojarasca. En sitios antrópicos los nidos se encontraban fácilmente, ya sea debajo de piedras como en los troncos de los árboles. Sin embargo, en sitios con baja perturbación antrópica, como bosques primarios y secundarios, la búsqueda manual era insuficiente para detectar la

presencia de *W. auropunctata*, debido a su baja abundancia (Calcaterra et al., 2009; Calcaterra, 2010). Por lo tanto, la búsqueda manual fue complementada con técnicas de muestreo adicionales como colocación de cebos y tamizado de hojarasca.

Los cebos consisten en pequeñas tarjetas de papel de 5x5 cm, con ~1 gramo de manteca de maní o atún. Los mismos son útiles para atraer especies de hormigas generalistas que forrajean en el suelo. Se colocaban alrededor de 20 cebos sobre una transecta lineal, separados ~10 metros entre sí. A partir de los cebos donde se detectaba la presencia de *W. auropunctata*, se trataba de localizar el nido siguiendo el sendero de obreras. Por otro lado, el tamiz consiste en una bandeja plástica de 50x37 cm, con una malla con perforaciones de 1x1 cm por encima. Manualmente se toma la hojarasca de un cuadrante de 1m² y se tamiza realizando movimientos laterales, para separar la materia orgánica gruesa. La materia orgánica más fina cae en la bandeja plástica, junto con las hormigas, y pequeños insectos, los cuales pueden ser fácilmente colectados. Se tamizaban aproximadamente 10 cuadrantes de 1 m² de hojarasca por sitio. Aunque este método es menos eficiente que los cebos para localizar los nidos, es útil para detectar la presencia de *W. auropunctata* y no registrar ausencias erróneamente. Si bien los distintos métodos de muestreo empleados poseen diferente eficacia, el diseño de muestreo se basó en la diferencia en la naturaleza de los ambientes antrópicos y naturales. La superficie y distribución de los sitios de nidificación en ambientes naturales es mayor que la de sitios antrópicos, es por esto que el muestreo fue más intenso en los ambientes naturales para poder determinar si *W. auropunctata* estaba presente pero en baja densidad y abundancia.

Se registró la posición geográfica de cada nido (o presencia de *W. auropunctata* en el caso de que no se encontraran los nidos) utilizando un GPS. Si bien en este trabajo, y a lo largo de toda la tesis, no se delimitaron las poblaciones de *W. auropunctata*, cada sitio o localidad de muestreo se consideró, de aquí en más, una población, teniendo siempre en cuenta que es posible que no sean verdaderas poblaciones.

Se registró la cantidad de reinas en cada nido para establecer si son monóginos o políginos. Se estableció la dominancia ecológica de 55 poblaciones de Argentina, a partir de evaluar la densidad de nidos, obreras y reinas en un área de una hectárea aproximadamente. Solo se estableció la dominancia de las poblaciones relevadas en Argentina debido a que los muestreos en los otros países no fueron suficientemente exhaustivos, ya que se priorizó colectar individuos en la mayor cantidad de localidades posible, disminuyendo el esfuerzo de muestreo dentro de cada localidad.

Una población fue considerada ecológicamente no dominante cuando el número de nidos encontrados fue entre 1 y 3, el número de obreras dentro de cada nido no fue mayor a 100 y la reina estaba ausente o solo había una reina por nido. Por el contrario, una población se consideró ecológicamente dominante cuando se encontraron más de 4 nidos por sitio, cada uno compuesto por más de 1000 obreras y múltiples reinas. Se estudió, mediante una prueba de independencia, si existe asociación entre la dominancia ecológica y el nivel de perturbación del hábitat: a) bajo (sitios naturales como bosques primarios), b) medio (sitios medianamente perturbados por el hombre como bosques secundarios o naturalmente perturbados como planicies de inundación) y c) alto (sitios urbanizados o agrícolas). También se analizó, por medio de una prueba de independencia, si existe alguna relación entre la poliginia y la monoginia con el nivel de perturbación del hábitat. Los nidos fueron examinados a campo y en laboratorio para la búsqueda de enemigos naturales (parásitos, parasitoides, depredadores) o cualquier insecto asociado.

Adicionalmente, para completar los registros de presencia de *W. auropunctata*, se contó con muestras provenientes de muestreos de colegas, provenientes de trampas de caída. Estas trampas consisten en tubos plásticos de 50 ml, de 3 cm de diámetro, con 25 ml de agua y unas gotas de detergente para disminuir la tensión superficial y evitar el escape de las hormigas. Cada trampa es enterrada al ras del suelo, y luego de 48 horas su contenido es removido y las hormigas separadas y preservadas en alcohol al 96% para su posterior identificación en el laboratorio.

Análisis estadísticos

Las pruebas de independencia se realizaron con el programa Past v.1.17 (Hammer & Harper, 2001).

Resultados

Se relevó un total de 252 nidos, agrupados en 97 *clusters* (nidos agrupados) en 92 localidades a lo largo de Argentina, Uruguay, Bolivia, Paraguay y Brasil (Figura 2.1 y Tabla S.2.1). Los nidos se consideraron formando parte de un mismo *cluster* cuando estuvieron distanciados entre sí menos de 30 metros. *Wasmannia auropunctata* resultó estar ampliamente distribuida en la región. Fue

común en el noreste de Argentina, a lo largo de la cuenca del Río Paraná hasta Buenos Aires, en el noroeste del país y en la Mata Atlántica.

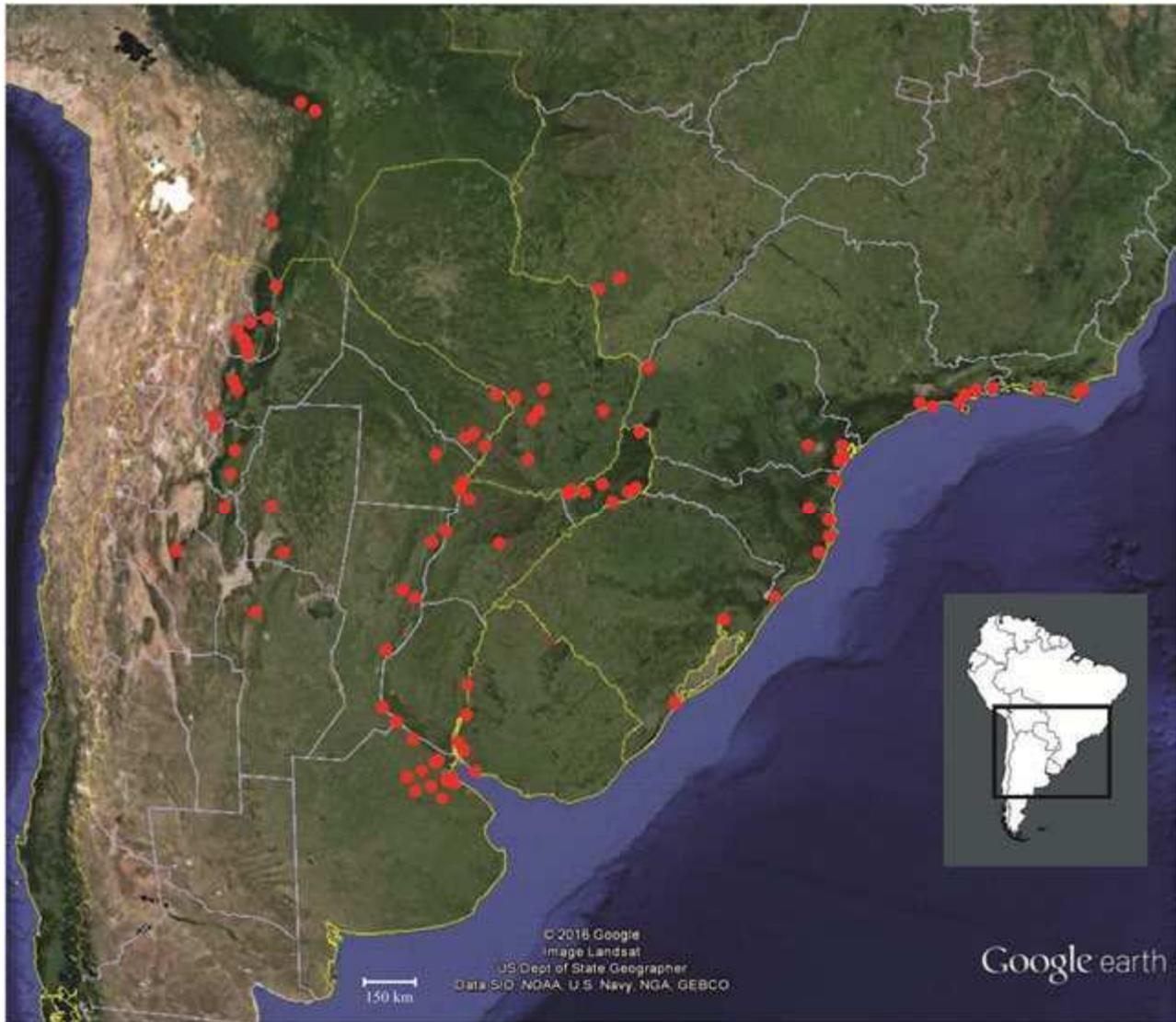


Figura 2.1. Sitios con presencia de *Wasmannia auropunctata* en el límite sur de su distribución nativa en Sudamérica.

Asociación entre la perturbación y la dominancia ecológica

El 66 % (61 de 92) de los sitios donde se colectó *W. auropunctata* se corresponde a ambientes altamente perturbados por el hombre, como zonas urbanas (Figura 2.2). En estos hábitats, *W. auropunctata* fue común en parques y debajo de veredas. También se la encontró en la vegetación

al costado de rutas y caminos (Figura 2.3) y en plantaciones de banana en el norte de Argentina, en las provincias de Jujuy y Formosa. Los nidos se encontraron generalmente bajo piedras o alrededor o dentro de los troncos de los árboles, siempre en sitios sombríos, que conservan humedad, o cerca de algún sistema fluvial como ríos. En este tipo de hábitat, fue común que *W. auropunctata* se encuentre agregada, con nidos agrupados en *clusters*, alejados entre sí unos pocos metros (entre 2 y 30 metros aproximadamente). La densidad de nidos y obreras fue alta, tratándose mayormente de poblaciones dominantes.

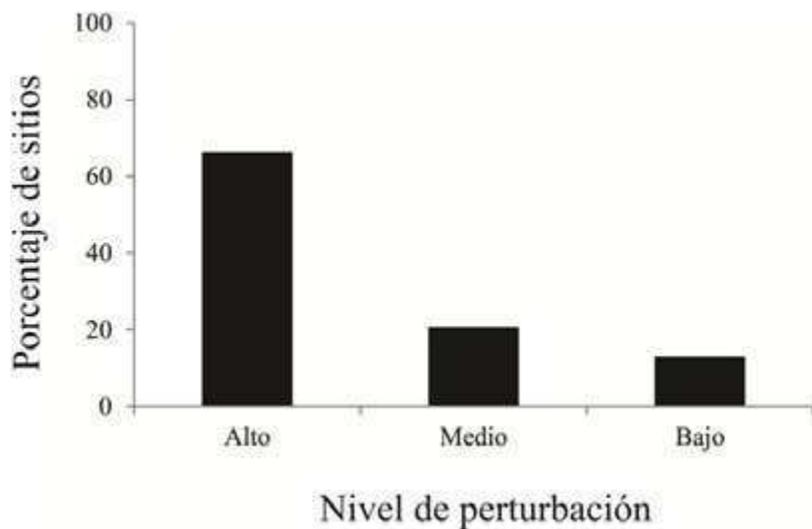


Figura 2.2. Porcentaje de sitios con distintos niveles de perturbación (alto, medio y bajo) con presencia de *Wasmannia auropunctata*.

El 19 % (18 de 92) de los sitios con presencia de *W. auropunctata* tuvo un nivel de perturbación medio (Figura 2.2), por ejemplo sitios con actividad humana pero que conservan relativamente la integridad del hábitat (ej. campings), bosques secundarios y bosques con perturbación natural, como los presentes en la planicie de inundación del río Paraná (Puerto Ocampo en Santa Fe, Isla del Cerrito en Chaco, Camping Machuca en Corrientes) y los Esteros del Iberá en Corrientes. En estos sitios las poblaciones de *W. auropunctata* fueron mayormente no dominantes, es decir presentaron una baja densidad de nidos y obreras.

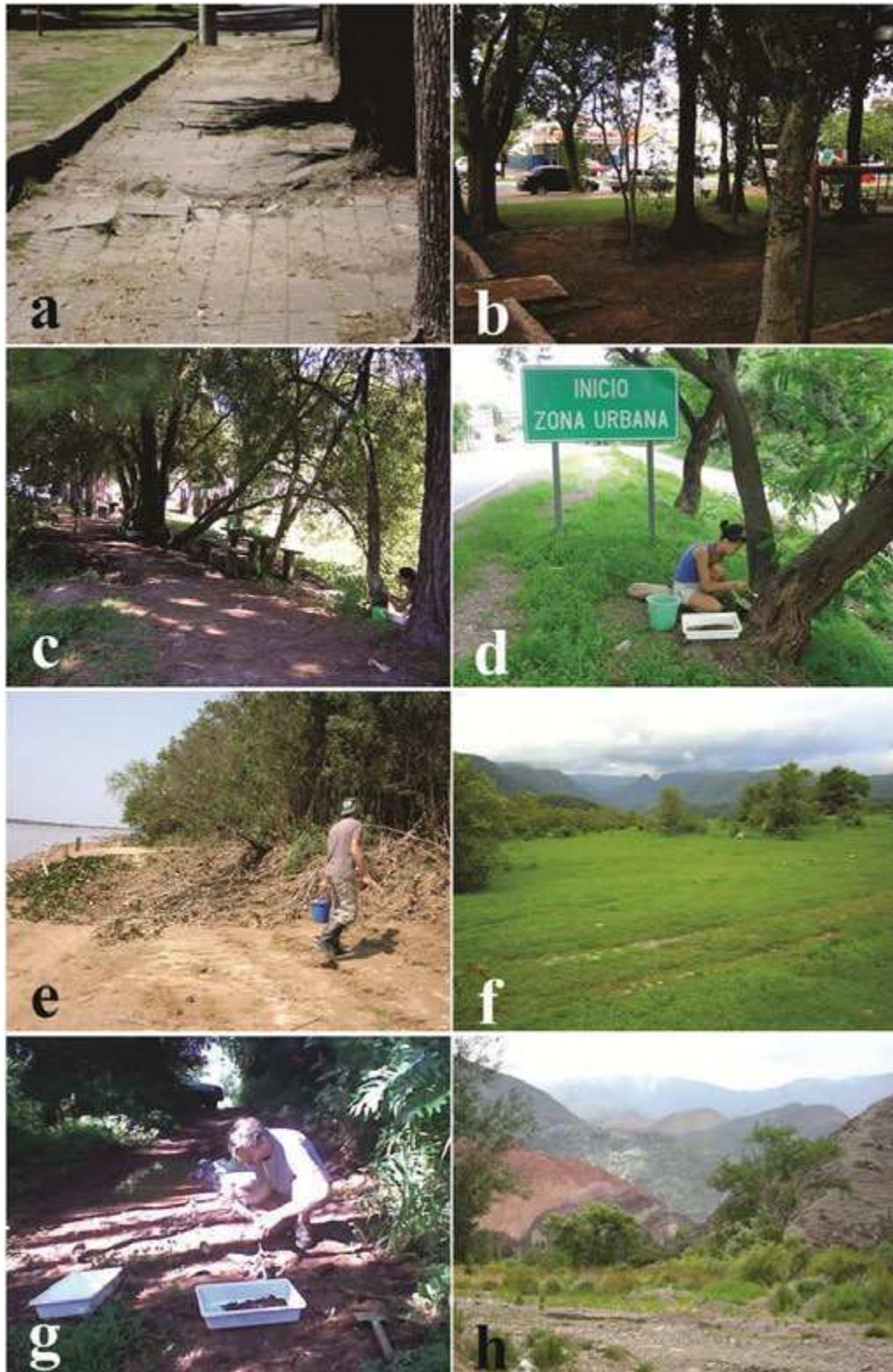


Figura 2.3. Hábitats donde *Wasmannia auropunctata* fue común: debajo de veredas en sitios con sombra (a), parques urbanos (b), bosques secundarios de campings (c), banquinas de caminos (d), bosques de planicie de inundación (e), pradera en bosque montano (f), borde de bosques primarios (g) y bajo piedras en sitios húmedos de la ecorregión de la Puna (h).

El 14% (13 de 92) de los sitios con presencia de *W. auropunctata* correspondió a hábitats naturales, con baja perturbación humana, como bosques primarios o secundarios poco perturbados. Fue escasa en los bosques nativos en el norte de Argentina, como Yungas o Selva Paranaense. En estos bosques prácticamente no se encontraron nidos, por el contrario, solo se hallaron obreras por medio de métodos de colecta como trampas de caída o tamiz. Las poblaciones en estos ambientes fueron no dominantes. En las Yungas, la única población dominante se encontró en un pastizal de altura (pradera) (Ocloyas, Figura 2.3f). En la Selva Paranaense solo se encontró un nido en un tronco al lado de un camino secundario (Figura 2.3g).

Se observó una asociación entre la dominancia ecológica de las 55 poblaciones de Argentina analizadas y el nivel de perturbación del ambiente ($\chi^2 = 14,73$; $gl = 2$; $P < 0.001$; Tabla 2.1 y Figura 2.4). En los ambientes con bajo nivel de perturbación, la mayoría de las poblaciones fueron no dominantes; en los ambientes de perturbación media, la mayoría de las poblaciones fueron no dominantes, aunque también existen poblaciones dominantes; y en los ambientes de perturbación alta la mayoría de las poblaciones fueron dominantes.

Tabla 2.1. Tabla de contingencia utilizada para realizar la prueba de independencia para estudiar si existe asociación entre la dominancia ecológica de las poblaciones de *Wasmannia auropunctata* y el nivel de perturbación del hábitat.

| | | Nivel de perturbación | | | Total |
|-----------|--------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | Bajo | Medio | Alto | |
| Población | No Dominante | 11 | 11 | 8 | 30 |
| | Dominante | 1 | 5 | 19 | 25 |
| Total | | 12 | 16 | 27 | 55 |

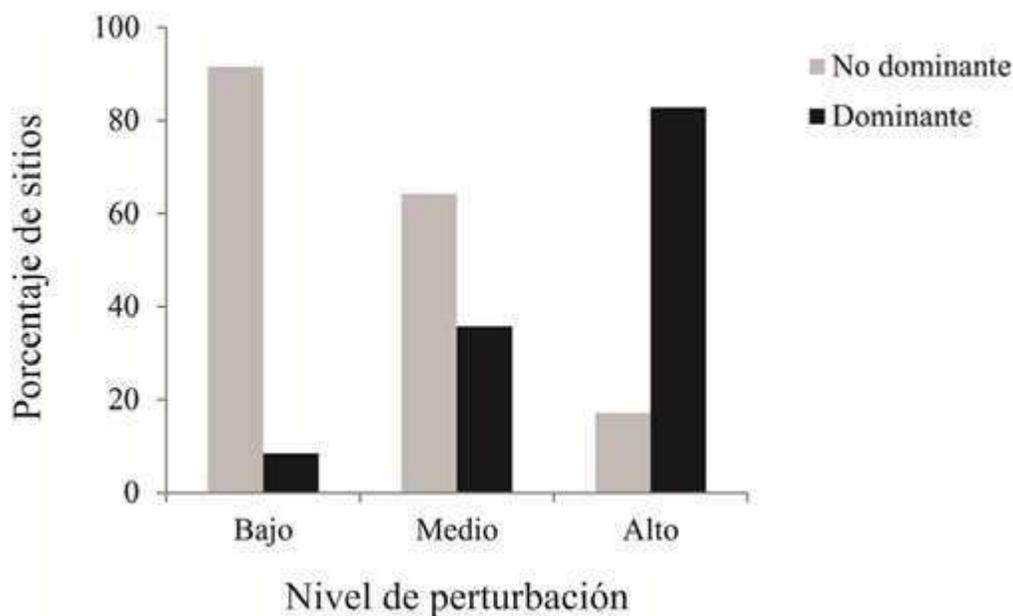


Figura 2.4. Porcentaje de sitios con poblaciones dominantes y no dominantes encontrados en hábitats con distinto nivel de perturbación (bajo, medio y alto).

Asociación entre la perturbación y el número de reinas

La mayoría de los nidos no presentó ninguna reina, independientemente de la perturbación del hábitat (Tabla 2.2 y Figura 2.5). Sin embargo, sí existió una asociación entre la proporción de nidos sin reina/monóginos/políginos y el nivel de perturbación del ambiente ($\chi^2 = 9,64$; $gl = 4$; $P < 0,05$): ningún nido presente en sitios con bajo nivel de perturbación fue polígino, mientras que los sitios con nivel de perturbación medio y alto, mostraron mayor frecuencia de poliginia que de monoginia (χ^2 (medio) = 5,12; $gl = 1$; $P < 0,05$; χ^2 (alto) = 10,47; $gl = 1$; $P < 0,01$).

Tabla 2.2. Tabla de contingencia con el número de nidos sin reinas/monóginos/políginos en cada tipo de ambiente. La misma fue utilizada para la prueba de independencia para analizar la asociación entre el número de reinas y la perturbación del ambiente.

| | | Nivel de perturbación | | | Total |
|--------------|-----------|-----------------------|-----------|------------|------------|
| | | Bajo | Medio | Alto | |
| Nidos | Sin reina | 12 | 38 | 78 | 128 |
| | Monóginos | 5 | 10 | 28 | 43 |
| | Políginos | 0 | 23 | 58 | 81 |
| Total | | 17 | 71 | 164 | 252 |

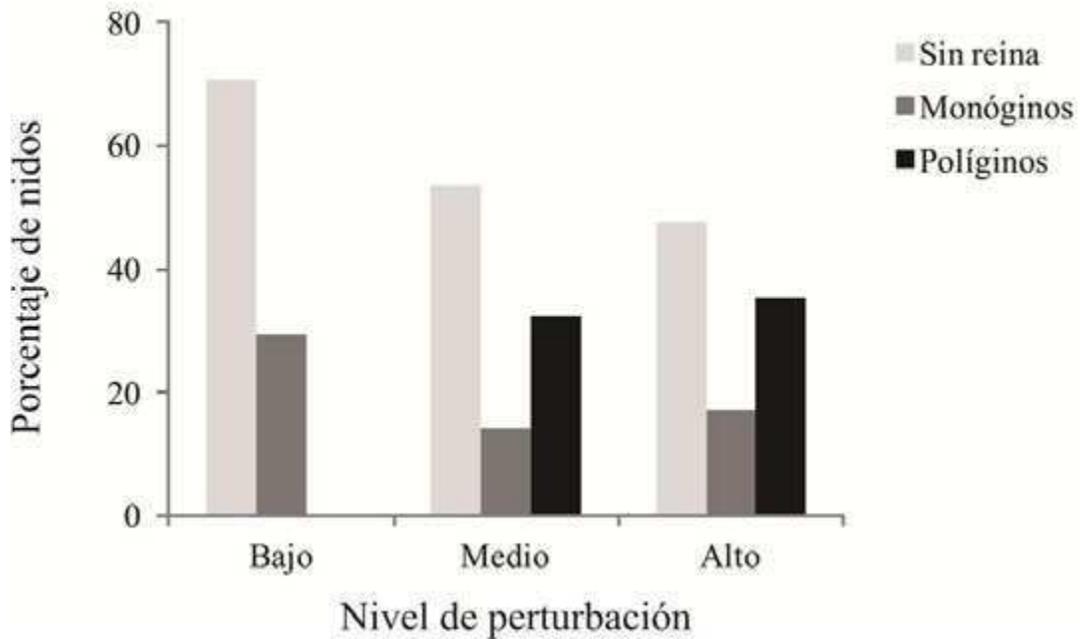


Figura 2.5. Porcentaje de nidos con o sin reinas (una reina: monóginos; más de una reina: políginos), en sitios con distinto nivel de perturbación. Los números por encima de cada barra indican el número de nidos por categoría.

Wasmannia auropunctata fue encontrada en la localidad de Lozano (34°51'S, 59°03'O, 45m, col. Francisco Sola) en la provincia de Buenos Aires, lo que representa el registro más austral reportado hasta ahora para esta especie (Figura 2.1). Inesperadamente, también se la encontró por primera vez en el árido desierto de la ecorregión del Monte, en la localidad de Anillaco, provincia de La Rioja (28° 49'S, 66° 56'O, col. Adriana Aranda), y hasta 2125 m de altitud, en la localidad de Tumbaya (23°51'S, 65°28'O), ecorregión de la Puna, provincia de Jujuy (Figura 2.3h).

Enemigos naturales

No se registraron potenciales agentes de control biológico (moscas parasitoides, microhiménopteros o microsporidios) en ninguna colonia de *W. auropunctata*. Los únicos enemigos naturales hallados fueron escarabajos mirmecófilos (Coleoptera: Scydmaenidae: Scydmaeninae; Figura 2.6a) en dos colonias de *W. auropunctata* en Jujuy, que podrían ser depredadores de huevos o larvas. También se encontraron obreras y reinas parasitadas por ácaros en el Camping Las Tejas, Zárate (Figura 2.6b).



Figura 2.6. Escarabajo mirmecófilo de la subfamilia Scydmaeninae (Coleptera) encontrado en dos nidos de *Wasmannia auropunctata* en Jujuy (a). Ácaros infectando obreras encontrados en una colonia en el Camping Las Tejas, Zárate, provincia de Buenos Aires (b).

Ginandromorfos

Se encontraron ginandromorfos en dos de las 92 poblaciones relevadas (Figura 2.7). Dos ginandromorfos se hallaron en un nido en la localidad de Colón, provincia de Entre Ríos, Argentina (32°14'S, 58°08'O) y 3 se hallaron en un nido en San Sebastián, en Brasil (23°45'S, 45°24'O). Estos especímenes son individuos de la casta reproductora que presentan una aberración genética: poseen la mitad de su cuerpo correspondiente a un fenotipo de hembra y la mitad a un fenotipo de macho (Jones & Phillips, 1985). Las dos poblaciones donde se encontró esta clase de individuos se encontraban en sitios antrópicos y eran poblaciones dominantes, ya que poseían una alta densidad de nidos, obreras y reinas.

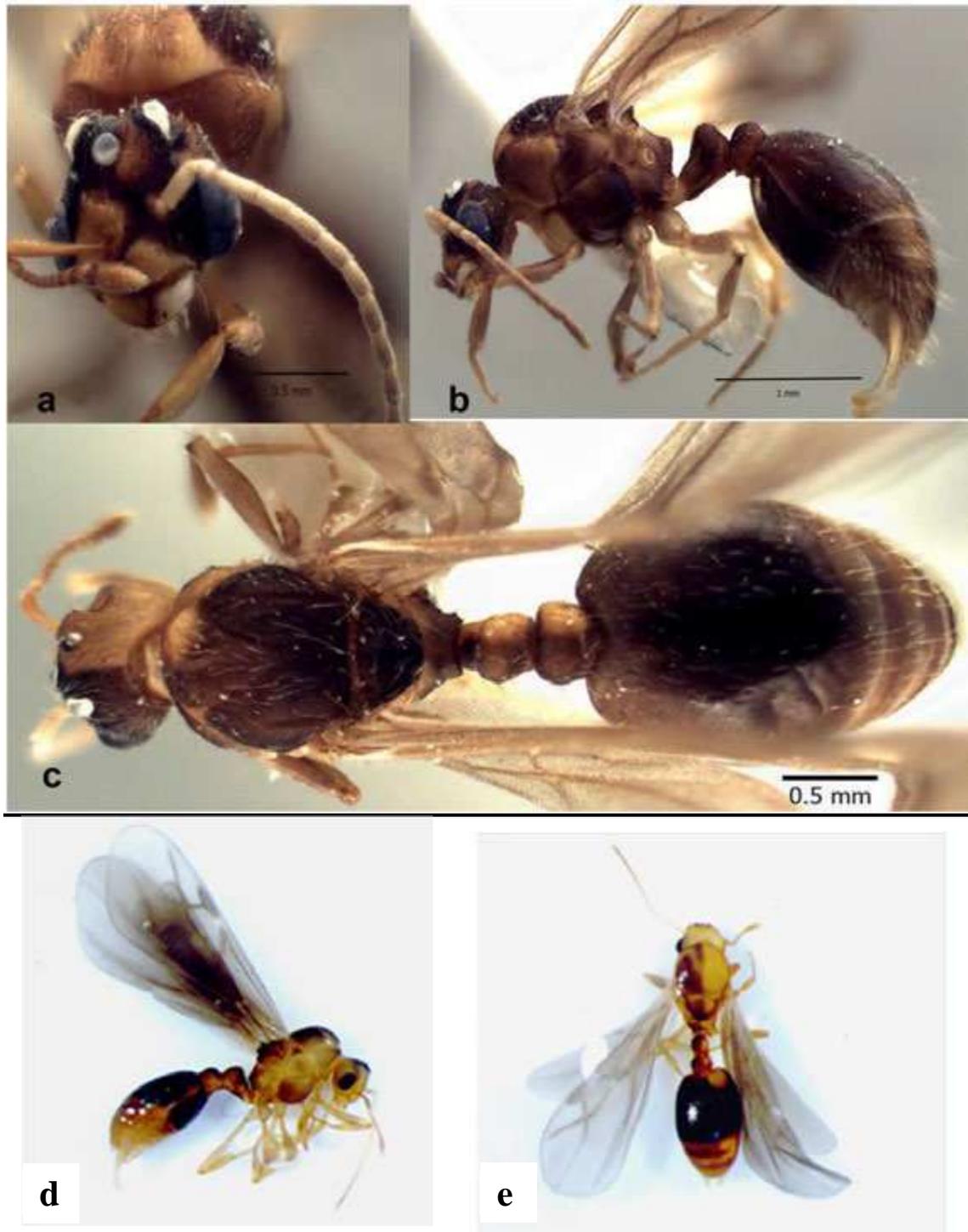


Figura 2.7. Vista de la cabeza (a), lateral (b y d) y dorsal (c y e) de ginandromorfos de *Wasmannia auropunctata* encontrados en una colonia en la localidad de Colón, Entre Ríos, Argentina. Se observa que el individuo posee pigidio (órgano copulador del macho), pero la mitad izquierda de la cabeza corresponde a un fenotipo macho, mientras que la mitad derecha corresponde a un fenotipo hembra (Fotos a-c: Cuezco et al., 2015). También se observa una diferencia de coloración a lo largo del mesosoma, el peciolo y post-peciolo, la mitad derecha siendo más clara y la mitad izquierda más oscura (e).

Discusión

Wasmannia auropunctata resultó ampliamente distribuida en Argentina, extendiéndose hasta los 34°51'S, en la localidad de Lozano, provincia de Buenos Aires. Esta especie habita las zonas más húmedas de la región, como la Pampa, el Espinal, el Chaco Húmedo, la Selva Paranaense y las Yungas. Fue muy poco abundante en el Chaco Seco (solo se la encontró en ambientes con abundante vegetación y humedad), y estuvo prácticamente ausente en las ecorregiones del Monte y la Patagonia (en la región del Monte solo se encontró una colonia en un jardín irrigado artificialmente en Anillaco, provincia de La Rioja). El muestreo realizado en este trabajo fue muy exhaustivo, principalmente en el noroeste y noreste Argentino y el sur de Uruguay y Brasil, bordeando la costa Atlántica. Aunque en diversas localidades no se haya registrado la presencia de *W. auropunctata*, no se puede asegurar que la especie esté ausente en esos sitios. Tyre et al. (2003) sugieren que es necesario visitar un sitio entre 3 y 6 veces para medianamente poder asegurar que una especie no está realmente presente y no cometer errores asociados a falsos negativos. En el caso de este trabajo se priorizó muestrear una mayor cantidad de sitios con una sola visita.

La distribución actualizada de *W. auropunctata*, informada en este capítulo, coincide ampliamente con los muestreos de Kusnezov (1951). Sin embargo, su área de distribución nativa parece haberse extendido hacia el sur durante los últimos 50 años llegando hasta el límite latitudinal actual de 34°51'S, dos grados más alto que el reportado por Kusnezov (1951), e informado por Wetterer & Porter (2003), cuyo registro más austral de *W. auropunctata* se hallaba en la provincia de Entre Ríos en Argentina.

Si bien *W. auropunctata* estuvo ampliamente distribuida en la región, solo fue abundante en ambientes perturbados, principalmente antrópicos, como ciudades, parques y costados de caminos, y en menor medida en sitios perturbados naturalmente, como la planicie de inundación del Río Paraná. *Wasmannia auropunctata* fue muy poco común en hábitats naturales con poca perturbación humana, como bosques primarios o secundarios. En estos sitios los ensambles de hormigas suelen ser más diversos en comparación con hábitats antrópicos. Existió una asociación entre la dominancia ecológica de las poblaciones de *W. auropunctata* y el nivel de perturbación del ambiente. En los ambientes con bajo nivel de perturbación, la mayoría de las poblaciones de *W. auropunctata* encontradas fueron no dominantes. En los ambientes de perturbación media, si bien la mayoría de las poblaciones fueron no dominantes, también existen poblaciones dominantes. En los ambientes de

perturbación alta la mayoría de las poblaciones fueron dominantes. Por otro lado, también existió una asociación entre la frecuencia de nidos políginos y el nivel de perturbación del hábitat.

Solo se encontraron dos posibles enemigos naturales de *W. auropunctata* en esta región (un escarabajo mirmecófilo y ácaros). Sin embargo, ninguno de ellos podría ser considerado como posible agente de control biológico, debido a que son especies normalmente generalistas (ej. Paivinen et al., 2002). No se encontró ningún agente potencial de control biológico para hormigas (microsporidios, moscas o microhimenópteros parasitoides). Esto puede deberse a que se trata de una zona marginal de distribución de *W. auropunctata*. Debido a que la relación entre una especie y sus enemigos naturales es producto de un largo proceso de coevolución, se asume que la mayoría de los enemigos naturales de una especie se encuentran con mayor probabilidad en sitios que esa especie habita hace miles de años, es decir, sitios centrales de distribución. Hasta el momento, el único parasitoide de *W. auropunctata* encontrado, el microhimenóptero *Orasema minutissima*, se distribuye en Centroamérica, área que constituiría una región central de distribución de *W. auropunctata*. En el capítulo 5 se analizan cuáles son las áreas centrales y marginales de distribución de *W. auropunctata*, por medio de marcadores moleculares y modelado de nicho ecológico, y se evalúa si Argentina corresponde a una zona marginal y Centroamérica una zona central. Esto explicaría, al menos en parte, la ausencia de enemigos naturales en el sur de Sudamérica, y la presencia del único parasitoide conocido para esta especie en Centroamérica.

Los ginandromorfos de *W. auropunctata* encontrados en las localidades de Colón y San Sebastián constituyen uno de los pocos hallazgos de esta clase de especímenes en la naturaleza. Existen algunos registros previos de ginandromorfos en el rango nativo de *W. auropunctata*, en las colecciones de Kusnezov, depositados en el Instituto y Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina y descritos por Fabiana Cuezco (Cuezco et al., 2015) y en colonias colectadas en Brasil (com. pers. Olivier Rey). También existe un registro en el rango introducido, en Israel, la cual se sabe que deriva de una población clonal (com. pers. Olivier Rey). Esta clase de individuos fue también hallada en colonias experimentales, al realizar cruzamientos controlados entre diferentes poblaciones clonales de *W. auropunctata* (com. pers. O. Rey).

Si bien el ginandromorfismo es una anomalía poco común en la naturaleza, ha sido previamente descrito en más de 40 especies de hormigas (Jones & Phillips, 1985) y en otras especies haplodiploides, principalmente abejas (Oliveira & Andrade, 2006; Michez et al., 2009), aunque

también se conocen pocos casos en otras familias de insectos y ha sido descrito en una especie partenogenética de crustáceo (Campos-Ramos et al., 2006). En la avispa *Nasonia vitripennis*, se demostró que, al menos en esta especie, es un fenómeno bajo control genético (Kamping et al., 2007). Pero también en esta avispa puede surgir como consecuencia de las condiciones ambientales durante el desarrollo embrionario, como ser altas temperaturas (Kamping et al., 2007), como es el caso de la hormiga faraón *Monomorium pharaonis* (Berndt & Kremer, 1982); o por infección por *Wolbachia* como el caso del isópodo *Armadillidium vulgare* (Rigaud & Juchault, 1993). El ginandromorfismo puede producir esterilidad en los individuos que lo poseen (ej. Szabad & Fajsz, 1982). En *W. auropunctata*, no ha sido posible aún probar si los ginandromorfos son estériles o no, debido a la dificultad de forzar cruzamientos entre individuos en el laboratorio (com. pers O. Rey). En el caso de que sean estériles, y dado que hasta el momento solo se han encontrado en poblaciones clonales, entonces el ginandromorfismo podría representar un costo de la reproducción clonal (com. pers O. Rey). Las características ecológicas dominantes de las dos poblaciones donde se encontraron los ginandromorfos aquí, y su hallazgo en ambientes antrópicos, sugieren que se trataría de poblaciones clonales. El sistema reproductivo de estas dos poblaciones será corroborado en el capítulo 3.

CAPÍTULO 3

Sistema de reproducción de *Wasmannia auropunctata* en el sur de Sudamérica



Foto: Denis Fournier

Resumen. Se estudió, por medio de marcadores microsatélites, el sistema de reproducción de las poblaciones presentes en límite sur de distribución nativa de *W. auropunctata* y su asociación con la perturbación del ambiente, y la dominancia ecológica de las poblaciones. Se identificaron distintos linajes clonales y sexuales. Mediante la construcción de un dendrograma de Neighbor-joinig, se analizó si éstos se dividen en unidades evolutivas diferentes. La mayoría de las poblaciones presentó un sistema de reproducción clonal, asociado a sitios antrópicos y a poblaciones dominantes (con alta densidad de nidos, obreras y reinas), corroborando que en sur de Sudamérica se observa el mismo patrón de asociación entre sistema de reproducción, tipo de hábitat y características ecológicas de las poblaciones, previamente descrito para la especie en el norte del continente. También se encontraron 6 poblaciones con un sistema de reproducción mixto, principalmente en sitios con perturbación media, como perturbados naturalmente (ej. planicies de inundación). Solo cuatro poblaciones resultaron sexuales en el noreste de Argentina, pero no se asociaron a ningún tipo de ambiente. Sin embargo, los ambientes naturales solo presentaron poblaciones sexuales. En las mayores latitudes donde *W. auropunctata* está presente, solo se han establecido poblaciones clonales. La clonalidad, asociada a ambientes modificados por la actividad humana, parece jugar un papel importante en el éxito de *W. auropunctata* en el extremo sur de su rango nativo, pudiendo ser el mecanismo por el cual esta especie logró expandir su rango a latitudes mayores en Sudamérica, en sitios caracterizados por clima templado, con marcada estacionalidad. Se identificaron 40 linajes clonales. Los linajes clonales y sexuales no formaron unidades evolutivas independientes. La gran diversidad clonal encontrada sugiere que los eventos de reproducción sexual que originan nuevos linajes clonales son comunes en las poblaciones de *W. auropunctata* de esta región. Por último, las dos poblaciones donde se encontraron ginandromorfos, presentaron un sistema de reproducción clonal, apoyando la hipótesis de que esta aberración genética podría ser un costo de la clonalidad en *W. auropunctata*.

Introducción

En los insectos existe una gran variedad de sistemas de reproducción y de determinación del sexo, como el diplodiploide, la telitoquia, el haplodiploide y también sistemas mixtos (Normark, 2003). En hormigas, el sistema usual es el que existe en la mayoría de los himenópteros: el haplodiploide, en el cual las hembras son diploides y los machos haploides. Así, las hembras (ya sea reinas u obreras estériles) se producen a través de la reproducción sexual entre un macho y una reina (es decir, surgen de huevos que sufrieron meiosis y fertilización), y los machos surgen a través de partenogénesis arrenotóquica (a partir de huevos no fertilizados) (Cook, 1993). Evolutivamente, el sistema haplodiploide y su rol en la determinación de castas de insectos sociales ha sido la base para el surgimiento de nuevos y extraordinarios sistemas genéticos de determinación del sexo (Fournier et al., 2005a).

En *W. auropunctata*, se ha descubierto la existencia de un polimorfismo en el sistema de reproducción. Existen poblaciones haplodiploides clásicas (las hembras son producto de la reproducción sexual y los machos surgen a través de partenogénesis arrenotóquica), denominadas de aquí en más “**poblaciones sexuales**”, y también existen poblaciones con un sistema de reproducción único y novedoso, en el que tanto reinas como machos se reproducen clonalmente (Fournier et al., 2005a), denominadas de aquí en más “**poblaciones clonales**”. En este sistema, las reinas diploides se reproducen a través de partenogénesis telitóquica originando nuevas reinas genéticamente idénticas a la progenitora, mientras que los machos se reproducen a través de androgénesis (producción de descendencia con exactamente el mismo genoma paterno a través de huevos maternos), originando así machos idénticos a su progenitor (Figura 3.1). Por su parte, la casta obrera se produce a través de reproducción sexual entre machos y hembras, como ocurre normalmente en las especies haplodiploides (Fournier et., al 2005a). Es importante tener en cuenta que aunque este sea un sistema de reproducción clonal, no se trata de una clonalidad donde las hembras se reproduzcan partenogénicamente, sin necesidad de la fecundación por un macho, como ocurre en muchas especies de peces, reptiles, anfibios, nematodos y artrópodos (Simon et al., 2003); tampoco se trata de un sistema en el que obreras generen obreras clonalmente como ocurre en otras especies de hormigas como *Cerapachys biroi* (Tsuji & Yamauchi, 1995) o *Platythyrea punctata* (Heinze & Hölldobler, 1995). En *W. auropunctata* es necesario que la reina sea inseminada por un macho para originar una nueva colonia ya que las obreras son producto de reproducción sexual y los machos, si bien son genéticamente idénticos al padre, surgen a través de huevos colocados por la reina, luego de la fertilización.

La peculiaridad del extraordinario sistema reproductivo de *W. auropunctata* radica principalmente en que el genotipo de los machos no tiene ninguna relación con el genotipo de la reina a la que inseminó y coloca los huevos, sino que, a través de la reina, el macho produce nuevos machos genéticamente idénticos a sí mismo. En un sistema haplodiploide normal, en cambio, el genotipo del macho siempre posee alelos de la hembra, mientras que en el sistema clonal de *W. auropunctata*, el genotipo del macho no posee ningún alelo de la hembra sino que son todos iguales a los alelos del macho progenitor.

Originalmente se propusieron dos hipótesis para explicar el mecanismo de clonalidad de los machos: 1) la eliminación en huevos fertilizados del genotipo materno y su reemplazo por el

paterno, 2) fertilización de huevos anucleados (Foucaud et al., 2007). Sin embargo ninguno de estos mecanismos fue aún corroborado.

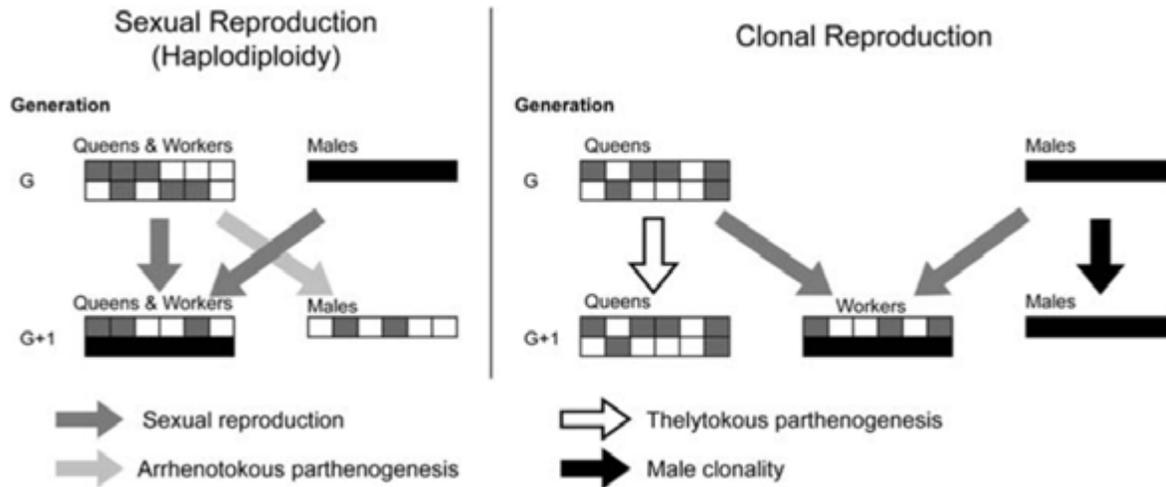


Figura 3.1. Esquema que ilustra los dos tipos de sistema reproductivos encontrados en *W. auropunctata*, extraído de Foucaud et al. (2010b). Los genotipos de las hembras (diploides, ya sea reinas u obreras) se representan con 2 barras, dentro de las cuales cada loci se representa como pequeños cuadrados cuyo color representa un alelo (gris alelo 1, blanco alelo 2). El genotipo del macho (haploide) se representa con una barra negra. A la izquierda, el sistema haplodiploide clásico (reproducción sexual), presente en la mayoría de las especies de hormigas, donde las hembras (reinas y obreras) se producen por el cruzamiento entre un macho y una hembra reproductora, y los machos se producen por partenogénesis arrenotóxica. A la derecha, el sistema de reproducción clonal, donde las reinas (hembras reproductoras) se producen a través de partenogénesis telitóquica, los machos a través de androgénesis y las obreras a través del cruzamiento entre el macho y la reina.

En cuanto al mecanismo de clonalidad en las reinas de *W. auropunctata*, existe evidencia que sugiere que la partenogénesis telitóquica es automítica (implica meiosis) con fusión central (Rey et al., 2011). Sin embargo, a diferencia de otras especies con este mismo sistema de reproducción (ej. la hormiga partenogénica *Cataglyphis cursor*; Percy et al., 2004), *W. auropunctata* posee muy baja tasa de recombinación durante la meiosis, lo cual sería el único mecanismo que permitiría el mantenimiento de los linajes clonales en el tiempo sin la usual pérdida de heterocigosis asociada a la partenogénesis telitóquica automítica (Rey et al., 2011). Dicha disminución en la recombinación podría ser el resultado de un menor apareamiento de los cromosomas. El apareamiento cromosómico, o sinapsis, es un proceso de gran importancia para la

correcta segregación de los cromosomas durante la meiosis (Bascom-Slack et al., 1997). Por lo tanto, una reducción del mismo puede resultar en fallas en la segregación cromosómica y la consecuente producción de huevos aneuploides (Bascom-Slack et al., 1997). Estos serían más propicios a producir huevos anucleados que al ser fertilizados por el genoma paterno, producirían machos por androgénesis (Rey et al., 2013a).

Respecto al origen de la clonalidad en *W. auropunctata*, se propuso que la partenogénesis en las hembras está determinada genéticamente (Foucaud et al., 2010b) y que surgiría por mutación (origen espontáneo de la partenogénesis, Simon et al., 2003) (Foucaud et al., 2007). Se descartó la inducción por bacterias endosimbiontes como *Wolbachia* (Rey et al., 2013b). Aún se desconoce el origen de la clonalidad en los machos. Este mecanismo fue descubierto originalmente en una región geográfica restringida en Guyana Francesa, donde, al analizar 11 marcadores microsatélites, se vio una pronunciada diferenciación genética entre las reinas y los machos: los distintos sexos se agrupaban en linajes separados en un árbol de Neighbor-joining, y poseían acervos génicos con distintas frecuencias alélicas y ausencia de flujo génico.

El *fitness* (ventaja adaptativa) de los machos de especies haplodiploides se adquiere normalmente a través del genoma diploide de las hembras. Sin embargo, en el sistema de reproducción clonal de *W. auropunctata*, si bien las hembras obtendrían una ventaja adaptativa directa, este mismo mecanismo reduciría completamente el *fitness* de los machos, ya que sus genes nunca pasarían a la siguiente generación de hembras clonales. Es por ello que originalmente se postuló que la clonalidad en los machos podría haber surgido como respuesta a la clonalidad de las hembras, como un mecanismo de los machos que les permita mantener su *fitness*, a través de una suerte de “batalla de sexos” (Fournier et al., 2005a). Paralelamente, la androgénesis, un sistema de reproducción extremadamente raro en la naturaleza, es considerada generalmente un rasgo de vida propio de los machos, el cual les daría una ventaja adaptativa superior a la de sus parientes sexuales (McKone & Halpern, 2003). Sin embargo, más tarde la hipótesis de androgénesis controlada por los machos fue refutada gracias a experimentos conducidos por Rey et al. (2013a), al realizar cruzamientos cruzados controlados entre hembras y machos de poblaciones con distinto sistema de reproducción. Como resultado de estos experimentos se mostró que machos clonales no pueden generar nuevos machos clonales si se cruzan con una hembra sexual; por el contrario, una hembra clonal, sí es capaz de producir machos clonales, aunque se aparee con un macho sexual. Este

resultado, junto con evidencias que muestran que en la naturaleza cruzamientos entre hembras clonales y machos sexuales de poblaciones vecinas (en Guyana Francesa) también generan machos clonales, indica que la androgénesis es un mecanismo controlado exclusivamente por las hembras (Rey et al., 2013a). Por otro lado, los cruzamientos que involucraron hembras clonales (ya sea con machos sexuales o clonales), produjeron ginandromorfos y mosaicos poliploides. Esta situación no se vio en ningún cruzamiento con hembras sexuales, lo cual es coherente con las irregularidades en el proceso de segregación cromosómica que pueden surgir como consecuencia de la disminución en el apareamiento de los cromosomas asociado a la menor tasa de recombinación durante la meiosis en poblaciones clonales. Se plantea entonces que el ginandromorfismo podría ser en esta especie un costo de la reproducción clonal, aunque aún es solo una hipótesis (Rey et al., 2013a).

En el rango nativo de *W. auropunctata*, se vio que existen tanto poblaciones sexuales como clonales, cada una asociada a un tipo de hábitat determinado. Según Foucaud et al. (2009), las poblaciones sexuales se encuentran principalmente en sitios naturales, con poca o nula perturbación humana, como bosques primarios, y poseen características ecológicas no dominantes (baja densidad de obreras, reinas y nidos); las poblaciones clonales, en cambio, se encuentran en ambientes perturbados, principalmente ambientes antrópicos, y son poblaciones ecológicamente dominantes (alta densidad de obreras, reinas y nidos) (Figura 3.2). Esto sugiere que las poblaciones sexuales y clonales de *W. auropunctata* poseerían diferentes nichos ecológicos y que la actividad humana generaría condiciones no aptas para el establecimiento de poblaciones sexuales, pero sí propicias para poblaciones clonales. Estas últimas, a su vez, tienen las mismas características que las poblaciones invasoras de esta especie. Sin embargo estas conclusiones se obtuvieron a partir de estudiar una porción muy pequeña del área de distribución total de la especie, únicamente poblaciones del este de Brasil (Bahía) y de Guyana Francesa (Foucaud et al., 2009). Resulta interesante entonces analizar si en el límite sur de distribución de *W. auropunctata* existe el mismo patrón de polimorfismo en el sistema de reproducción.

Foucaud et al. (2007) demostraron que las poblaciones clonales de *W. auropunctata* emergieron de manera recurrente a lo largo de la evolución de la especie en su rango nativo a partir de poblaciones sexuales y que ambos tipos de poblaciones no forman unidades evolutivas independientes. También observaron que la clonalidad en los machos siempre está asociada a la clonalidad en las hembras, es decir, siempre que un nido posee hembras clonales, posee también

machos clonales, y viceversa para los nidos sexuales. Esto es consistente con el origen de la androgénesis en los machos como subproducto del surgimiento de la partenogénesis en las hembras (Rey et al., 2013a).

Por otro lado, las poblaciones introducidas (ej. Nueva Caledonia e Israel) solo presentaron un sistema de reproducción clonal (Foucaud et al., 2006; Vonshak et al., 2009), con un único genotipo de hembra y de macho en cada región, lo cual revela que las invasiones ocurrieron a partir de una sola introducción o propágulo clonal. Que las poblaciones introducidas sean clonales no implica que los individuos clonales de la casta reproductora nunca se reproducirán sexualmente: existe evidencia de eventos de reproducción sexual que originan nuevos linajes clonales de reinas en el rango introducido (en Nueva Caledonia, Foucaud et al., 2006; y en Gabón, Mikheyev et al., 2009). Por el contrario, no se encontraron nuevos linajes clonales de machos (todos los machos de cada población introducida son genéticamente idénticos).



Figura 3.2. Típico nido clonal de *Wasmannia auropunctata*, con una gran cantidad de reinas, huevos y obreras. También se observan sexuales (alados). Foto extraída de Rey (2011). Gyne: hembra reproductora (o alada, futura reina), Mâle: macho, Reine: reina, Ouvrière: obrera.

Existen importantes consecuencias evolutivas asociadas al sistema de reproducción clonal de *W. auropunctata*; por un lado, la combinación de partenogénesis telitóquica de las hembras con la androgénesis de los machos, y la reproducción sexual que origina la casta obrera, permite que exista reproducción sexual entre machos y hembras sin que haya depresión por endogamia, lo cual es esencial para el éxito de una invasión (Foucaud et al., 2007; Rey et al., 2013a); por otro lado, permite mantener altos niveles de heterocigosis y combinaciones alélicas en la casta obrera que pueden resultar ventajosas (Foucaud et al., 2010a y 2010b). La capacidad de las hembras clonales de adquirir nuevos genotipos de machos por introgresión permite la generación de variabilidad genética en la casta obrera mientras la casta de la reina mantiene su genoma intacto en el tiempo, lo cual puede ser sumamente ventajoso en ambientes poco estables. Debido a que la selección natural actúa sobre las obreras más que sobre la reina (porque son las que están más expuestas al ambiente al salir a forrajear), la adquisición de un nuevo genoma paterno permite generar variabilidad genética en la descendencia obrera, adquiriendo combinaciones alélicas más beneficiosas para un ambiente dado, y manteniendo la integridad del genotipo de la reina (Rey et al., 2013a).

El objetivo del presente capítulo es evaluar, por medio de marcadores microsatélites, el sistema de reproducción de las poblaciones del límite sur de distribución nativa de *W. auropunctata*. Dadas las características ecológicas de la mayoría de las poblaciones relevadas en los muestreos (ver capítulo 2), las cuales fueron principalmente dominantes y se encontraron en sitios antrópicos, se espera que el sistema de reproducción que prevalezca en esta región sea el clonal. Por el contrario, se espera que las pocas poblaciones encontradas en lugares naturales, como bosques primarios y algunos bosques secundarios con baja perturbación humana, las cuales fueron poblaciones ecológicamente no dominantes, sean sexuales. También se analizó la diversidad clonal en esta región y se estudió si los linajes clonales y sexuales forman unidades evolutivas diferentes como observado por Foucaud et al. (2007) en el norte de Sudamérica. Por último, se analizó si las poblaciones donde se encontraron ginandromorfos son clonales, lo cual apoyaría la hipótesis de que el ginandromorfismo constituye un costo de la reproducción clonal.

Materiales y Métodos

Sitios de estudio

Se analizó el sistema reproductivo de las poblaciones de *W. auropunctata* que presentaron individuos reproductores, ya sea reinas, hembras aladas (hembras reproductoras aún no fecundadas, es decir, futuras reinas) o machos. En total se analizaron 194 individuos provenientes de 37 sitios: 29 en Argentina, 6 en Brasil, 1 en Paraguay y 1 en Bolivia (Tabla 3.1). En cada uno de estos sitios (salvo uno) los nidos de *W. auropunctata* se encontraron agregados formando *clusters*. En algunos sitios se estudió el genotipo de hembras de más de un *cluster*.

Amplificación de microsatélites

El genotipado de diferentes individuos de una misma especie con múltiples marcadores independientes y altamente polimórficos permite asignarlos a distintos genotipos multilocus (GML) (Arnaud-Haond et al., 2007). Los marcadores microsatélites constituyen una herramienta útil para estudios de estructuración poblacional y clonalidad, ya que poseen una alta tasa de evolución para realizar estudios intraespecíficos y una alta resolución para identificar clones (Chistiakov et al. 2006; Halkett et al. 2005, Arnaud-Haond et al., 2007).

Se amplificaron 12 marcadores microsatélites diseñados para *W. auropunctata* (Fournier et al., 2005b) por medio de PCR *multiplex*. Este procedimiento consiste en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite amplificar varios fragmentos de ADN de forma simultánea. Para esto, el diseño de los cebadores (*primers*) tiene que ser optimizado para que todos ellos puedan trabajar a la misma temperatura de hibridación (*annealing*). Los *primers* empleados en una misma reacción de PCR se marcan con fluorocromos de distinta longitud de onda (FAM, NED y HEX). En la tabla S.3.1 se detalla la secuencia de cada *primer* utilizado. Los 12 loci microsatélites fueron amplificados por medio de dos reacciones de PCR independientes, con distinta temperatura de *annealing*, utilizando el kit Qiagen para PCR multiplex como en Fournier et al. (2005b). Cada reacción de PCR tuvo un volumen final de 10µl, consistiendo en 8 µl de PCR mix y 2 µl de ADN. La mezcla de PCR (*PCR mix*) para ambas reacciones se preparó de la misma manera: para una placa (96 individuos): 500 µl de Taq multiplex (5 µl/ind.) + 300 µl de mezcla de *primers* (*primer mix*) (3 µl/ind.). La *primer mix* fue preparada de la siguiente manera: PCR1: 2 µl de cada *primer* (2

$\mu\text{l} \times 2 \text{ primers} \times 7 \text{ loci} = 28 \mu\text{l} \text{ primers} + 272 \mu\text{l} \text{ H}_2\text{O}$). PCR2: $2\mu\text{l}$ de cada *primer* ($2 \mu\text{l} \times 2 \text{ primers} \times 5 \text{ loci} = 20 \mu\text{l} \text{ primers} + 280 \mu\text{l} \text{ H}_2\text{O}$). La PCR 1 consistió en un ciclo de 15 minutos a 95°C seguido por 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto con 30 segundos a 57°C y 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 60° por 30 minutos. La PCR 2 consistió en un ciclo de 15 minutos a 95°C seguido por 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto con 30 segundos a 63°C y 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 60° por 30 minutos. Los fragmentos fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación y Genotificado de la FCEN-UBA utilizando un secuenciador automático 3130-XL (Applied Biosystems) y analizados por medio del programa GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems). Para cada individuo se registró el tamaño de los alelos correspondientes a cada loci obteniendo así su genotipo multilocus.

Una parte de los genotipos (115 individuos) se obtuvieron en la FCEN-UBA: 112 hembras (reinas o hembras aladas) y 3 machos; donde se logró amplificar con éxito 10 de los 12 loci microsatélites (Tabla S.3.2). Otra parte de los genotipos (79 individuos) fueron obtenidos por Olivier Rey en el CBGP (Montpellier, Francia) a partir de individuos provenientes de nuestros muestreos: 73 hembras reproductoras y 6 machos (Tabla S.3.3).

Tabla 3.1. Número de *clusters* y de nidos dentro en cada *cluster* analizados por localidad. Para cada localidad se muestra el número de hembras (reinas o hembras aladas) y machos genotipados, el grado de perturbación del hábitat y la dominancia ecológica de las poblaciones (D: dominante, ND: no dominante). NA: nidos no agrupados en un *cluster* definido. *: poblaciones genotipadas en la FCEN.

| Localidad | Código | No. <i>clusters</i> | No. nidos | No. hembras | No. machos | Nivel de perturbación | Dominancia ecológica |
|---------------------|--------|---------------------|-----------|-------------|------------|-----------------------|----------------------|
| CABA* | BUE | 1 | 5 | 7 | | alto | D |
| Hurlingham | HUR | 1 | 3 | 4 | | alto | D |
| Lozano* | LOZ | 1 | 1 | 5 | | alto | D |
| Colón* | COL | 1 | 3 | 10 | | alto | D |
| Zárate | ZAR | 1 | 3 | 6 | | alto | D |
| Camping Las Tejas* | TEJ | 4 | 12 | 21 | | alto | D |
| San Pedro* | PED | 1 | 3 | 5 | | medio | D |
| San Nicolás | NIC | 1 | 2 | 4 | | medio | ND |
| Rosario | ROS | 2 | 3 | 4 | | alto | D |
| Puerto Ocampo* | PUE | 1 | 3 | 10 | | medio | D |
| Paraná* | PAR | 1 | 5 | 5 | | alto | D |
| Reconquista* | REC | 1 | 2 | 4 | | alto | D |
| Gob. Crespo* | GOB | 2 | 3 | 4 | | alto | D |
| San Javier* | JAV | NA | 5 | 6 | | alto | D |
| Isla del Cerrito | CER | 1 | 2 | 3 | | medio | ND |
| Camping Machuca | MAC | 1 | 2 | | 6 | medio | ND |
| El Socorro (Iberá)* | SOC | 2 | 3 | 8 | | medio | D |
| Alba Posse* | ALB | 1 | 1 | 4 | | bajo | D |
| El Soberbio* | SOB | 1 | 1 | 4 | | alto | ND |
| Yabotí* | YAB | 1 | 1 | 3 | | bajo | ND |
| Posadas* | POS | 1 | 1 | 1 | | alto | D |
| Encarnación* | ENC | 1 | 1 | 2 | | alto | D |
| Loreto-San Martín* | LOR | 1 | 3 | 10 | | medio | D |
| Yuto | YUT | 1 | 7 | 7 | | alto | D |
| Ocloyas | OCL | 1 | 5 | 5 | | alto | D |
| Tumbaya | TUM | 1 | 4 | 4 | | alto | D |
| La Población* | POB | 1 | 2 | 2 | | alto | D |
| Tolombón* | TOL | 1 | 1 | 2 | | alto | D |
| Tucumán* | TUC | 1 | 2 | 4 | | alto | D |
| Cuevas* | CUE | 1 | 2 | 3 | | alto | D |
| Anillaco* | ANI | 1 | 1 | 6 | | alto | D |
| Dourados* | DOU | 1 | 1 | 4 | | alto | D |
| Puerto Alegre* | ALE | 2 | 3 | 7 | | alto | D |
| Torres* | TOR | 1 | 2 | 4 | | alto | D |
| Paranagua* | PAG | 1 | 1 | 2 | | alto | D |
| Sao Sebastiao* | SEB | 1 | 3 | 3 | 3 | alto | D |
| Paraty* | PTY | 1 | 2 | 2 | | alto | D |
| | | 42 | 101 | 185 | 9 | | |

Análisis de datos

Debido a que los genotipos obtenidos en la FCEN difirieron levemente de los obtenidos en el CBGP, no fue posible unir ambos grupos de datos, por lo que se trataron por separado.

Utilizando el programa GenClone v.2.0 (Arnaud-Haond & Belkhir, 2007) se identificó la cantidad de genotipos multilocus presentes en las muestras y se agruparon los distintos individuos con exactamente el mismo genotipo (idénticos en exactamente todos los loci). Las poblaciones fueron definidas como clonales cuando los genotipos de distintas hembras o machos resultaron idénticos para todos los marcadores microsatélites (Fournier et al., 2005b). Para analizar la significancia de la asignación de una población como clonal, con el mismo programa se evaluó la probabilidad de que los individuos con igual genotipo pertenezcan a distintos cigotos, es decir provengan de un evento de reproducción sexual, calculando el p_{sex} (Arnaud-Haond, et al., 2007). Lo esperado bajo reproducción clonal es que esta probabilidad sea baja. A través del mismo programa se identificaron individuos pertenecientes al mismo linaje clonal, aunque no posean genotipos idénticos, ya que pequeñas diferencias entre genotipos pueden deberse a mutaciones, eventos de recombinación durante la partenogénesis o incluso a errores de genotipado, y no a reproducción sexual (Arnaud-Haond, et al., 2007). Es importante tener esto en cuenta para no sobreestimar la verdadera diversidad clonal de una población o una especie (Arnaud-Haond et al., 2007; Rozenfeld et al., 2007). Para ello se construyó una matriz de distancias alélicas entre todos los pares de genotipos de la muestra y luego se construyó un histograma de frecuencias que represente estos valores. Lo esperado bajo un sistema de reproducción mixto es una curva de frecuencias bimodal, con un pequeño pico correspondiente a individuos con pocas diferencias alélicas que corresponde al mismo linaje clonal (asociados a un único evento de reproducción sexual) y un pico mayor correspondiente a individuos diferenciados por muchos alelos los cuales pertenecen a linajes distintos (cada uno asociado a un evento de reproducción sexual) (Arnaud-Haond, et al., 2007). Utilizando las muestras amplificadas preliminarmente por Olivier Rey como referencia, las cuales corresponden a la región del Delta del Paraná (Buenos Aires, Zárate, Camping Las Tejas, San Pedro, San Nicolás y Rosario), se estableció que el número de alelos de diferencia máximo para considerar dos individuos como pertenecientes al mismo clon es de tres (Figura 3.3). De esta manera, individuos con 4 o más alelos de diferencia fueron considerados como resultantes de eventos de sexualidad.

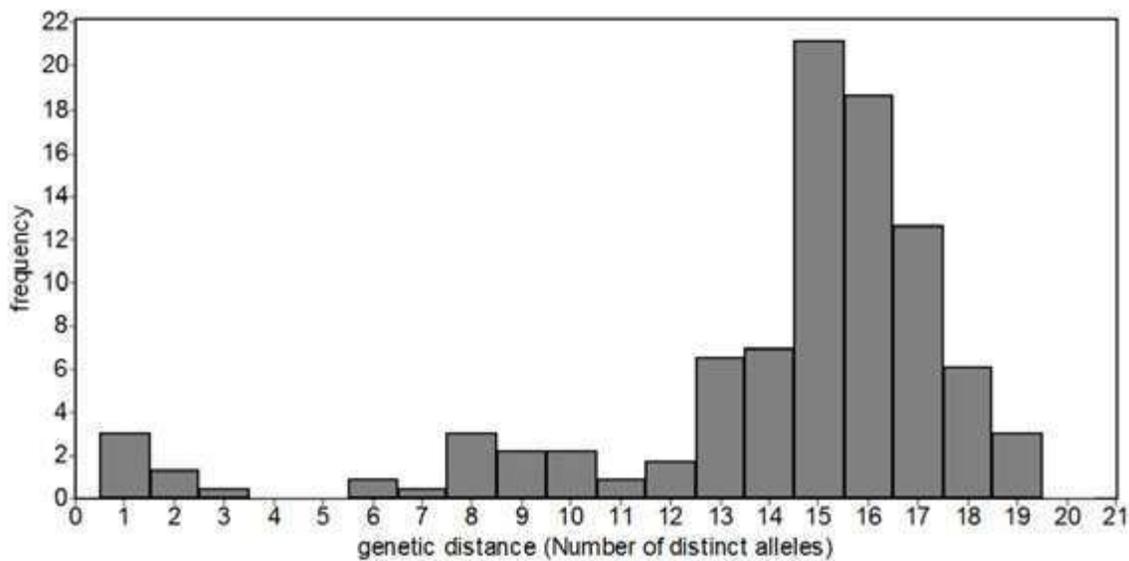


Figura 3.3. Distribución de las distancias alélicas apareadas entre genotipos multilocus de *Wasmannia auropunctata* provenientes de individuos de las poblaciones del Delta del Paraná genotipados preliminarmente por Olivier Rey. Se tomó este grupo de poblaciones como referencia para determinar el número máximo de diferencias alélicas para el cual dos individuos se consideran clones.

Las relaciones genéticas entre las distintas poblaciones se estudiaron mediante un árbol de Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), construido a partir de la distancia genética entre individuos, utilizando el programa MEGA v.6 (Tamura et al., 2013).

Tanto la identificación del número de linajes clonales como la construcción del dendrograma de Neighbor-joinig se realizaron a partir de los 112 genotipos de hembras reproductoras obtenidos en la FCEN (detallados en la tabla S.3.2). Unir ambos grupos de datos hubiera sobreestimado la diversidad clonal (el número de linajes clonales) y hubiese resultado en una reconstrucción de relaciones genealógicas falsas. No obstante, para definir el status -clonal o sexual- de las poblaciones de la región sí se tuvo en cuenta el conjunto de datos obtenido en el CBGP (Tabla S.3.3).

Se analizó si existe una asociación entre el sistema reproductivo y el nivel de perturbación del hábitat y la dominancia ecológica de las poblaciones, a través de una prueba de independencia utilizando el programa Past v.1.17 (Hammer & Harper, 2001). Debido al pequeño

número de poblaciones por categoría, la significancia de las pruebas se evaluó a través de permutaciones de Monte Carlo. Por otro lado, para cada grado de perturbación del ambiente y de dominancia ecológica se analizó si existen diferencias entre el número de sitios con cada tipo de sistema reproductivo y el esperado por azar mediante pruebas de bondad de ajuste, que analizan si las proporciones se ajustan a una distribución teórica de 1:1:1.

Resultados

Los 10 loci microsatélites resultaron polimórficos, presentando entre 9 y 28 alelos cada uno (Tabla 3.2). El rango de tamaño de cada loci fue mayor respecto a las poblaciones analizadas por Fournier et al. (2005b), quienes diseñaron los primers en base a poblaciones del norte de Sudamérica. En la tabla 3.2 se observa que estos loci son muy adecuados para realizar los estudios planteados y específicamente para discriminar entre poblaciones clonales y sexuales, ya que presentan un número elevado de alelos, y con niveles de heterocigosis observada similares a los obtenidos por Fournier et al. (2005b). Asimismo, los valores de heterocigosis observada fueron en general más bajos que lo esperado, lo que sugiere desvíos de la panmixia, como se verá más adelante.

Tabla 3.2. Diversidad genética de los loci analizados. En la primer columna se indica el rango en el tamaño de cada locus encontrado en este estudio, luego el número de alelos totales por locus, la heterocigosis observada y la esperada (Hnb), que tiene en cuenta la presencia de individuos cercanamente relacionados entre sí.

| | Rango de tamaño (pb) | No. total de alelos | Hobs | Hnb |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------|-------------|------------|
| <i>Wa-418</i> | 90-150 | 15 | 0,31 | 0,85 |
| <i>Wa-3176</i> | 210-250 | 18 | 0,17 | 0,93 |
| <i>Wa-IgamF</i> | 270-326 | 28 | 0,77 | 0,95 |
| <i>Wa-716</i> | 168-210 | 22 | 0,51 | 0,89 |
| <i>Wa-2164</i> | 270-330 | 23 | 0,55 | 0,93 |
| <i>Wa-566</i> | 235-280 | 20 | 0,50 | 0,91 |
| <i>Wa-1166</i> | 80-120 | 15 | 0,55 | 0,89 |
| <i>Wa-680</i> | 140-191 | 16 | 0,26 | 0,90 |
| <i>Wa-521</i> | 192-220 | 16 | 0,61 | 0,86 |
| <i>Wa-225</i> | 210-240 | 9 | 0,59 | 0,77 |

Analizando en conjunto los grupos de datos obtenidos en la FCEN y el CBGP, el 72 % de las poblaciones presentó un sistema de reproducción totalmente clonal (hembras de un mismo nido con exactamente el mismo genotipo para los 10 ó 12 loci analizados e idénticas a hembras de nidos vecinos). Este tipo de poblaciones se encontró mayormente asociado a hábitats con alta perturbación humana, como ciudades, banquinas de caminos y plantaciones (Tabla 3.3 y Figura 3.4). Los 3 machos de la población con hembras clonales de San Sebastián, en Brasil, también fueron idénticos para los 10 loci, infiriendo que esos machos se reproducen por androgénesis.

Tabla 3.3. Número de poblaciones con cada tipo de sistema reproductivo en cada tipo de ambiente. Esta es la tabla de contingencia utilizada para el posterior análisis de independencia. Se analizó un total de 36 poblaciones ya que en una de ellas solo se logró genotipificar una reina (en Posadas, Misiones).

| | | Nivel de perturbación | | | Total |
|-------------------------|--------|-----------------------|-------|------|-------|
| | | Bajo | Medio | Alto | |
| Sistema de reproducción | Sexual | 2 | 1 | 1 | 4 |
| | Mixto | 0 | 3 | 3 | 6 |
| | Clonal | 0 | 4 | 22 | 26 |
| Total | | 2 | 8 | 26 | 36 |

En el 17% de las poblaciones, las reinas de un mismo nido fueron idénticas entre sí para los 10 ó 12 loci analizados, pero distintas a las reinas de nidos vecinos. Estas hembras se reproducen por partenogénesis (son clonales), pero presentan más de un linaje clonal. Se las clasificó como de “**sistema de reproducción mixto**”, para diferenciarlas de las que son exclusivamente clonales. Las mismas fueron encontradas en sitios con un nivel de perturbación media y alta, ya sea perturbación antrópica (Ciudad de Tucumán, La Población y San Javier) o natural como la planicie de inundación del Río Paraná (Isla del Cerrito y Puerto Ocampo), o los Esteros del Iberá (Ea. El Socorro).

Solo se encontraron 4 poblaciones puramente sexuales (11%), todas restringidas en el noreste argentino. Dos de estas poblaciones se encontraron en sitios con baja perturbación humana en el este de Misiones (Yabotí y Alba Posse), una en un sitio medianamente perturbado (en un bosque secundario en la planicie de inundación del Río Paraná (Camping Machuca, en el norte de Corrientes), el cual es un sitio perturbado naturalmente; el sistema reproductivo de esta población

fue inferido a partir de 6 machos provenientes de dos nidos, todos los cuales presentaron distintos genotipos multilocus. Por último, una población sexual fue encontrada en un sitio considerado de alta perturbación humana, ya que se trataba del jardín de una casa en El Soberbio, en el este de Misiones (Figura 3.4). La tabla 3.4 ilustra los genotipos multilocus de una población clonal (Paraná), una sexual (Yabotí) y una mixta (San Javier).

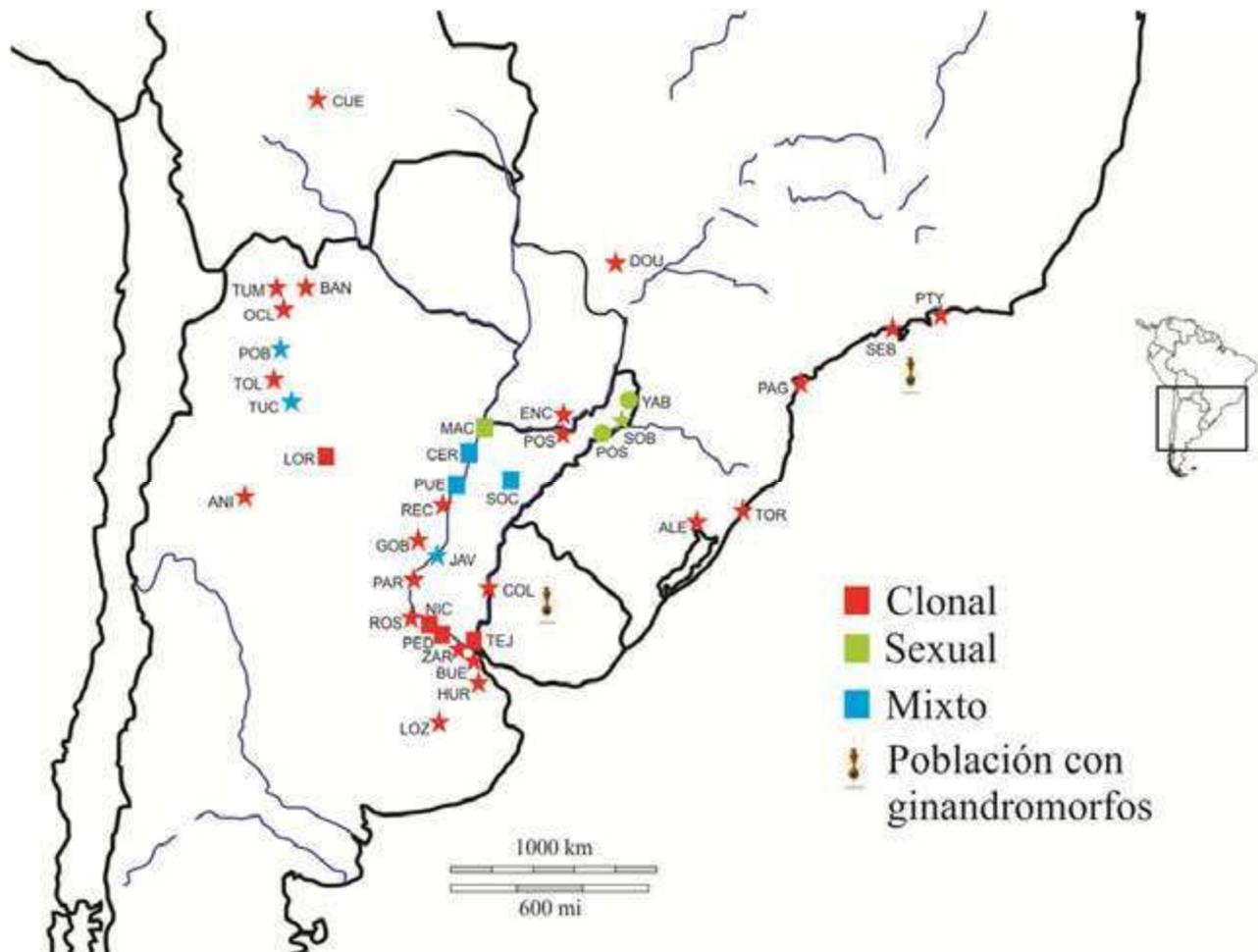


Figura 3.4. Sistema reproductivo de *Wasmannia auropunctata* en los 37 sitios estudiados. Los círculos, cuadrados y estrellas representan sitios con nivel de perturbación bajo, medio y alto respectivamente. El color de cada símbolo representa el tipo de sistema reproductivo de la población. La imagen de un ginandromorfo representa poblaciones donde se encontró este tipo de aberración). El nombre de cada localidad se indica con sus tres primeras letras (de acuerdo a la tabla 3.1).

Existió una asociación entre el tipo de sistema reproductivo y el nivel de perturbación del ambiente ($\chi^2 = 20,84$; $P < 0,001$; Tabla 3.3 y Figura 3.5a). En los dos sitios naturales (con nivel de perturbación bajo) analizados, las poblaciones fueron sexuales; los sitios medianamente perturbados no presentaron diferencias significativas entre los distintos tipos de sistema de reproducción ($\chi^2 = 1,75$; $P_{\text{(monte carlo)}} = 0,4$), y en sitios altamente perturbados la mayoría de las poblaciones fue clonal ($\chi^2 = 31,02$; $gl = 2$; $P < 0,001$).

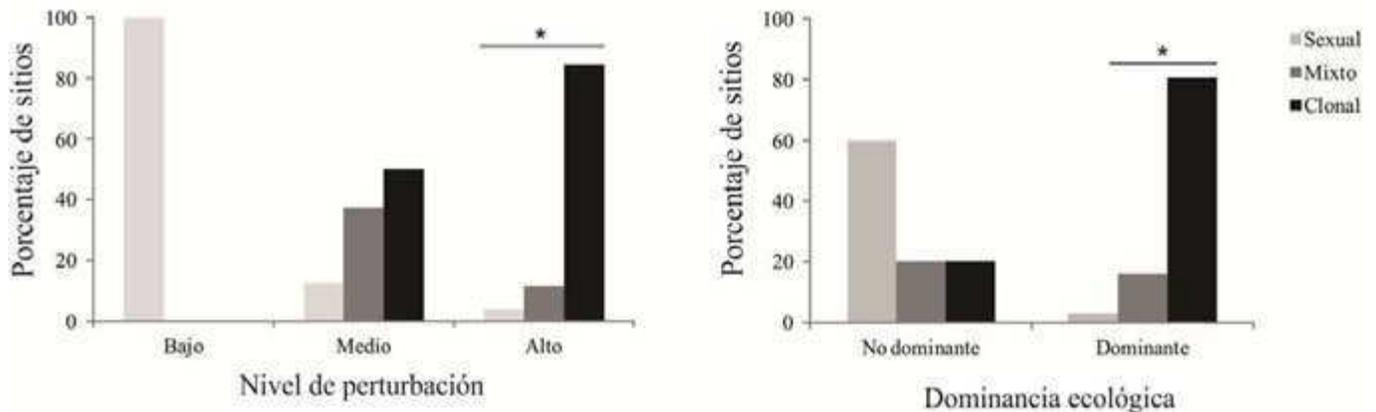


Figura 3.5. Porcentaje de sitios con cada tipo de sistema reproductivo a) en ambientes con distinto nivel de perturbación y b) en poblaciones con distinta dominancia ecológica de *Wasmannia auropunctata*.

También existió una asociación significativa entre la dominancia ecológica de las poblaciones y el tipo de sistema de reproducción ($\chi^2 = 14,72$; $P < 0,01$; Tabla 3.4 y Figura 3.5b). Las poblaciones no dominantes presentaron un sistema de reproducción mayormente sexual (3 de 5), aunque no se pudo hacer la prueba estadística debido al bajo tamaño muestral. Las poblaciones dominantes fueron mayormente clonales ($\chi^2 = 32,01$; $gl = 2$; $P < 0,001$). Aunque no existieron diferencias significativas ($\chi^2 = 2,67$; $gl = 1$; $P = 0,26$), 5 de las 6 poblaciones que presentaron un sistema de reproducción mixto fueron dominantes.

Tabla 3.4. Tabla de contingencia utilizada para el análisis de independencia para estudiar la asociación entre la dominancia ecológica y el sistema reproductivo de *Wasmannia auropunctata*.

| | | Sistema de Reproducción | | | Total |
|-------------|---------------|-------------------------|-------|--------|-------|
| | | Sexual | Mixto | Clonal | |
| Poblaciones | No dominantes | 3 | 1 | 1 | 5 |
| | Dominantes | 1 | 5 | 25 | 31 |
| Total | | 4 | 6 | 26 | 36 |

Tabla 3.4. Ejemplo ilustrativo de genotipos multilocus de los 10 loci microsatélites analizados, en una población clonal (Loreto), una mixta (San Javier) y una sexual (Yabotí). En cada localidad se muestra el nido (N) y las hembras reproductoras (reinas (Q de Queens) o hembras no fecundadas (G de Gynes). Los alelos de cada locus están coloreados diferencialmente para una mejor visualización de los genotipos.

| Localidad (sist. de rep.) | Hembra (Q/G) | Locus | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------|---------------|-----|----------------|-----|----------------|-----|---------------|-----|----------------|-----|---------------|-----|----------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|
| | | <i>Wa-418</i> | | <i>Wa-3176</i> | | <i>Wa-1gam</i> | | <i>Wa-716</i> | | <i>Wa-2164</i> | | <i>Wa-566</i> | | <i>Wa-1166</i> | | <i>Wa-680</i> | | <i>Wa-521</i> | | <i>Wa-225</i> | |
| Loreto (clonal) | N1-Q1 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | N1-Q2 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | N2-Q1 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | N2-Q2 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | N2-Q3 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | N2-Q4 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | N3-Q1 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | N3-Q2 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | N3-Q3 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | N3-Q4 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| San Javier (mixto) | N1-Q1 | 102 | 102 | 238 | 238 | 282 | 282 | 186 | 186 | 291 | 291 | 263 | 263 | 92 | 98 | 148 | 148 | 201 | 201 | 220 | 222 |
| | N1-Q2 | 102 | 102 | 238 | 238 | 282 | 282 | 186 | 188 | 278 | 282 | | | 92 | 98 | 148 | 148 | 201 | 201 | 220 | 222 |
| | N2-Q1 | 102 | 102 | 237 | 237 | 282 | 282 | 186 | 188 | 294 | 308 | 254 | 254 | 92 | 98 | 148 | 148 | 201 | 201 | 220 | 220 |
| | N3-Q1 | 109 | 109 | 217 | 217 | 285 | 294 | 186 | 190 | 306 | 306 | 265 | 265 | 86 | 94 | 144 | 144 | 201 | 205 | 222 | 222 |
| | N4-G1 | 109 | 109 | 217 | 217 | 285 | 295 | 186 | 190 | 306 | 306 | 265 | 265 | 86 | 92 | 144 | 148 | 201 | 205 | 222 | 222 |
| | N5-Q1 | 109 | 109 | 217 | 217 | 285 | 294 | 186 | 190 | 306 | 306 | | | 86 | 86 | 144 | 144 | 201 | 205 | 222 | 222 |
| Yabotí (sexual) | N1-G1 | 96 | 128 | 235 | 237 | 286 | 318 | 173 | 191 | 282 | 284 | 255 | 257 | 94 | 94 | 150 | 166 | 213 | 223 | 220 | 226 |
| | N1-G2 | 96 | 99 | 235 | 237 | 286 | 286 | 183 | 210 | 278 | 282 | 255 | 255 | 94 | 96 | 166 | 172 | 205 | 223 | 220 | 226 |
| | N1-G3 | 96 | 128 | 235 | 237 | 286 | 318 | 173 | 191 | 278 | 282 | 257 | 257 | 94 | 94 | 150 | 172 | 213 | 219 | 220 | 226 |

A partir de las 112 hembras analizadas, se encontraron 59 genotipos multilocus distribuidos en 40 linajes (Tabla S.3.4). La mayoría de los linajes clonales no se extendió más allá de una localidad (Tabla S.3.4). Solo hubo dos linajes clonales que presentaron una distribución extendida a lo largo de diferentes localidades. Un linaje se distribuyó a lo largo de 83 km en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Hurlingham y Zárate (linaje 28), y otro linaje se distribuyó a lo largo de 210 km desde el Camping las Tejas, en Zárate, hasta Rosario. También se identificó un mismo linaje clonal en Tolombón y La Población (Salta) (linaje 31), y otros dos en la Mata Atlántica Brasileira: uno en Puerto Alegre y Torres (linaje 37) y otro en San Sebastián y Paraty (linaje 38).

El dendrograma construido con el algoritmo de Neighbor-joining mostró que no existe una agrupación genética asociada a la distancia geográfica, ya que en muchos casos, individuos de localidades distantes aparecieron más relacionados entre sí que con individuos de localidades vecinas (Figura 3.6). Asimismo, los linajes clonales identificados con el GenClone se agruparon como unidades evolutivas en el dendrograma. Por último, las poblaciones no se agruparon según el tipo de sistema reproductivo que presentan, ya que los linajes sexuales aparecieron en dos *clusters* independientes.

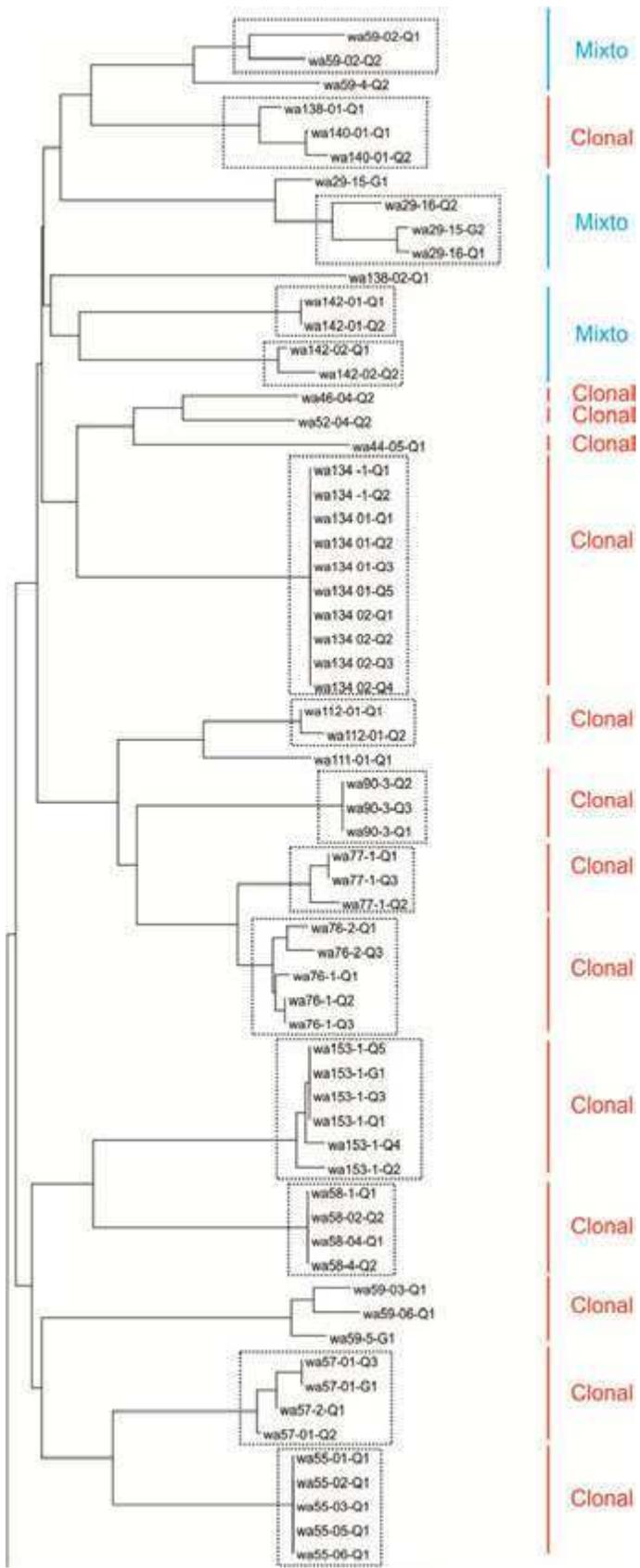
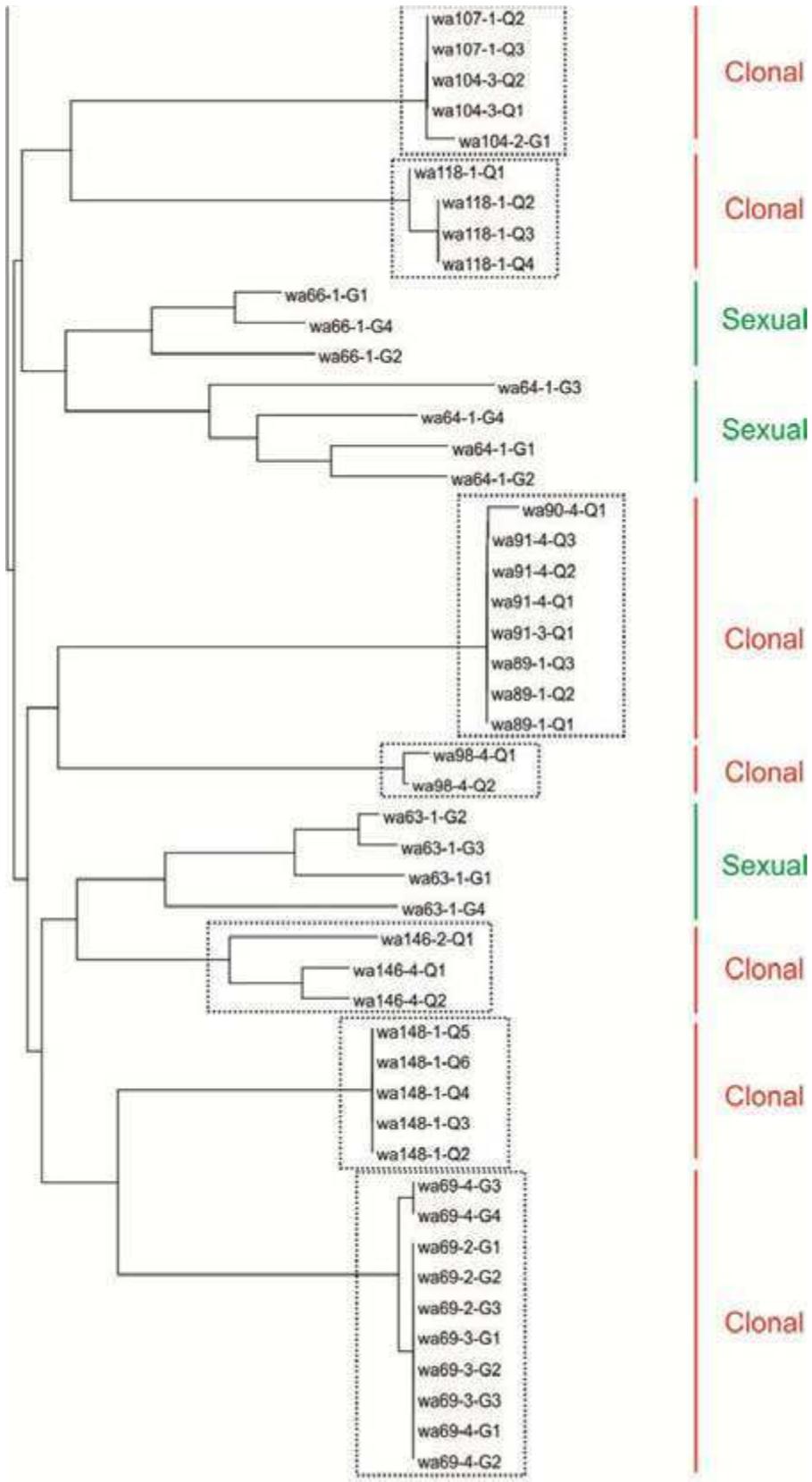


Figura 3.6. Dendrograma realizado bajo la metodología de Neighbor-joining con las distancias genéticas entre hembras reproductoras de *Wasmannia auropunctata* en límite sur de distribución nativa a partir de marcadores microsatélites. Cada cuadro de línea punteada indica genotipos multilocus que conforman un mismo linaje clonal. Los distintos colores indican el sistema reproductivo en cada localidad: rojo: clonal, verde: sexual, celeste: mixto. La codificación de cada individuo se corresponde con la tabla S.3.2. El dendrograma continúa en la página siguiente.



2

Discusión

La mayoría de las poblaciones presentes en el límite sur de distribución nativa de *W. auropunctata* presentó un sistema de reproducción clonal, en el cual las hembras reproductoras (reinas o hembras no fecundadas) de un mismo nido fueron genéticamente idénticas entre sí para todos los loci microsatélites analizados, lo que indica que surgieron por partenogénesis. En general los sitios donde los nidos se encontraron agregados, formando *clusters*, presentaron un único genotipo de hembra, es decir estuvieron compuestos por un único linaje clonal. La androgénesis en los machos pudo corroborarse solo en San Sebastián (donde se colectaron machos). Aquí, los machos del mismo nido presentaron idéntico genotipo para todos los loci microsatélites. Como se esperaba, la clonalidad estuvo asociada al tipo de hábitat de la población, ya que fue el sistema de reproducción característico de las poblaciones presentes en sitios antrópicos. A su vez, estas poblaciones fueron dominantes (con alta densidad de nidos, obreras y reinas), corroborando que en esta región se observa el mismo patrón de asociación entre sistema de reproducción, tipo de hábitat y características ecológicas de las poblaciones, previamente descrito para la especie en el norte de Sudamérica (Foucaud et al., 2009).

Aunque en menor medida, en sitios antrópicos también se encontraron nidos cuyas reinas fueron clonales, pero con genotipos distintos a los de reinas de los nidos vecinos, pertenecientes a distintos linajes clonales (ej. San Miguel de Tucumán, provincia de Tucumán, y San Javier, provincia de Santa Fe; Tabla S.3.4). El caso de Tucumán fue sorprendente ya que por tratarse de nidos agregados, que se encontraban muy próximos entre sí, se esperaba que fueran clonales. En cambio, en San Javier los nidos no estaban agregados en un *cluster*, sino dispersos a la largo de la ciudad (debajo de veredas). Una tercera población con estas características fue la de La Población, en Salta, donde las reinas de dos nidos cercanos pertenecieron a distintos linajes clonales (Tabla S.3.4). Uno de estos genotipos fue exactamente idéntico al encontrado en la localidad vecina de Tolombón, por lo que, por la baja cantidad de individuos analizados, es difícil inferir si se trata de una dispersión natural de un linaje clonal, o si fue una introducción mediada por el hombre.

El sistema de reproducción mixto fue encontrado también en sitios perturbados naturalmente, por pulsos de inundación estacionales en la planicie de inundación del Río Paraná (Puerto Ocampo, en Santa Fe, e Isla del Cerrito, en Chaco) y también en una población de los

Esteros del Iberá (Ea. El Socorro). Es posible que la clonalidad confiera la preservación de combinaciones alélicas beneficiosas para este tipo de ecosistemas, pero como a la vez son sistemas con mayor proporción de interacciones bióticas que los ambientes antrópicos, mantener sexualidad en estas poblaciones puede resultar también ventajoso para enfrentar condiciones ambientales cambiantes. Una hembra individual que abandona la reproducción sexual obtiene una ventaja inmediata a corto plazo (por ejemplo, una ventaja numérica al poder producir gran cantidad de individuos clonales en un ambiente sometido al estrés de la inundación periódicamente). En el largo plazo, sin embargo, los linajes partenogénéticos están condenados a la extinción debido a su incapacidad para evolucionar (Maynard Smith, 1978).

Solo cuatro poblaciones resultaron sexuales (con genotipo de hembras o de machos del mismo nido y nidos vecinos distintos entre sí). Todas estas poblaciones se hallaron en una pequeña área comparada al área total estudiada, estuvieron confinadas al este de Misiones (Yabotí, Alba Posse y El Soberbio) y norte de Corrientes (Camping Machuca) (Tabla S.3.4). Las poblaciones de Yabotí y Alba Posse se encontraron en sitios con muy baja perturbación humana, en bosques primarios o secundarios bien conservados, mientras que la población de El Soberbio se encontró en un sitio con perturbación humana ya que se trataba de nidos debajo de piedras en un jardín, aunque rodeado por una de las selvas mejor conservadas en Argentina, la Selva Paranaense. Por su parte, la población del Camping Machuca también se encontró en un bosque secundario, aunque sobre la planicie de inundación del Río Paraná, por lo cual es un sitio de alta perturbación natural. Pareciera entonces que las poblaciones de *W. auropunctata* presentes en ambientes naturales están asociadas a un sistema reproductivo sexual. A su vez, las poblaciones sexuales parecen estar asociadas a un clima tropical - subtropical, con poca variabilidad en la temperatura y la humedad, como el característico de esta región, muy distinto al clima templado y con marcada estacionalidad presente más al sur, hacia las provincias de Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires, y también el del Noroeste argentino (NOA) donde solo se encontraron poblaciones clonales o mixtas.

Es importante mencionar que en algunas de las poblaciones probablemente sexuales (por encontrarse en sitios con baja perturbación humana y en base al patrón observado por Foucaud et al. (2009)) encontradas en la provincia de Formosa (El Bagual, San Francisco de Laishi, P.N. Chaco), y en las Yungas en el NOA, no fue posible determinar su sistema reproductivo por la ausencia de hembras reproductoras o machos en los nidos. Es importante notar también que en otras

poblaciones, solo se pudo analizar el sistema reproductivo a partir de un único nido, ya sea porque se halló solo uno, o porque los nidos vecinos no poseían individuos de la casta reproductora. De esta manera, aunque el sistema inferido dentro de los nidos fue clonal, no se puede saber si el sistema reproductivo de la población es clonal o mixto (ej. Encarnación, Dourados, Paranaguá, Lozano, Tolombón y Anillaco).

La mayor latitud a la que se encontraron poblaciones sexuales fue 27° 34'S, en un bosque en la localidad de Alba Posse, Misiones, Argentina. Hacia el sur de esta coordenada, todos los nidos de *W. auropunctata* fueron clonales y las poblaciones fueron clonales o mixtas. Las poblaciones mixtas solo se encontraron hasta los 30°35'S en la ciudad de San Javier, provincia de Santa Fe, la cual está muy próxima a la planicie de inundación del Río Paraná. En conclusión, en las mayores latitudes donde *W. auropunctata* está presente, hasta los 34°51'S en la localidad de Lozano, en la provincia de Buenos Aires, la población más austral de *W. auropunctata* conocida hasta el momento, solo se han establecido poblaciones clonales.

La distribución de los tres tipos de sistemas reproductivos en el espacio, sugiere un patrón en el cual a gran escala, a lo largo del área argentina de la cuenca del Río Paraná, existe una diferenciación en las poblaciones, que sugiere una transición de las poblaciones sexuales en el norte (Misiones) a mixtas (norte de Santa Fe) y luego clonales (sur de Santa Fe, Entre Ríos y Buenos Aires). Las poblaciones mixtas se encuentran en ambientes intermedios entre los característicos de las poblaciones sexuales y los de las clonales, las cuales se ubican en dos extremos de hábitat, natural y antrópico respectivamente. Las poblaciones mixtas en cambio pueden presentarse en ambientes antrópicos o medianamente antrópicos, y perturbados naturalmente, pero no se encuentran en ambientes naturales no perturbados como bosques primarios. Sería interesante estudiar nuevas poblaciones de *W. auropunctata* y analizar si este patrón de transición se repite en otras áreas de la distribución nativa de la especie.

La clonalidad, asociada a la actividad humana con su consecuente modificación del ambiente, parece jugar un papel importante en el éxito de *W. auropunctata* en el extremo sur de su rango nativo por dos motivos. Por un lado, los sitios donde *W. auropunctata* es abundante, es decir presenta poblaciones dominantes, resultaron mayormente clonales y estuvieron mayormente presentes en sitios antrópicos. Por otro lado, aunque las poblaciones clonales aparentemente están

distribuidas en todo el rango de distribución de la especie, son solo poblaciones clonales las que alcanzaron latitudes mayores y ambientes más extremos, lo que sugiere que la clonalidad se asocia a la expansión del rango de distribución de *W. auropunctata*. Foucaud et al. (2009) descartan que la clonalidad sea el motivo directo que explica la dominancia de ciertas poblaciones de *W. auropunctata*. Proponen que es en realidad una causa indirecta, ya que la clonalidad ayudaría a fijar genotipos ventajosos en ambientes extremos (ej. Mergeay et al., 2006), permitiéndole expandir su nicho ecológico con respecto al de poblaciones sexuales. Es probable que los repetidos eventos de reproducción sexual presentes en las poblaciones de *W. auropunctata* generen variantes alélicas, algunas de ellas beneficiosas, bajo las cuales actuaría la selección natural, permitiendo una adaptación a climas más fríos en el sur de Sudamérica y las cuales, a su vez, serían fijadas gracias a la clonalidad. Es posible, entonces, que la clonalidad haya jugado un papel central en la dispersión de la especie a un clima más frío y estacional que el presente en el resto del rango nativo de la especie (Rey et al., 2012) y, a su vez, la actividad humana sea responsable de su mayor abundancia en la región. Esta mayor abundancia particularmente en las zonas aledañas a los grandes puertos internacionales (como el de Rosario, y el de Buenos Aires), también juega un papel central ya que son sitios estratégicos desde donde se pueden originar nuevas invasiones. Si la especie no fuera particularmente abundante en estos sitios, sería muy difícil su posterior dispersión accidental a nuevos sitios más distantes por medio del transporte comercial.

La diversidad clonal en la región estudiada fue alta, se identificaron 40 linajes a partir de 112 hembras, de los cuales 29 corresponden a linajes clonales y 11 a hembras de nidos sexuales. Los linajes en general no trascendieron la localidad donde fueron encontrados. Solo cinco linajes clonales fueron identificados en más de una localidad. La gran diversidad clonal en las hembras sugiere que los eventos de reproducción sexual que originan nuevos linajes clonales son comunes en las poblaciones de *W. auropunctata* en el sur de Sudamérica y que, si bien se demostró anteriormente que el mecanismo por el cual las reinas le confieren nuevas combinaciones alélicas a sus obreras es a través del apareamiento con un macho de un nuevo genotipo, esto parece ser solo un mecanismo local. Por el contrario, a una escala regional, la diferenciación de las obreras se adquiere, o bien a través de generación de nuevas reinas y machos por reproducción sexual clásica, o bien por diferenciación genética pronunciada por la baja capacidad de dispersión de esta especie.

Por último, las dos poblaciones donde se encontraron ginandromorfos, presentaron un sistema de reproducción clonal, apoyando la hipótesis de que esta aberración genética podría ser un costo de la clonalidad en *W. auropunctata*. Esto abre la puerta a la realización de futuros experimentos para corroborar esta hipótesis.

CAPÍTULO 4

Organización social de *Wasmannia auropunctata* en Argentina



Foto: Alex Wild

Resumen. Se investigó el sistema de organización social – multicolonial o supercolonial – presente en poblaciones de *W. auropunctata* en Argentina mediante estudios comportamentales. Para ello, se realizaron pruebas pareadas de agresión en el laboratorio, entre obreras de distintos nidos de *W. auropunctata*, tanto de poblaciones sexuales como clonales, ecológicamente dominantes y no dominantes y presentes en hábitats con distinto nivel de perturbación (bajo, medio y alto). Se comparó el nivel de agresión entre nidos de la misma localidad y de distintas localidades. La mayoría de las poblaciones en Argentina presentó una organización social supercolonial, con ausencia de agresión entre los distintos nidos encontrados dentro de una localidad. La supercolonialidad fue predominante, independientemente del nivel de perturbación del hábitat, el sistema reproductivo y la dominancia ecológica de las poblaciones. La agresión entre nidos pertenecientes a distintas localidades fue mayor que entre nidos de la misma localidad. Los nidos pertenecientes al mismo linaje clonal se comportaron como una única supercolonia cuando estuvieron distanciados en general no más de 300 metros. La supercolonia de mayor tamaño encontrada en Argentina, hallada en el Camping Las Tejas, Zárate, provincia de Buenos Aires, se distribuyó a lo largo de una transecta de 500 metros de longitud. Esto representa un tamaño de supercolonia mucho menor al observado en regiones donde *W. auropunctata* fue introducida.

Introducción

Todas las sociedades se basan en la capacidad de sus miembros de reconocerse entre sí y diferenciarse de individuos externos. Las sociedades más conocidas, presentes en las de la mayoría de los vertebrados, son las "sociedades de reconocimiento", las cuales se limitan a unos pocos individuos que se reconocen individualmente entre sí. Por el contrario, los insectos sociales como las hormigas, abejas y termitas, forman "sociedades anónimas", donde no es necesario que los miembros se reconozcan unos a otros individualmente para que el grupo permanezca unificado (Moffett et al., 2012). Por el contrario, estas sociedades dependen de señales comunes reconocidas por todos sus miembros, las cuales permiten que puedan crecer de manera altamente expansiva.

Los insectos sociales han desarrollado eficientes mecanismos para reconocer individuos de su misma sociedad, o colonia, y diferenciarlos de individuos de otras colonias. De esta manera, los límites de las colonias se mantienen con alta fidelidad (Suarez et al., 2002). Las hormigas identifican a sus compañeras de colonia por su olor, que proviene de las secreciones de los hidrocarburos que cubren su cutícula (Henderson et al., 1990; Suarez et al., 2002). Asimismo, la agresión intercolonial se correlaciona con la variación en los perfiles de hidrocarburos cuticulares (Bonavita-Cougourdan et al., 1987; Nowbahari et al., 1990). Adicionalmente, las señales que utilizan las hormigas para identificar a sus compañeras de nido también pueden estar relacionadas con factores genéticos y ambientales (Suarez et al., 2002).

En la mayoría de las especies de hormigas, las obreras defienden agresivamente el territorio de su colonia, particularmente contra obreras de su misma especie, resultando en una forma de estructura de colonia conocido como multicolonialidad (Hölldobler & Wilson, 1977; Bourke & Franks, 1995). En contraste, algunas especies muestran una estructura colonial conocida como supercolonialidad, en el que los niveles de agresión intraespecífica se reducen o están ausentes, generando que los límites de distintas colonias sean muy débiles o inexistentes (Hölldobler & Wilson, 1977). En este tipo de organización social, los individuos de diferentes nidos se mezclan libremente formando una gran supercolonia altamente competitiva. Las señales de reconocimiento compartidas por las hormigas proporcionan criterios claros para definir la supercolonia y permiten que una supercolonia permanezca como una sola sociedad, sin importar cuán grande se vuelva (Moffett et al., 2012). La máxima expresión de la supercolonialidad es la unicolonialidad, donde todos los individuos de una población pertenecen a la misma colonia (Suarez et al., 2008).

La supercolonialidad y unicolonialidad son raras en las hormigas, pero comunes en hormigas invasoras como la hormiga argentina, *Linepithema humile* (Hölldobler & Wilson, 1990; Passera, 1994; Bourke & Francos, 1995). En la mayoría de las poblaciones introducidas de *L. humile* la agresión intraespecífica está casi totalmente ausente, formando extensas supercolonias a lo largo de cientos de kilómetros cuadrados (Suarez et al., 1999). Por el contrario, las poblaciones nativas de *L. humile* se comportan generalmente de manera multicolonial, presentando agresión intraespecífica en escalas espaciales pequeñas (<100 m) (Suarez et al., 1999) o unicolonial, pero formando supercolonias de menor tamaño que las presentes en el rango introducido (Pedersen et al., 2006). Se han propuesto dos hipótesis para explicar la transición de la multicolonialidad a la unicolonialidad en esta especie: i) reducción de la diversidad genética, por medio de un cuello de botella, luego de su introducción (Tsutsui et al., 2000); ii) disminución en la diversidad genética de los alelos de reconocimiento después de la introducción (Giraud et al., 2002).

Al igual que la hormiga argentina, las poblaciones de la pequeña hormiga de fuego, *W. auropunctata*, presentes en el rango introducido también se comportan de manera unicolonial (ej. Islas Galápagos, Clark et al., 1982; Ulloa Chacón & Cherix, 1990). En la Isla de Nueva Caledonia (~19.000 km²), en Australia, distintos nidos forman una única gran supercolonia, que alcanza cientos de kilómetros de extensión (Le Breton et al., 2004). Por su parte, al igual que en la hormiga argentina, en el área nativa de *W. auropunctata* también se ha observado un polimorfismo en el

sistema de organización social, asociado al nivel de perturbación antrópica del ambiente. En el Valle del Río Cauca en Colombia, por ejemplo, nidos presentes en un parche de bosque asociado a un mayor grado de perturbación, presentaron una estructura social unicolonial, mientras que los nidos presentes en un parche de bosque con menor grado de perturbación, presentaron una estructura social multicolonial con alta agresión intraespecífica (Salguero et al., 2011). En Guyana Francesa y Bahía, en Brasil, la organización social fue supercolonial tanto en ambientes naturales como antrópicos (Foucaud et al., 2009), sugiriendo que no existe asociación entre la perturbación del ambiente y el sistema de organización social de *W. auropunctata* en el rango nativo. Por otro lado, poblaciones presentes en plantaciones de cacao, en Bahía, mostraron una organización social supercolonial, pero con agresión entre obreras de diferentes plantaciones, indicando que cada supercolonia no se extiende más allá de una plantación (Le Breton et al., 2004). Los últimos dos estudios encontraron que las supercolonias en el rango nativo poseen un tamaño mucho menor a las existentes en el rango introducido.

El objetivo de este capítulo es estudiar la organización social de *W. auropunctata* en Argentina, por medio de ensayos de agresión. En base a los trabajos de Le Breton et al. (2004) y Foucaud et al. (2009), se espera que la organización social en el área nativa sea supercolonial, con un tamaño de supercolonia menor al presente en el rango introducido. En base a los antecedentes expuestos, y debido a la ausencia de una clara asociación entre la perturbación del ambiente y la organización social de *W. auropunctata* en su rango nativo, el objetivo de este capítulo es analizar si en Argentina existe una asociación entre ambos factores.

Materiales y Métodos

Sitios de estudio

Se colectaron nidos (agregados de obreras, reinas y crías) en 16 sitios correspondientes al muestreo realizado en el capítulo 2. Dos de los sitios poseían un nivel de perturbación bajo (bosques primarios), cinco poseían un nivel de perturbación medio, ya sea antrópica (como campings) o natural (sitios en la planicie de inundación del Río Paraná), y nueve eran sitios altamente perturbados por el hombre, principalmente sitios urbanizados (Tabla 4.1). Cada nido fue colectado junto con la materia orgánica circundante, colocado en un balde y trasladado al laboratorio. Los

nidos fueron mantenidos en condiciones de humedad controlada y temperatura ambiente. Se los alimentó diariamente con fuentes azucaradas (manteca de maní) y proteicas (huevo duro), y agua *ad libitum*. En la mayoría de los sitios los nidos se encontraron agrupados en un área de no más de 200 metros de diámetro, formando un *cluster*. En algunos sitios se colectaron nidos en más de un *cluster* (Tabla 4.1). A partir de la posición geográfica de cada nido (la cual fue registrada con GPS como se explica en el capítulo 2) se calculó la distancia entre los mismos utilizando la aplicación Movable Type Scripts disponible en <http://www.movable-type.co.uk/scripts/latlong.html>.

Ensayos de agresión

Las pruebas de agresión han sido comúnmente implementadas para estudiar unicolonialidad en diferentes especies de hormigas, principalmente en la hormiga argentina *Linepithema humile* (Holway et al., 1998; Suarez et al., 1999; Tsutsui et al., 2003; Pedersen et al., 2006) y también en *W. auropunctata* (Le Breton et al., 2004). Aquí se implementó la misma metodología previamente utilizada en dichos estudios.

Se realizaron pruebas pareadas de agresión en el laboratorio entre obreras provenientes a) de distintos nidos dentro de un mismo sitio o *cluster*, b) de distintos *clusters* dentro del mismo sitio y c) de distintos sitios. Cada ensayo consistió en tomar una obrera de dos nidos distintos. Ambas obreras eran colocadas en una pequeña arena neutral, la cual consistió en una caja de petri de 3 cm de diámetro, cuyas paredes estaban cubiertas con teflón para evitar que las hormigas escapen escalando las paredes. Se observó el comportamiento de ambas obreras durante 5 minutos. El resultado de cada prueba fue medido mediante un puntaje (*score*) que varió entre 0 y 4 según el siguiente criterio: 0 = si se ignoraban, 1 = si interactuaban sin agresión (ej. antenación), 2 = si al encontrarse se tocaban, pero una de ellas o las dos respondían con repulsión (ej. escapando rápidamente en direcciones opuestas), 3 = si eventualmente se agredían mediante mordidas, 4 = si peleaban prolongadamente mediante mordidas y utilizando su aguijón (Le Breton et al., 2004). Este ensayo se repitió cinco veces por cada par de nidos, descartando a las hormigas utilizadas en los enfrentamientos. Los nidos se consideraron de la misma colonia si presentaban un nivel de agresión promedio menor a 2, infiriéndose en ese caso organización social supercolonial, y de colonias distintas si los niveles de agresión fueron mayores o iguales a 2, infiriéndose organización social multicolonial. Debido a que en realidad no se delimitaron las poblaciones de *W. auropunctata*, sino que, solo a fines prácticos, cada localidad fue considerada una población, no es correcto hablar de

unicolonialidad. Para determinar el nivel “base” de interacción entre obreras de la misma colonia se realizaron, preliminarmente, pruebas control, entre obreras del mismo nido. Se determinó que el nivel base de interacción fue de $score = 1$.

Se estudió la diferencia en la incidencia de cada tipo de sistema de organización social por medio de una prueba de bondad de ajuste que analiza si la distribución se ajusta a una proporción 1:1. Se estudió si existe una asociación entre el nivel de perturbación del ambiente (bajo, medio o alto) y la organización social mediante una prueba de independencia. También se analizó cuál es el sistema de organización social preponderante en cada tipo de hábitat, por medio de pruebas de bondad de ajuste, analizando si se desvían de la proporción 1:1. En el caso de existir organización social supercolonial, se calculó el tamaño de las supercolonias teniendo en cuenta la distancia entre los nidos que no presentan agresión. Por otro lado se estudió, por medio de pruebas de independencia, la asociación entre la organización social y el tipo de sistema reproductivo (inferido en el capítulo 3), y la dominancia ecológica de las poblaciones, dada por la densidad de nidos, obreras y reinas. La significancia de las pruebas de independencia se evaluó por medio de permutaciones de Monte Carlo, debido al pequeño número de observaciones por categoría.

Se analizó si los niveles de agresión entre nidos de la misma localidad son diferentes a los de nidos provenientes de distintas localidades por medio de una prueba U de Mann-Whitney, una prueba no paramétrica que evalúa si dos muestras provienen de la misma población, como en Le Breton et al. (2004). También se evaluó, por medio de una regresión logística, si la agresión depende de la pertenencia o no a un mismo linaje clonal (identificados en el capítulo 3). La regresión logística también constituye una prueba no paramétrica que predice el valor que tomaría una variable categórica en función al valor de una variable predictora continua. Para ello se consideró a la agresión como variable categórica (agresión: $score > 2$; no agresión: $score < 2$), y la distancia genética (o diferencia alélica) fue variable continua.

Análisis estadísticos

Las pruebas de independencia y bondad de ajuste se realizaron con el programa Past v.1.17 (Hammer & Harper, 2001). La prueba U de Mann-Whitney y la regresión logística realizaron con el programa STATISTICA v.7.0 (StatSoft, Inc, 2004).

Resultados

Se analizaron en total 108 nidos pertenecientes a 21 *clusters* en los 16 sitios. Cada *cluster* estuvo compuesto por entre 2 y 9 nidos (Tabla 4.1). Solo un nido (Wa 50), en la ciudad de Zárate, no perteneció a ningún *cluster*. En el 86% de los *clusters* (18 de 21) se registró un nivel de agresión promedio menor a 2, infiriendo una organización social supercolonial. Solo 3 *clusters* resultaron multicoloniales (*score* > 2) representando el 14% del total de los *clusters* analizados (Tabla 4.1). En Argentina, la mayoría de las poblaciones de *W. auropunctata* presentaron una organización social supercolonial ($\chi^2 = 10,71$; *gl* = 1; *P* < 0,01; Figura 4.1).

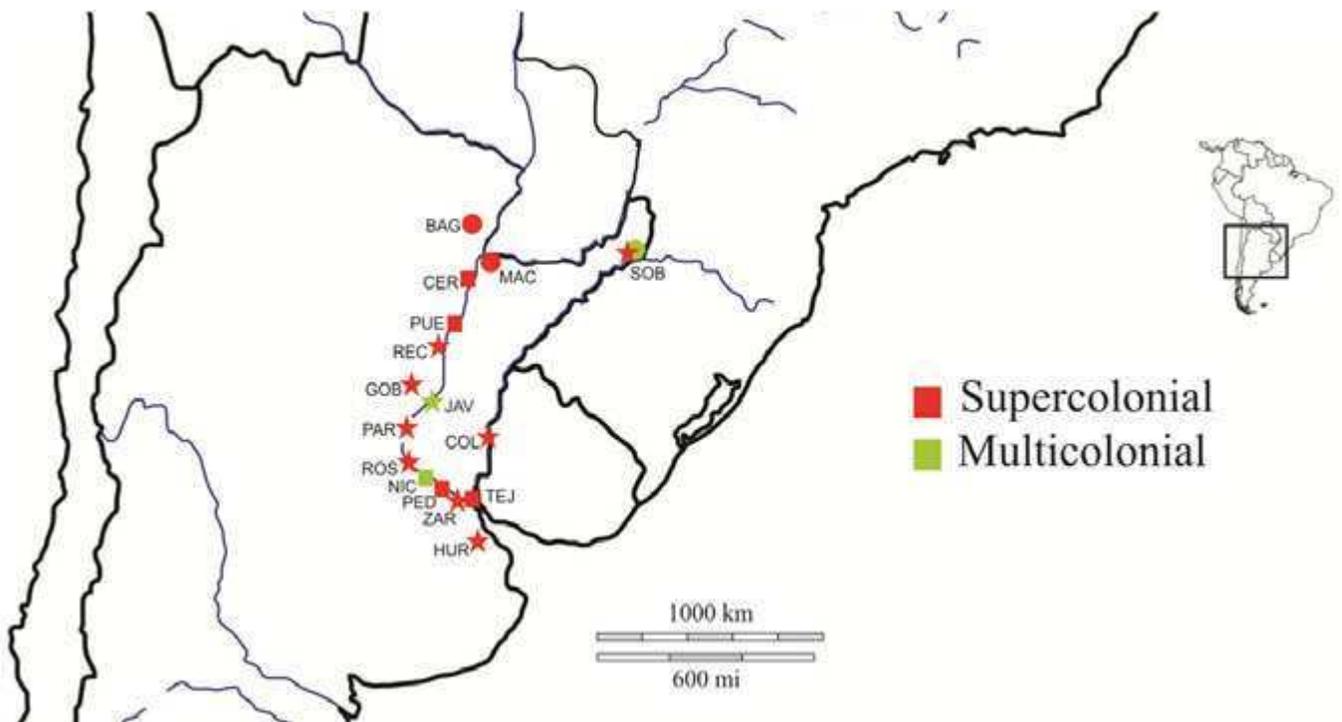


Figura 4.1. Sistema de organización social de poblaciones de *Wasmannia auropunctata* en Argentina. Los sitios con nivel de perturbación baja, media y alta se indican con círculos, cuadrados y estrellas, respectivamente. El color de cada símbolo representa el tipo de organización social encontrado (supercolonial o multicolonial). Las letras indican las tres primeras letras del nombre de cada localidad (ver código en la Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Número de nidos analizados por *cluster* en cada localidad. Se indica el código de cada localidad correspondiente al mapa de la figura 4.1. Para cada *cluster* se indica la distancia media entre los nidos, con el valor mínimo y máximo entre paréntesis; el nivel medio de agresión, con el rango entre paréntesis; el tipo de organización social inferido; el nivel de perturbación del ambiente; el sistema de reproducción inferido en el capítulo 3 y la dominancia ecológica observada en el capítulo 2, donde D: Dominante y ND: No dominante. Las coordenadas de cada localidad se especifican en la tabla S.2.1 del capítulo 2.

| Localidad | Código | No. nidos | Distancia media (m) (rango) | Nivel de agresión (<i>score</i>) Promedio (rango) | Organización social | Nivel de perturbación | Sistema de reproducción | Dominancia ecológica |
|----------------------------|--------|-----------|--------------------------------|--|---------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| Hurlingham | HUR | 4 | 5,9 (2,5-8,2) | 0,57 (0-1) | supercolonial | alto | clonal | D |
| Camping Las Tejas | TEJ | | | | | | | D |
| <i>Cluster</i> Wa45 | | 5 | 26 (9,9-59,8) | 0,96 (0,8-1) | supercolonial | medio | clonal | D |
| <i>Cluster</i> Wa46 | | 9 | 37,6 (3,1-72,9) | 1,1 (0,6-2,2) | supercolonial | medio | clonal | D |
| <i>Cluster</i> Wa47 | | 2 | 3,1 | 1 | supercolonial | medio | clonal | D |
| <i>Cluster</i> Wa51 | | 2 | 56,8 | 0,8 | supercolonial | medio | clonal | D |
| Zárate (ciudad) | ZAR | | | | | | | D |
| <i>Cluster</i> Wa49 | | 4 | 43,4 (3,1 - 114,3) | 0,9 (0,8-1) | supercolonial | alto | clonal | D |
| Nido Wa50 | | 1 | | | | alto | clonal | D |
| <i>Cluster</i> Wa56 | | 2 | 4,01 | 1 | supercolonial | alto | clonal | D |
| San Pedro | PED | 4 | 32,6 (8,3-58,6) | 1,07 (0,6-1,4) | supercolonial | medio | clonal | D |
| San Nicolás | NIC | 2 | 20,9 | 3,2 | multicolonial | medio | clonal | ND |
| Rosario | ROS | 4 | 441,1 (36,8-701,7) | 3 (0,8-4) | supercolonial | alto | clonal | D |
| Paraná | PAR | 6 | 39,3 (8,5-88,6) | 1,08 (1-1,6) | supercolonial | alto | clonal | D |
| Reconquista | REC | 2 | 6,2 | 1 | supercolonial | alto | clonal | D |
| Gobernador Crespo | GOB | 4 | 30 (2-42,9) | 1,13 (0,8-2) | supercolonial | alto | clonal | D |
| San Javier | JAV | 4 | 82,3 (40,8-126,4) | 2,8 (1-4) | multicolonial | alto | mixto | D |
| Puerto Ocampo | PUE | 4 | 3 (2-6) | 1,1 (1-1,16) | supercolonial | medio | mixto | D |
| El Bagual | BAG | 2 | 5 | 1,6 | supercolonial | bajo | ? | ND |
| Isla del Cerrito | CER | 3 | 33,8 (30-41,3) | 1,5 (1-2,2) | supercolonial | medio | mixto | D |
| Camping Machuca | MAC | 2 | 10 | 1 | supercolonial | bajo | sexual | ND |
| El Soberbio | SOB | | | | | | | ND |
| <i>Cluster</i> 1 (jardín) | | 2 | 40 | 1 | supercolonial | alto | sexual | ND |
| <i>Cluster</i> 2 (camping) | | 2 | 50 | 2,6 | multicolonial | bajo | sexual | ND |
| Colón | COL | 4 | 20 (2-50) | 1 (1-1) | supercolonial | alto | clonal | D |
| Promedio | | | 49,3 | 1,25 | | | | |

No se encontró una asociación entre el sistema de organización social y el nivel de perturbación del hábitat ($\chi^2 = 1,06$; $P = 0,72$; Tabla 4.2). En los tres tipos de hábitat el sistema de organización social predominante fue el supercolonial (Figura 4.2). Tanto los ambientes con nivel de perturbación medio como alto, presentaron mayor incidencia de supercolonialidad que de multicolonialidad (χ^2 (medio) = 4,5; $gl = 1$; $P < 0,05$; χ^2 (alto) = 6,4; $gl = 1$; $P < 0,05$; Figura 4.2). Para el caso de nivel de perturbación bajo, el tamaño muestral no fue suficiente para realizar la prueba estadística.

Tabla 4.2. Tabla de contingencia a partir de la cual se realizó la prueba de independencia para analizar la asociación entre el sistema de organización y la perturbación del hábitat.

| | | Nivel de perturbación del ambiente | | | Total |
|---------------------|---------------|------------------------------------|-------|------|-------|
| | | Bajo | Medio | Alto | |
| Organización social | Multicolonial | 1 | 1 | 1 | 3 |
| | Supercolonial | 2 | 7 | 9 | 18 |
| Total | | 3 | 8 | 10 | 21 |

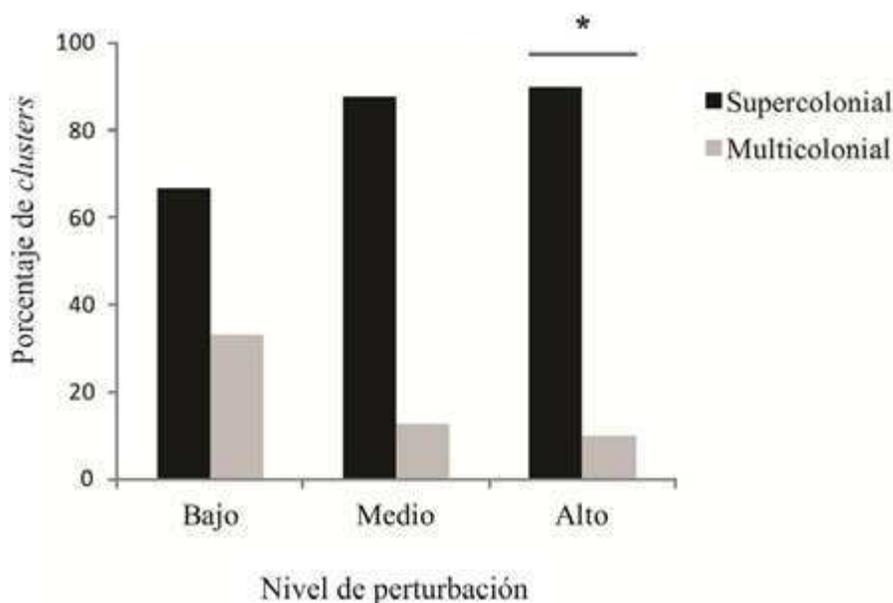


Figura 4.2. Porcentaje de *clusters* con cada tipo de sistema de organización social en ambientes con distinto nivel de perturbación. Los porcentajes corresponden a los valores de la tabla 4.2. *: $P < 0,05$.

Tampoco existió una asociación entre el sistema de organización social y el sistema reproductivo ($\chi^2 = 1,64$; $P = 0,52$; Tabla 4.3). Los tres *clusters* que presentaron multicolonialidad presentaron los tres tipos de sistema reproductivo (una sexual, una mixta y otra clonal). Dentro de los *clusters* clonales, la organización social fue mayormente supercolonial ($\chi^2 = 9,31$; $gl = 1$; $P < 0,01$; Figura 4.3). La prueba estadística no se realizó en los *clusters* con reproducción sexual o mixta dado el pequeño tamaño muestral.

Tabla 4.3. Tabla de contingencia para realizar el análisis de independencia que estudia la asociación entre la organización social y el sistema reproductivo de los *clusters*. El total es de 20 *clusters* ya que en uno de los *clusters* no se definió el tipo de sistema reproductivo (El Bagual).

| | | Sistema de reproducción | | | Total |
|---------------------|---------------|-------------------------|-------|--------|-------|
| | | Sexual | Mixto | Clonal | |
| Organización social | Multicolonial | 1 | 1 | 1 | 3 |
| | Supercolonial | 3 | 2 | 12 | 17 |
| Total | | 4 | 3 | 13 | 20 |

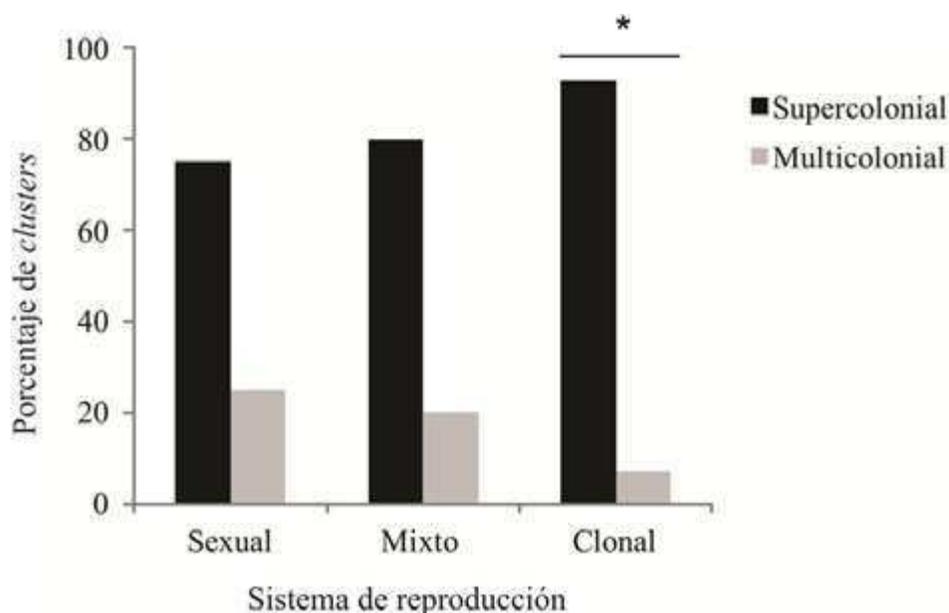


Figura 4.3. Porcentaje de *clusters* que presentan cada tipo de sistema de organización social en poblaciones o *clusters* con distinto tipo de sistema de reproducción (sexual, mixto o clonal). *: $P < 0,01$.

La asociación entre organización social y dominancia ecológica de las poblaciones tampoco resultó significativa ($\chi^2 = 3,54$; $P = 0,13$; Tabla 4.4). Ambos tipos de poblaciones tuvieron una mayor incidencia de supercolonialidad (χ^2 (dominantes) = 7,57; $gl = 1$; $P < 0,01$; χ^2 (no dominantes) no se probó dado el pequeño tamaño muestral) (Tabla 4.4 y Figura 4.4).

Tabla 4.4. Tabla de contingencia para realizar el análisis de independencia que estudia la asociación entre la organización social y la dominancia ecológica de los *clusters*.

| | | Dominancia ecológica | | Total |
|---------------------|---------------|----------------------|------------|-------|
| | | No dominantes | Dominantes | |
| Organización social | Multicolonial | 2 | 1 | 3 |
| | Supercolonial | 3 | 15 | 18 |
| Total | | 5 | 16 | 21 |

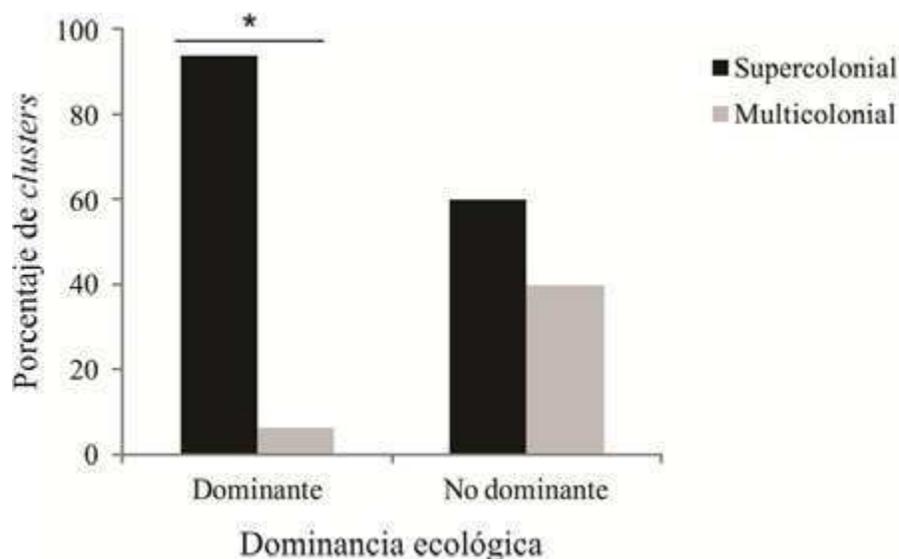


Figura 4.4. Porcentaje de *clusters* que presentan cada tipo de sistema de organización social en poblaciones con distinta dominancia ecológica (dada por la densidad de nidos, obreras y reinas).

*: $P < 0,001$.

Las obreras provenientes de distintos nidos de la misma localidad presentaron menores niveles de agresión (*score* medio = $1,4 \pm 0,9$; $N=113$) que los de obreras provenientes de nidos de distintas localidades (*score* medio = $3,2 \pm 0,7$; $N=115$) (Mann Whitney: $P < 0,0001$). Las obreras

empezaron a mostrar agresión y signos de multicolonialidad a partir de que los nidos estuvieron separados en promedio 290 ± 145 metros. La gran mayoría de los enfrentamientos entre pares de nidos provenientes de distintas localidades (113 de 115) mostró niveles de agresión mayores a 2 (Figura 4.5), excepto solo dos casos: un nido de San Nicolás enfrentado a un nido de Tumbaya y un nido de Rosario enfrentado a otro de Zárate.

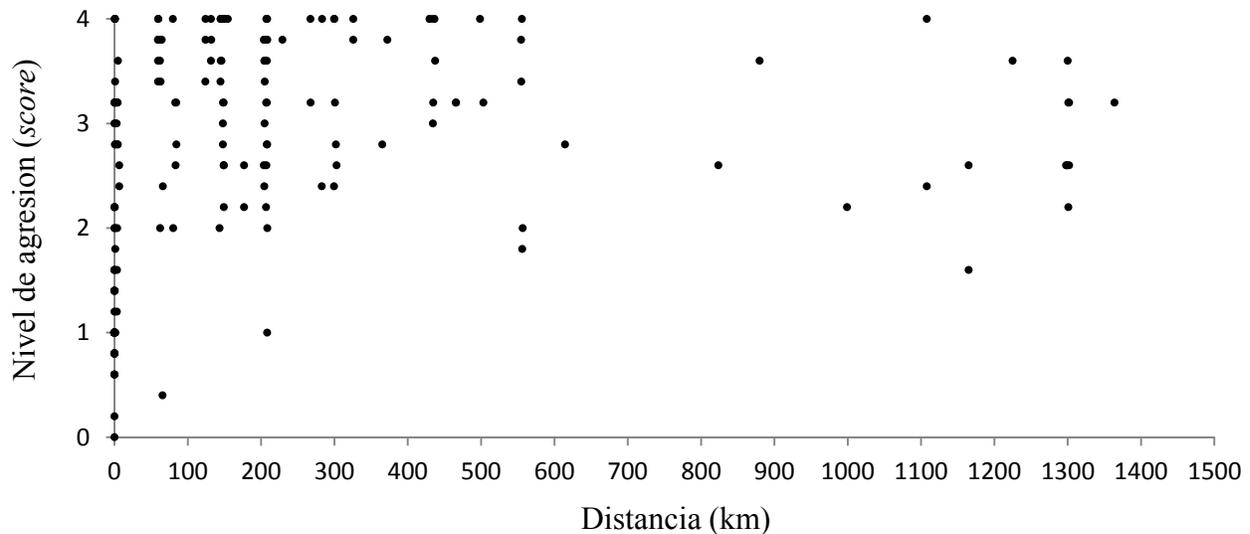


Figura 4.5. Nivel de agresión (*score* obtenido en los ensayos de agresión) en función de la distancia geográfica entre los nidos enfrentados. Las distancias menores a 6 km corresponden a pares de nidos presentes en la misma localidad, y las distancias mayores a 50 km corresponden a distintas localidades.

Los nidos pertenecientes al mismo linaje clonal pelearon significativamente menos que los nidos pertenecientes a distintos linajes clonales ($\chi^2 = 7,86$; $gl = 1$; $P < 0,01$; Regresión logística; Figura 4.6). La probabilidad de agresión entre dos nidos aumentó con la distancia genética, siendo del 20% cuando los nidos pertenecen al mismo linaje (diferencia alélica de 0) y aumentando a 80% cuando los nidos presentan una distancia genética de 12 alelos de diferencia.

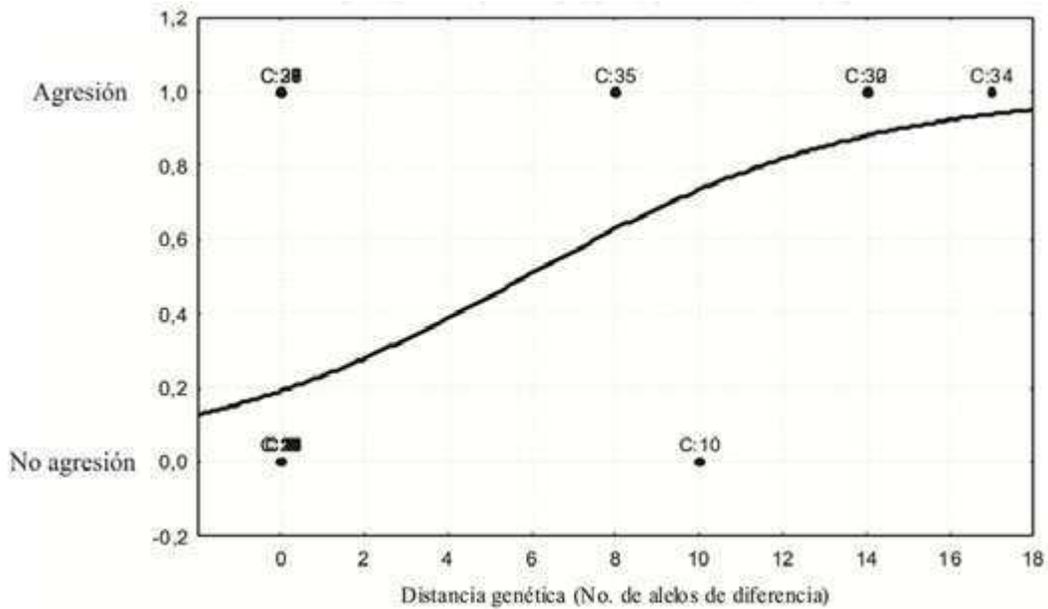


Figura 4.6. Regresión logística entre la distancia genética, medida como el número de alelos de diferencia entre genotipos multilocus, y la agresión, considerada como una variable categórica que toma un valor de cero, si no existe agresión (*score* medio < 2), y uno, si existe agresión (*score* medio \geq 2).

El número de supercolonias identificadas en cada sitio dependió en general del tamaño de área analizada. En la mayoría de las localidades (11 de 16, es decir el 69%) se analizó un solo *cluster*, cuyos nidos no estuvieron distanciados más de 200 metros, y se observó una única supercolonia. En otras localidades como Zárate y Rosario, donde se analizaron *clusters* separados más de 400 metros de distancia, se identificó más de una supercolonia. Por ejemplo, en Zárate (donde se analizaron 7 *clusters* distribuidos tanto en la ciudad como también en el Camping Las Tejas, ubicado del otro lado del Río Paraná) se identificaron por lo menos seis supercolonias (Figura 4.7). La supercolonia de mayor tamaño se distribuyó a lo largo de una transecta de 500 metros de longitud, y comprendió los *clusters* Wa45 y Wa47.



Figura 4.7. Mapa de Zárate donde se indica la ubicación de las seis supercolonias identificadas por medio de ensayos de agresión (círculos rojos) y su correspondencia con los distintos linajes clonales (círculos celestes) identificados en el capítulo 3. Cada símbolo amarillo representa un *cluster* (agrupamiento de nidos), con su código correspondiente.

Discusión

El trabajo realizado en este capítulo constituye la primera evidencia de organización social supercolonial de *W. auropunctata* en el límite sur de su distribución nativa, en Argentina, siendo el sistema de organización predominante en esta región. Los ensayos de agresión realizados permitieron identificar supercolonias cuando las obreras de distintos nidos no presentaban un comportamiento agresivo al ser puestas en contacto. La mayoría de los nidos pertenecientes a un mismo *cluster*, en un transecta de no más de 200 metros de longitud, pertenecieron a la misma supercolonia. Solo tres *clusters* (el 14% del total de los *clusters* analizados) resultaron multicoloniales. Uno de estos sitios era un bosque secundario de un camping en El Soberbio, provincia de Misiones, con un bajo nivel de perturbación humana, el cual por ser un sitio natural, se esperaba que presente una organización multicolonial. El segundo sitio, en San Nicolás, provincia de Buenos Aires, se trataba de una sabana al lado del Río Paraná, con un nivel medio de perturbación humana. El tercer sitio presentaba un alto nivel de perturbación humana (ciudad de

San Javier, provincia de Santa Fe), en el que no se esperaba encontrar multicolonialidad por tratarse de un sitio antrópico. Sin embargo, la agresión observada aquí, puede deberse a que, si bien los nidos se encontraban próximos entre sí, pertenecían a distintos linajes clonales, según revelado en el capítulo 3.

No existió una asociación significativa entre el nivel de perturbación del hábitat y el sistema de organización social, ya que tanto en los sitios con bajo nivel de perturbación, como medio y alto, presentaron mayor incidencia de supercolonialidad. De todas formas, la baja abundancia de *W. auropunctata* en bosques primarios, no permitió analizar apropiadamente el sistema de organización social en este tipo de hábitats, estando muy poco representado en el presente estudio. Tampoco existió una clara asociación entre la organización social y el sistema reproductivo de las poblaciones. Los tres tipos de sistemas reproductivos (sexual, mixto y clonal) presentaron mayormente una organización social supercolonial, y a su vez, la multicolonialidad estuvo representada, en menor medida, en los tres tipos de sistema reproductivo. Tampoco existió una asociación con la dominancia ecológica, ya que si bien la gran mayoría de las poblaciones dominantes resultaron supercoloniales, las no dominantes presentaron ambos tipos de sistema de organización por igual.

Los niveles de agresión entre nidos provenientes de la misma localidad fueron menores a los provenientes de distintas localidades. Este es el mismo patrón observado por Le Breton et al. (2004) en Brasil. Las obreras empezaron a mostrar agresión y signos de multicolonialidad a partir de que los nidos estuvieron separados en promedio 290 ± 145 metros. Ninguna supercolonia se distribuyó a lo largo de más de una localidad ya que los niveles de agresión entre la gran mayoría de los nidos presentes en distintas localidades fueron altos. Esto es lo opuesto a lo que ocurre en los lugares invadidos, donde agregados de distintos sitios, separados por cientos de kilómetros de distancia, no presentan agresión. Por ejemplo, la población introducida en distintas localidades en Israel, constituye una única supercolonia (Vonshak et al., 2009), y en la isla de Nueva Caledonia (Australia), también se registró una única supercolonia abarcando 400 kilómetros, a lo largo de toda la isla (Le Breton et al., 2004). Como era de esperar, las supercolonias en Argentina tienen un tamaño mucho menor a las de lugares donde *W. auropunctata* fue introducida: la supercolonia más grande registrada en Argentina tuvo solo 500 metros de longitud, en el Camping Las Tejas, Zárate, provincia de Buenos Aires. Curiosamente, esta es la colonia más relacionada a la población

introducida en Israel, y constituye la posible población fuente de la introducción (Rey et al., 2012). La diferencia en el tamaño de las supercolonias entre el rango nativo y el introducido podría deberse a la mayor diversidad clonal (mayor cantidad de linajes) en el rango nativo.

La probabilidad de que exista agresión entre dos nidos aumentó con la distancia genética entre los mismos. Así, dos nidos pertenecientes al mismo linaje clonal presentaron una baja probabilidad de agresión (del 20%), formando, en general, supercolonias. Esta probabilidad aumentó en nidos pertenecientes a distintos linajes clonales, llegando a ser del 80% cuando la distancia alélica entre dos nidos es de 12 alelos de diferencia.

Los datos obtenidos aquí sugieren, en general, que los nidos no solo forman supercolonias cuando pertenecen al mismo linaje clonal, sino también cuando se encuentran próximos entre sí, a una distancia no mayor de ~300 metros. Por ejemplo, en Rosario, donde se evaluaron cuatro nidos pertenecientes al mismo linaje clonal, solo hubo ausencia de agresión entre los nidos que se encontraban a pocos metros de distancia (30 m). Los nidos alejados más de 300 metros presentaron agresión, infiriendo así, la presencia de tres colonias en esta localidad. Este fenómeno de agresión entre nidos que pertenecen al mismo linaje clonal puede deberse a que, al distanciarse de su colonia original, los individuos de colonias distantes pierden el olor característico de su colonia original (Henderson et al., 1990). Sin embargo, esto no ocurre en las poblaciones introducidas (ej. Israel y Nueva Caledonia), que pertenecen al mismo linaje clonal, están distanciadas entre decenas a cientos de kilómetros y no presentan agresión. Por lo tanto, debe existir algún factor en el rango nativo, ausente en el rango introducido, que provoca que nidos distantes (cientos de metros), del mismo linaje clonal, presenten agresión. Será interesante responder esta pregunta en estudios futuros.

En San Javier, por otro lado, si bien los nidos se encontraban a pocos metros de distancia entre sí (entre 60 y 127 m), la pertenencia a distintos linajes clonales explicaría la presencia de más de una supercolonia en esta localidad. Solo en San Nicolás se presentó un caso extraño, donde dos nidos muy próximos entre sí, separados solo por 20 metros, pertenecientes al mismo linaje clonal, presentaron agresión. El tipo de ambiente (natural) y la baja dominancia ecológica de esta población, podrían estar asociados a la organización social multicolonial en este sitio. Es posible que la dieta más diversa de los ambientes naturales modifique los carbohidratos de la cutícula de las obreras de los distintos nidos, provocando que se diferencien y presenten agresión sin importar que

las reinas pertenezcan al mismo linaje clonal. Sería interesante estudiar los genotipos de las obreras de estos nidos, ya que otra posible causa de la agresión podría ser que no comparten el mismo genotipo de macho parental, haciendo que las obreras estén genéticamente diferenciadas.

También hubo dos excepciones en el caso opuesto, donde, contrariamente a lo esperado, nidos separados por cientos de kilómetros de distancia y pertenecientes a distintos linajes clonales, no presentaron agresión (Tumbaya versus San Nicolás y Zárate versus Rosario). No se puede concluir aquí que se trate de una misma supercolonia, debido a que todos los clusters pertenecen a linajes clonales distantes. La ausencia de agresión en estos enfrentamientos podría ser consecuencia de haber sometido a los nidos a las mismas condiciones ambientales y la misma dieta durante los días previos a los ensayos de agresión (Hölldobler & Wilson, 1990). Una pérdida de agresión intraespecífica en condiciones de laboratorio se observa normalmente en los insectos sociales y es comúnmente atribuido a una reducción en los olores derivados del medio ambiente o a la necesidad de un contacto directo entre nidos (ej. Chen & Nonacs, 2000). Sin embargo, muchos estudios, han demostrado que la agresión entre nidos es mantenida cuando se controla por diferencias ambientales en el laboratorio (Heinze et al., 1996; Holway et al., 1998; Suarez et al., 2002; Vonshak et al., 2009). En el presente estudio, la agresión entre obreras de *W. auropunctata* provenientes de distintas localidades se mantuvo en la mayoría de los nidos mantenidos en el laboratorio.

CAPÍTULO 5

Filogeografía de *Wasmannia auropunctata* en su rango nativo



Resumen. En el presente capítulo se integraron métodos de filogeografía clásica y bayesiana, junto con modelado de nicho ecológico con variables ambientales actuales y pasadas, para estudiar los patrones demográficos que delinearón la distribución de *W. auropunctata* en Sudamérica. Se discutió su historia filogeográfica en su área nativa en relación a su reciente introducción en la región Mediterránea. Se generaron secuencias del gen mitocondrial Citocromo oxidasa I (COI) a partir de 154 individuos que cubren la mayor parte del área de distribución nativa de *W. auropunctata*, incluyendo individuos de los dos principales clados (A y B) de la especie. El análisis filogeográfico Bayesiano sugiere que el ancestro común de estos dos clados se ubicó con mayor probabilidad en el centro de Brasil hace ~3,9 millones de años. El clado A se diferenció y expandió hacia el norte y el clado B hacia el sur, y un proceso de contacto secundario comenzó hace ~380 mil años a lo largo del centro de Sudamérica. Los hábitats más adecuados, para los tres períodos climáticos analizados (actual, Último Máximo Glacial y Último Interglacial), parecen diferir entre ambos clados, sugiriendo que la diferenciación genética podría estar acompañada de una diferenciación en los requerimientos de nicho ecológico, siendo el clado A un linaje tropical y el clado B un linaje subtropical y templado. Estos resultados apoyan que las poblaciones de *W. auropunctata* de Argentina son nativas y que sólo el clado B alcanzó altas latitudes hacia el sur de Sudamérica, caracterizado por un clima más frío que el norte de este continente. Esto es concordante con su posterior establecimiento exitoso en la región Mediterránea.

Introducción

El estudio de la evolución de una especie o grupo de especies, frecuentemente requiere conocer la historia de las poblaciones y sus patrones de dispersión en el espacio. La filogeografía es una disciplina relativamente nueva, que estudia la distribución geográfica de los linajes dentro de una genealogía, especialmente aquellos dentro y entre especies cercanamente relacionadas (Avise, 2009). Su objetivo final es inferir qué fuerzas históricas y/o contemporáneas son responsables de la actual estructura genética de las especies (Avise, 2009). Para poder sacar conclusiones, la filogeografía combina los datos de ADN de los individuos (a partir de la construcción de una filogenia) con la posición geográfica donde cada individuo fue colectado.

La mayoría de las especies muestran al menos cierto grado de diferenciación genética en relación a su distribución geográfica (Avise, 2000). El marcador molecular más ampliamente utilizado para inferir patrones de distribución de la variabilidad y diferenciación genética en el espacio, demografía, biogeografía, taxonomía y especiación, ha sido el ADN mitocondrial (ADNmt) (Avise, 2009). Los genomas mitocondriales tienen la ventaja de poseer tasas relativamente rápidas de evolución, y por lo tanto proporcionan una buena resolución para eventos de especiación recientes (Moore, 1995; Zink y Barrowclough, 2008). Esto constituye una gran

ventaja sobre las secuencias nucleares, las cuales no poseen tasas de evolución suficientemente rápidas para realizar estudios intraespecíficos (Antonelli et al., 2010). Además, su forma de herencia simple (materna y sin recombinación) simplifica el estudio de la historia poblacional de las especies, ya que la única fuente de variabilidad es la mutación; a diferencia del ADN nuclear, que sufre recombinación durante la meiosis asociada a la reproducción sexual. Gracias a la tasa de mutación relativamente rápida del ADNmt, diversos haplotipos coexisten dentro de distintas poblaciones de una especie (Avice et al., 2009).

Sin embargo, el empleo de ADNmt como único marcador para estudiar la estructura genética de una especie o grupos de especies, particularmente de artrópodos, ha sido fuertemente criticado (Hurst & Jiggins, 2005). El principal problema de este marcador es que se ve afectado por la infección por microorganismos endosimbiontes, la cual es muy común en los artrópodos (ej. la bacteria *Wolbachia*; Rodriguero et al., 2013). Debido a que tanto la bacteria como el ADNmt se transmiten por vía materna, ambos pueden ser cotransmitidos a la descendencia, y por lo tanto estar en desequilibrio de ligamiento (Hurst & Jiggins, 2005). Existe evidencia de selección indirecta de genotipos mitocondriales mediada por infección por esta bacteria (Hurst & Jiggins, 2005). Un ejemplo de esto es el caso de una población de *Drosophila simulans*, originalmente no infectada, pero que en 1980 adquirió a la bacteria, la cual indujo incompatibilidad citoplasmática (es decir, una alteración reproductiva provocada por *Wolbachia* cuyo resultado es eliminar la descendencia de las hembras no infectadas) (Engelstädter & Hurst, 2009). La infección se diseminó rápidamente y arrastró un haplotipo mitocondrial que antes era raro (Turelli & Hoffmann, 1991). Por ello, las genealogías basadas únicamente en ADNmt pueden reflejar una historia evolutiva errónea y actualmente se sugiere el uso de ADN nuclear (ya sea a partir de secuencias o microsatélites) que corrobore las conclusiones obtenidas con el ADNmt. Sin embargo, en la actualidad, existen estudios filogeográficos basados únicamente en ADNmt, por la falta de variabilidad en genes nucleares (ej. Cardoso et al., 2015).

Las diferencias genéticas entre distintos linajes pueden atribuirse tanto a procesos actuales como históricos que hayan limitado el flujo génico o a diferentes regímenes de selección natural. Existen diferentes hipótesis en cuanto a cuál fue el periodo geológico que más influencia tuvo en la generación de la biodiversidad en el Neotrópico (Rull, 2008). Las fluctuaciones climáticas ocurridas durante el Cuaternario (período geológico que comenzó 2,58 millones de años (m.a.) atrás),

particularmente durante el Pleistoceno (2,58 – 0,012 m.a.), podrían constituir uno de los principales motores responsables de la actual estructura genética de las poblaciones (Haffer, 1969). La visión clásica propone que durante periodos fríos la biota se habría retraído hacia menores latitudes, permaneciendo en diferentes refugios o poblaciones aisladas y favoreciendo la divergencia genética en condiciones alopátricas; luego, durante periodos cálidos, se habría producido una recolonización hacia las zonas que antes eran poco favorables. Estudios recientes muestran que muchos de los patrones filogeográficos de diferentes especies terrestres y de agua dulce reflejan las consecuencias de una recolonización posterior al último máximo glacial hace aproximadamente 21.000 años (Hewitt, 2004). Sin embargo, nueva evidencia sugiere que la mayor cantidad de eventos de especiación en el Neotrópico habría ocurrido antes del Pleistoceno, durante el Neógeno (23 – 2,58 m.a.) (Moritz et al., 2000; Rull, 2008; Hoorn et al., 2010) y solo los clados más recientes dentro de las especies habrían divergido durante el Pleistoceno (Rull, 2011).

Combinar el análisis de ADN (ya sea mitocondrial como nuclear), con modelos de distribución de especies (modelados de nicho ecológicos (MNE)), resulta útil para inferir el pasado histórico de una especie. Los MNE constituyen una herramienta útil para analizar la distribución de una especie en la actualidad y los cambios en su rango de distribución durante las fluctuaciones climáticas del Cuaternario e identificar refugios pleistocénicos (ej. Werneck et al., 2011, 2012). Por otro lado, conociendo la tasa de sustitución nucleotídica del/los marcadores moleculares analizados, se puede calcular hace cuánto tiempo aproximadamente ocurrieron los distintos eventos de cladogénesis dentro de una genealogía, y relacionar esa datación con eventos geológicos conocidos (ej. Ribas et al., 2011).

Wasmannia auropunctata es una especie con una compleja estructura genética en su rango nativo (Foucaud et al., 2009), que habría sufrido una adaptación a climas más fríos en el límite sur de su distribución nativa (el sur de Sudamérica). Resulta interesante explorar el proceso de dispersión y diversificación de *W. auropunctata* dentro de su área de distribución natural que acompañó dicha adaptación. Si la especie es originalmente tropical, y posteriormente se adaptó a climas más fríos, se espera que los ancestros más antiguos se ubiquen en el trópico y los linajes más recientes en latitudes mayores. Si el clado A se ubica en Centroamérica y norte de Sudamérica, y el B en el centro y sur de Sudamérica, se espera que la historia filogeográfica de la especie refleje eventos de dispersión diferenciales para cada clado.

Asimismo, estudiar la filogeografía de *W. auropunctata* será de gran utilidad para futuros estudios comparativos que analicen esta región, debido a que existen pocos estudios filogeográficos en el Neotrópico (Beheregaray, 2008). En ese sentido, *W. auropunctata* constituye un buen modelo biológico para estudios filogeográficos en la región Neotropical ya que está ampliamente distribuida en toda esta región, y porque posee baja capacidad de dispersión, ya que su casta reproductiva no realiza vuelos nupciales, sino que los nidos se multiplican por brotación, facilitando así la preservación de huellas genéticas del pasado que pueden asociarse a cambios climáticos y/o eventos geológicos.

El objetivo del presente capítulo es investigar los procesos demográficos históricos que modelaron la distribución de *W. auropunctata* dentro de su área de distribución nativa utilizando marcadores de ADNmt y validando los resultados utilizando marcadores nucleares (microsatélites). Se analizará cómo ha cambiado el área de distribución geográfica de la especie en el tiempo evaluando si la introducción de *W. auropunctata* en la región Mediterránea se corresponde con su historia filogeográfica dentro de su área de distribución nativa. También se realizarán MNEs para estudiar las variables ambientales que definen la distribución de *W. auropunctata* en su área de distribución nativa y para determinar áreas centrales y marginales de distribución. Se evaluará si el territorio argentino fue colonizado por una expansión natural en una escala de tiempo evolutivo, o más recientemente facilitado por la actividad humana y su modificación del hábitat. También se investigará el potencial de *W. auropunctata* para extender su distribución a nuevas áreas subóptimas. Por último, se proyectarán los requerimientos de nicho ecológico actuales sobre capas climáticas del pasado (Último Máximo Glacial y Último Interglacial) con el fin de comprender cómo las fluctuaciones climáticas del Cuaternario pudieron haber influido en su estructura genética actual, y para detectar posibles refugios Pleistocénicos para esta especie.

Materiales y Métodos

Muestreo

El análisis molecular se centró en las poblaciones presentes en el sur de la distribución de la especie, abarcando parte de la distribución del clado A y prácticamente la distribución completa del

clado B. A partir de los muestreos realizados en el capítulo 2, en el centro y norte de Argentina, el sudeste de Paraguay, el sur de Bolivia, Uruguay y Brasil, se colectaron 10-30 obreras y 1-10 reinas (cuando presentes) a partir de 1-5 nidos en 94 localidades. Las muestras se conservaron en etanol al 96% para los posteriores análisis genéticos. También se analizaron muestras adicionales de obreras de la isla Dominica (Caribe) (col. Laura Varone) y de Guyana Francesa y noreste de Brasil (col. Olivier Rey). Los especímenes fueron depositados en el Laboratorio de Filogenias Moleculares y Filogeografía (EGE-FCEN-UBA).

Análisis de ADN mitocondrial

Secuenciación de ADN

Se extrajo el ADN genómico total de 154 individuos (una obrera/reina por nido) utilizando el kit de extracción *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). Se amplificó por medio de PCR un fragmento de 628 pares de bases del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) utilizando los *primers* universales para invertebrados LCO y HCO (Folmer et al., 1994). Cada reacción de PCR contuvo 50-100 ng de ADN (entre 1 y 5 μ l, dependiendo del extracto), 3 μ l $MgCl_2$ 3mM (Invitrogen), 5 μ l de *buffer* de PCR 1X, 0,2 μ l de Taq polimerasa (1 unidad) (Invitrogen), 0,1 mM de cada dNTP (Promega), 0,5 μ l de cada *primer* (10 μ M), y agua hasta completar un volumen final de 50 μ l. Los ciclos de PCR consistieron en una primera etapa de desnaturalización a 95°C por 3 minutos, seguido de 37 ciclos de 1) desnaturalización a 94°C por 1 minuto, 2) *annealing* a 48°C por 1 min y 3) extensión a 74°C por 1 minuto, y una extensión final a 74°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron revelados en gel de agarosa al 1% con Gel Red (Biotium, Hayward, CA, USA), purificados con el kit Bioneer (GenBiotech) y secuenciados en la Unidad de Secuenciación y Genotipificado de la FCEN-UBA, con un secuenciador automático 3130-XL (Applied Biosystems).

Las secuencias fueron alineadas y editadas utilizando ClustalW (Thompson *et al.* 1994) con el programa Bioedit v.7.2.3. Se corroboró que cada secuencia corresponda a una región codificante, sin *gaps* que alteren el marco de lectura, con el programa MEGA v.6 (Tamura et al., 2013). Todas las secuencias fueron finalmente depositadas en GenBank (ver Números de Acceso (NA) en la

Tabla S.5.1). De las 154 secuencias totales, 42 (AN: KR106381 - KR106422) fueron obtenidas en el CBGP por Olivier Rey utilizando la misma metodología antes descrita. Se utilizó a *Wasmannia rochai* como grupo externo (GenBank AN: EF459824).

Análisis filogenético basado en COI

Utilizando el programa DNAsp v.5.0 (Librado & Rozas, 2009) se identificaron distintos haplotipos y se calcularon sus respectivas frecuencias. Se infirieron sus relaciones genealógicas bajo un criterio de Máxima Parsimonia (MP) y un criterio probabilístico (Análisis Bayesiano (AB)). El análisis de MP se llevó a cabo con el programa TNT v.1.1 (Goloboff et al., 2008). El soporte de cada nodo se calculó por medio de remuestreo (*bootstrap*) realizando 1000 réplicas. El Análisis Bayesiano se realizó con el programa BEAST v.1.6.2 (Drummond & Rambaut, 2007; Heled & Drummond, 2010), el cual permite estimar el árbol filogenético más probable y los tiempos de divergencia de cada nodo, incluyendo la de los dos clados principales de *W. auropunctata*. Utilizando el programa jModelTest2 (Darriba et al., 2012) se infirió el mejor modelo de evolución para el conjunto de datos bajo el criterio Akaike (Akaike, 1973), el cual fue TrN+I+G (TrN significa que las bases nucleotídicas poseen distintas frecuencias, existe una sola tasa de transversión y dos tasas de transición: AG \neq CT (Tamura & Nei, 1993); +I significa que existe una proporción de sitios nucleotídicos que varían y +G significa que los sitios evolucionan con distinta tasa según una distribución gamma).

Para estimar las edades de los nodos se utilizó la tasa de sustitución nucleotídica de COI de 3.54 % My⁻¹ (Papadopoulou et al., 2010) ya que no se dispone de fósiles de *W. auropunctata* para calibrar la tasa de sustitución específica para la especie. Para establecer las relaciones entre los distintos haplotipos y analizar qué haplotipos son más recientes y cuáles más antiguos, se construyó una red de haplotipos utilizando el programa TCS v.1.21 (Clement et al., 2000) con una confianza del 95%. Esta red se construye a partir del árbol más parsimonioso y no posee raíz; los haplotipos se conectan con ramas cuyo largo es proporcional al número de mutaciones que los diferencian. Los haplotipos más antiguos se ubican hacia el interior de la red mientras que los que surgieron más recientemente se ubican hacia los extremos de la red.

Diversidad genética

Para cada haplogrupo identificado en la red de haplotipos se calculó el número de haplotipos (h), la diversidad haplotípica (H_d) y la diversidad nucleotídica (π) (Nei, 1987). Para evaluar la diversidad genética sobre el paisaje y detectar patrones de estructuración geográfica se mapearon las distancias genéticas, basadas en COI, de los distintos individuos, sobre el paisaje a través de un Análisis de Interpolación Espacial utilizando el programa Alleles in Space v.1.0 (AIS) (Miller, 2005). Si bien este análisis no posee una estadística asociada, el programa permite visualizar geográficamente la diversidad genética en especies que poseen una distribución continua y amplia, como es el caso de *W. auropunctata*, con la ventaja de que no requiere definir las poblaciones a priori.

A partir de una matriz de datos geográficos (latitud y longitud) de cada muestra, y otra matriz de datos genéticos (las secuencias de COI en este caso), el AIS se basa en la triangulación de Delaunay para construir una red de conectividad entre todas las localidades muestreadas, calcular las distancias genéticas entre las muestras e inferir las distancias genéticas en sitios no muestreados (para una mayor explicación ver Guzmán et al., 2012). Como resultado, el programa genera un gráfico tridimensional, cuyos ejes “x” e “y” corresponden a las coordenadas geográficas entre las muestras, y el eje “z” corresponde a las distancias genéticas interpoladas y representadas en función de su peso relativo (*height*). De esta manera se representan los patrones de diversidad genética a través del paisaje muestreado con picos en áreas de alta diversidad (alta distancia genética entre individuos) y valles en áreas de baja diversidad. Para eliminar el efecto de aislamiento por distancia, se utilizaron las distancias genéticas residuales. Para el área total cubierta (2.204 km²), las dimensiones de la grilla fueron de 89 × 24 y un valor de peso de distancia (*distance weight value*) de 0,5. Para visualizar el gráfico tridimensional sobre el paisaje se importó el archivo de salida (GLS) en el programa DIVA-GIS v.7.1.7 (Hijmans et al., 2004), creando un mapa bidimensional cuyos colores corresponden a las distancias genéticas (*heights*) entre los puntos.

Historia demográfica

Los cambios históricos en el tamaño poblacional de una especie pueden dejar huellas en el ADN que pueden ser detectadas al analizar secuencias de genes que posean una tasa de sustitución

nucleotídica apropiada, como es el caso del ADNmt (Tajima, 1989; Slatkin & Hudson, 1991). Para analizar si los distintos haplogrupos de *W. auropunctata* sufrieron expansiones poblacionales recientes se calcularon los estadísticos D de Tajima (D_T ; Tajima, 1989) y F_S de Fu (Fu, 1997) utilizando el programa DNAsp v.5.0 (Librado & Rozas 2009). Ambos estadísticos evalúan desvíos de la neutralidad o de tamaños poblacionales constantes. El D_T compara diferencias entre θ_w (número de sitios segregantes) y π (promedio de diferencias nucleotídicas). Bajo neutralidad se espera que ambos estimadores sean iguales y por lo tanto la diferencia entre ellos sea igual a cero. Por el contrario valores negativos de D_T sugieren que las poblaciones han atravesado una expansión poblacional, cuello de botella o que la región génica presenta huellas de barridos selectivos. Así mismo, valores positivos sugieren que pudo haber actuado la selección equilibradora o que existe estructuración poblacional. El test de Fu se basa en la probabilidad de observar no menos de k haplotipos en una muestra de n secuencias dado un cierto valor de θ , calculado a través de π . F_S tiende a ser negativo cuando hay un exceso de mutaciones recientes que generan alelos raros. Los alelos raros pueden ser producto de expansiones recientes. El test de Fu es más poderoso que el D_T para casos de expansión poblacional (Fu 1997). La significación de estos estadísticos se evaluó a través de simulaciones de coalescencia basadas en cadenas de Markov de Montecarlo (MCMC), realizando 10.000 réplicas (Hudson, 1990) y asumiendo que no hay recombinación en los datos (situación común en genes mitocondriales).

Asimismo se analizaron posibles cambios en el tamaño poblacional efectivo en el clado B a través del análisis Bayesian Skyline Plot (BSP, Drummond et al., 2005) utilizando BEAST v1.6.2 (Drummond & Rambaut, 2007). Se realizaron 100 millones de generaciones de MCMC, muestreando cada 1000 árboles, asumiendo reloj molecular estricto (por tratarse de un estudio intraespecífico) y con el modelo de sustitución nucleotídica inferido con jModelTest v2.1.4 (Darriba et al., 2012). Utilizando TRACER (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) se corroboró que el tamaño muestral efectivo (ESS) de cada parámetro alcanzara valores mayores a 200 y se descartaron los primeros árboles correspondientes al período de *burn-in* (10% de los árboles). Luego se utilizó el mismo programa para realizar el BSP.

Análisis Filogeográfico Bayesiano Continuo

Con el objetivo de inferir el origen temporal y espacial de *W. auropunctata* y explorar su patrón de expansión y diversificación en su rango nativo, se realizó un análisis filogeográfico bayesiano continuo. Este método considera a las localidades donde la especie está presente como estados discretos y reconstruye los estados ancestrales sobre una filogenia enraizada y calibrada temporalmente, a través de un marco estadístico Bayesiano (Lemey et al., 2010). Constituye un método probabilístico y como tal, presenta la gran ventaja de basarse en un modelo de evolución explícito, permitiendo vislumbrar la historia completa de la evolución de los caracteres (ya sea moleculares o de distribución geográfica). Al calcular la probabilidad de cada estado ancestral también incorpora las diferencias en longitudes de ramas en los nodos terminales de la filogenia. Esta aproximación bayesiana integra en un único modelo las localidades espaciales y un conjunto de secuencias alineadas, coleccionadas en distintos individuos. El modelo incorpora incertidumbre en la topología de la filogenia y en el proceso de sustitución nucleotídica que dio lugar a ese alineamiento de secuencias para reconstruir intervalos de confianza que representan la ubicación espacial y temporal de los nodos ancestrales. El modelo probabilístico emplea el método de “caminatas aleatorias en tiempo continuo de difusión espacial” para calcular las probabilidades de ubicación espacial de los nodos internos y así ubicar con alta probabilidad el lugar geográfico donde se habría encontrado t generaciones atrás un ancestro cualquiera de la filogenia.

Utilizando el programa Beauti del paquete BEAST (disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk>) se generó la matriz de entrada y se especificaron los parámetros para la posterior corrida del BEAST (Drummond et al., 2012). Se utilizó la opción *jitter* con un parámetro de 0,001 para variar ligeramente las coordenadas idénticas y evitar así su superposición. Se utilizó el modelo de evolución molecular TrN+I+G, inferido con el jModelTest2 (Darriba et al., 2012) y reloj molecular estricto. Se realizaron 6 corridas independientes de MCMC, cada una de 200 millones de generaciones, guardando los resultados cada 1000 árboles utilizando el BEAST v.1.7.5 (Drummond et al., 2012). La convergencia de las cadenas fue evaluada con el programa TRACER, con el cual se corroboró que todos los parámetros representen correctamente la distribución posterior, buscando que todos posean ESS (*Effective Sample Size*) > 200 . Se descartó el primer 10% de los árboles (20 millones de iteraciones) correspondiente al período *burn-in*. Se combinaron las 6 corridas utilizando el programa LogCombiner v.1.7.5 y finalmente se estimó la filogenia más probable para el grupo de

datos (*Maximum Clade Credibility (MCC) tree*) utilizando el programa TreeAnnotator v.1.7.5 (Heled & Drummond, 2008). Para estimar la edad de cada nodo de la filogenia se utilizó la tasa de sustitución nucleotídica de $3,54 \% \text{ My}^{-1}$ (Papadopoulou et al., 2010). Con el fin de visualizar más fácilmente el patrón de dispersión de *W. auropunctata* en el espacio, el árbol MCC fue proyectado sobre una grilla de coordenadas geográficas utilizando el programa PhyloWood (Landis & Bedford, 2014) disponible online (<http://mlandis.github.io/phyloWood/>).

Análisis de marcadores nucleares

Para corroborar si la información nuclear apoya los resultados obtenidos a partir del ADNmt, se amplificaron por PCR dos genes nucleares: *Wingless* y Factor de Elongación 1α (ver *primers* y condiciones de amplificación en la Tabla S.5.2). Debido a que estos genes no presentaron suficiente variabilidad (resultados no presentados) se procedió a utilizar marcadores microsatélites.

Se analizó una matriz de microsatélites de 151 individuos (111 obreras y 40 reinas) distribuidos en Argentina, Brasil, Guyana Francesa y Costa Rica, donada por Olivier Rey. Del total de individuos, 68 pertenecen al clado A y 83 al clado B. Para evitar cualquier efecto de la estructura del nido/colonia en los resultados, sólo se utilizaron dos obreras y una reina por nido en las colonias clonales y dos obreras y dos reinas por nido si las colonias eran sexuales. Los genotipos multilocus se obtuvieron por medio de la amplificación por PCR de 12 loci microsatélites cuyos *primers* y protocolo de amplificación *multiplex* fue diseñado por Fournier et al. (2005b) (ver capítulo 3). La matriz de microsatélites utilizada se encuentra disponible en la tabla S.5.3.

Se empleó el método de agrupamiento Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000) para analizar cómo se agrupan sucesivamente los individuos cuando el número de grupos genéticos predeterminados (K) se incrementa de 1 a 18. Si los dos clados principales (A y B) no son un artefacto, producto de analizar solamente el ADNmt, se espera que para $K = 2$ se recuperen ambos clados y por lo tanto que el agrupamiento coincida con el obtenido a través del ADNmt. Para valores superiores de K, también se evaluó si el agrupamiento coincide con la clasificación de haplogrupos basados en el ADNmt. Todas las corridas involucraron 3 millones de generaciones de MCMC, con un período de *burn-in* de 50.000 generaciones, usando el modelo de mezcla y de correlación de frecuencias alélicas descrito por Falush et al. (2003). Se

realizaron 3 corridas independientes para cada valor de K. El valor de K que mejor se ajustó a nuestros datos se evaluó mediante el cálculo del valor de Delta K (Evanno et al., 2005), utilizando el Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012), disponible online.

Vale la pena señalar que el análisis de STRUCTURE sólo puede aplicarse a poblaciones sexuales, ya que uno de sus supuestos principales es el de panmixia (apareamiento aleatorio entre los individuos de la población). Es por esta limitación que nuestro objetivo no es definir el número de poblaciones actuales basado en las frecuencias alélicas, sino que se utilizó este programa como herramienta para analizar patrones generales de estructuración y estudiar la evolución del parámetro K basado en el flujo génico histórico. Aunque nuestro conjunto de datos se compone principalmente de poblaciones clonales (ver capítulo 3), existe evidencia de que estas habrían surgido recientemente de poblaciones sexuales locales (Foucaud et al., 2007), por lo que los genotipos clonales probablemente reflejan genotipos sexuales pasados. Además, como se vio en el capítulo 3, los eventos de reproducción sexual que originan nuevos linajes clonales son muy comunes en el rango nativo de *W. auropunctata*. Si bien existen otros análisis de agrupamiento que no asumen panmixia, se decidió utilizar el STRUCTURE de todas maneras ya que es el único que permite analizar la estructuración de las poblaciones de una manera histórico-evolutiva.

Distribución de Wasmannia auropunctata durante el Cuaternario

Para estimar la distribución de *W. auropunctata* a lo largo de las fluctuaciones climáticas del Cuaternario se realizaron modelados de nicho ecológico (MNE) a través del método de máxima entropía implementado en MAXENT v.3.3.3 (Phillips et al., 2006). Este programa utiliza datos de presencia de la especie junto con datos ambientales (de temperatura y precipitaciones) para estimar la probabilidad de presencia en diferentes sitios.

Aunque se reconoce que la distribución de una especie depende de procesos biológicos más complejos, tales como factores bióticos -como las interacciones con otras especies-, su historia de dispersión y la heterogeneidad de recursos (Fitzpatrick et al., 2007), la utilidad de estos modelos depende de un uso apropiado de los mismos (Araújo & Peterson, 2012). De hecho, el MNE representa una herramienta potencialmente poderosa para comprender el área de distribución y la

ecología de las especies. Se sabe también que la distribución de las hormigas está limitada en gran parte por el clima (Roura-Pascual et al., 2011), por lo tanto el MNE puede proporcionar una primera aproximación útil para explorar la distribución de *W. auropunctata* dentro de su área de distribución nativa.

Las variables climáticas presentes y pasadas fueron obtenidas de WorldClim (Hijmans et al., 2005). Las variables climáticas correspondientes al Último Máximo Glacial (LGM por sus siglas en inglés), ocurrido 21 mil años atrás, se obtuvieron del Paleoclimate Modeling Intercomparison Project Phase II y las correspondientes al Último Interglacial (LIG por sus siglas en inglés), ocurrido 120 mil años atrás, se obtuvieron de Otto-Bliesner et al. (2006). El Holoceno (6 mil años atrás) no fue analizado ya que estudios anteriores, realizados con otras especies, no mostraron diferencias en la distribución entre este periodo y el presente (Werneck et al., 2011, 2012). Todas las variables bioclimáticas disponibles (Tabla S.5.4) fueron sometidas a un test de multicolinealidad para eliminar del análisis las variables que estén correlacionadas entre sí, examinadas a través del coeficiente de correlación de Pearson (r). Se seleccionaron las siguientes 11 variables: temperatura media anual, rango medio diurno, isothermalidad, temperatura máxima del mes más cálido, temperatura mínima del mes más frío, rango anual de temperatura, temperatura media del trimestre más húmedo, temperatura media del trimestre más seco, precipitación anual, precipitación del mes más húmedo y precipitación del trimestre más seco. La resolución de las variables bioclimáticas actuales y del LIG fue de 30 arc-segundos ($\sim 1 \text{ km}^2$), mientras que la del LGM fue de 2,5 arc-minutos ($\sim 4,6 \text{ km}^2$).

Con el objetivo de evaluar posibles diferencias en los nichos ecológicos entre el clado A y el B, se aplicó el MNE a dos conjuntos de datos distintos: a) todas las ocurrencias de *W. auropunctata* del rango nativo (excluyendo todas las regiones donde la especie es introducida) y b) solo las ocurrencias de poblaciones nativas del clado B. Esta información incluyó los registros de nuestros muestreos y registros obtenidos de AntWeb, una base de datos mundial de hormigas (<http://www.antweb.org/bigMap.do?taxonName=myrmicinaeWasmannia%20auropunctata&project=allantwebants>). Es importante aclarar que para poder realizar esta diferenciación en el análisis de los datos, es necesario conocer a qué clado pertenece cada población y debido a que nuestros análisis se centraron en las poblaciones del límite sur de distribución de la especie (pertenecientes

mayormente al clado B), no se contó con suficientes poblaciones del clado A para poder realizar el modelado solo con este clado.

Se utilizó el valor *default* de umbral de convergencia (10^{-5}) con un máximo de 1000 iteraciones en cada corrida. En cada corrida el programa elige aleatoriamente el 75% de los puntos de presencia para entrenar el modelo, y el 25% para ponerlo a prueba. Para evaluar el modelo y estimar su capacidad de predicción se analizó el área bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (AUC), la cual es una salida gráfica del programa, que muestra la capacidad de discriminación de una presencia (sensitividad) versus la capacidad de discriminación de una ausencia (especificidad) (Phillips & Dudik, 2008; Swets, 1988). Los valores de AUC pueden variar entre 0,5 (exactitud dada por azar) a un valor máximo de 1 (discriminación perfecta). El uso del AUC es una buena herramienta para evaluar la contribución de las variables para el MNE (Elith et al., 2006). Finalmente se obtuvo un mapa de América en el que distintos colores representan la probabilidad de ocurrencia de la especie, desde azul, que corresponde a una baja probabilidad de ocurrencia (sitios con las condiciones menos adecuadas para la especie), hasta rojo para los sitios de mayor probabilidad de ocurrencia (sitios que reúnen las condiciones más favorables para la supervivencia de la especie). Se realizó el mismo procedimiento para las proyecciones de los tres períodos (actual, LGM y LIG).

Resultados

Análisis filogenético basado en ADNmt

Las 154 secuencias de COI analizadas contuvieron 510 caracteres constantes, 118 polimórficos y 100 informativos para el criterio de parsimonia. Se identificaron 53 haplotipos (Tabla S.5.5). El análisis de MP dio como resultado 20 árboles igualmente parsimoniosos de 373 pasos (Figura 5.1) mientras que el AB recuperó un árbol con topología similar que el consenso estricto de MP (Figura 5.2).

Tanto en el análisis por MP como en el AB se recuperaron los dos principales clados A y B de *W. auropunctata*, con alto soporte (alto valor de bootstrap y alta probabilidad posterior). Esto coincide con los clados propuestos por Mikheyev & Mueller (2007). Según ambos árboles y la red

de haplotipos obtenida con el TCS (Figura 5.3), dentro del clado A se pueden definir dos subclados o haplogrupos (grupos monofiléticos de haplotipos con una alta probabilidad posterior según el análisis Bayesiano): A-I y A-II; mientras que dentro del clado B se pueden definir 8 haplogrupos: B-I a B-VIII. Aunque la distribución de ambos clados se superpone, el clado A está distribuido principalmente en Centroamérica y el norte de Sudamérica, hasta los 26°S en la localidad de San Francisco do Sul, en Brasil (Figura 5.4 y Tabla S.5.5), y el clado B se distribuye principalmente en el sur de Sudamérica, aunque, según nuestro muestreo, también se encontraron poblaciones de este clado en Amazonas, hasta los 3,4° N en la localidad de Maracá, en Brasil. El clado B es el único que llega a Argentina, y se extiende hasta una latitud de 34,5° en la localidad de Lozano, en la provincia de Buenos Aires.

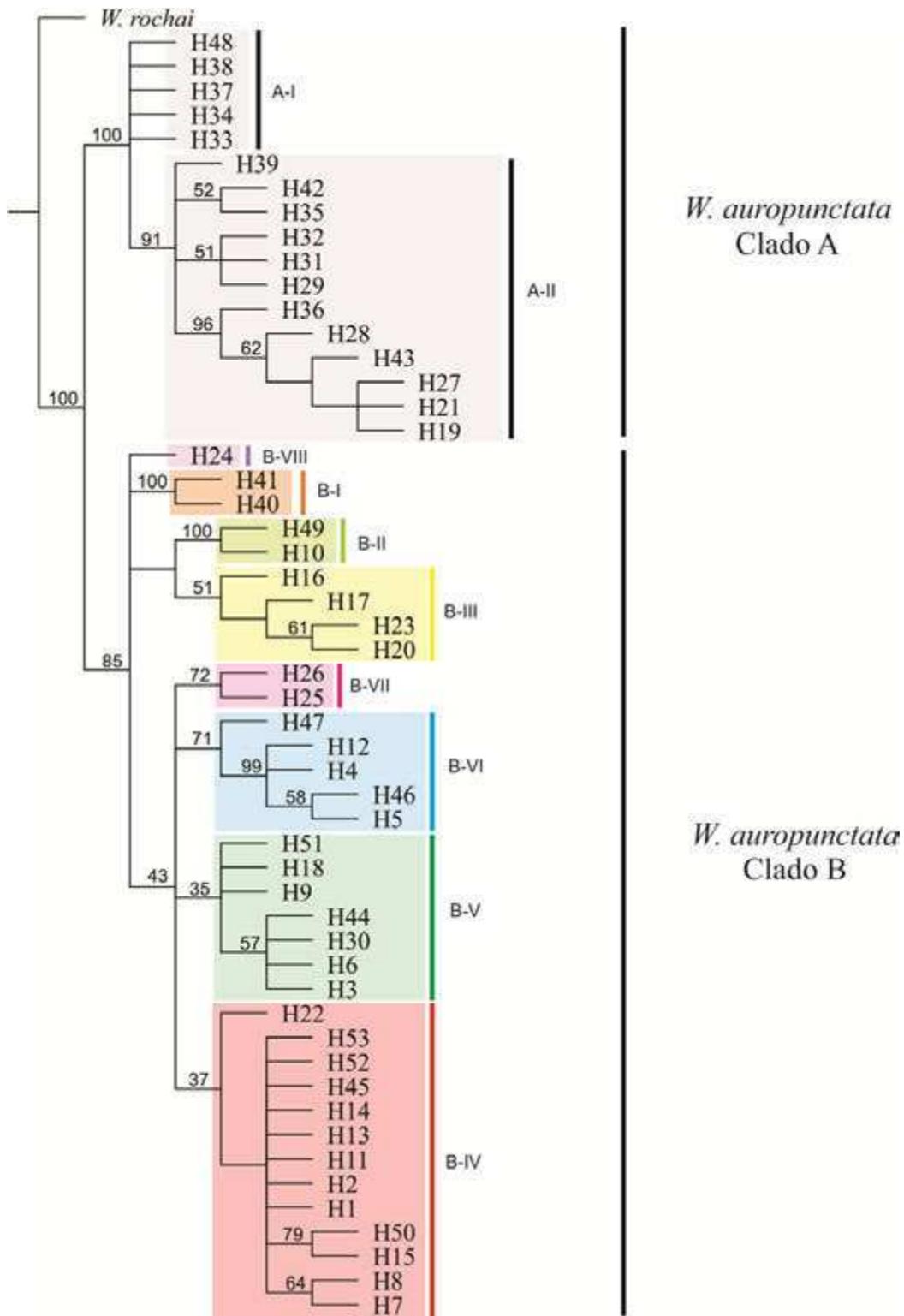


Figura 5.1. Consenso estricto obtenido a partir de 20 árboles igualmente parsimoniosos, de 373 pasos de longitud, basado en los 53 haplotipos de COI. Los clados con mayor soporte de nodos se indican con valores de bootstrap mayores a 50 en cada nodo. Cada cuadro de color define distintos haplogrupos, consistentes con el Análisis Bayesiano.

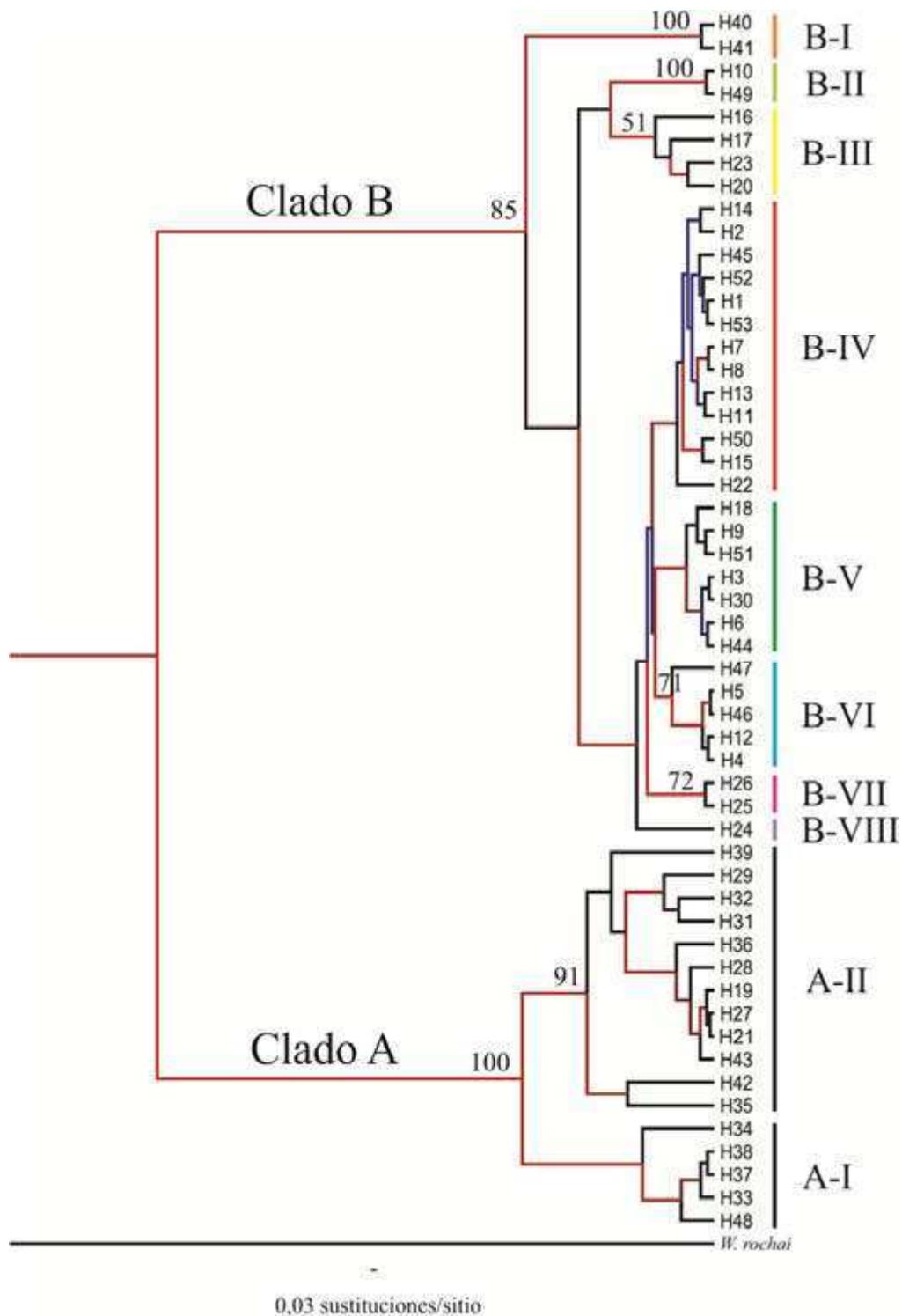


Figura 5.2. Filogenia más probable obtenida en el Análisis Bayesiano, basada en los 53 haplotipos de COI. El color de las ramas representa la probabilidad posterior de cada clado y subclado (o haplogrupo), en un gradiente que va desde rojo (alta probabilidad) hasta azul (baja probabilidad). Los valores de Bootstrap mayores a 50 se muestran por encima de los nodos. El nodo del grupo externo se cortó de la figura para visualizar más claramente los terminales.

Dentro del clado A, el haplogrupo A-II fue más común y se encontró más extensamente distribuido que el A-I. El primero incluye individuos de los estados de Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro y Bahía en Brasil, el estado de Cordillera en el sur de Paraguay, el estado de Santa Cruz de la Sierra en Bolivia, Guyana Francesa y Dominica. El haplogrupo A-I solo estuvo presente, según nuestros datos, en Guyana Francesa y Amazonia (Figura 5.4).

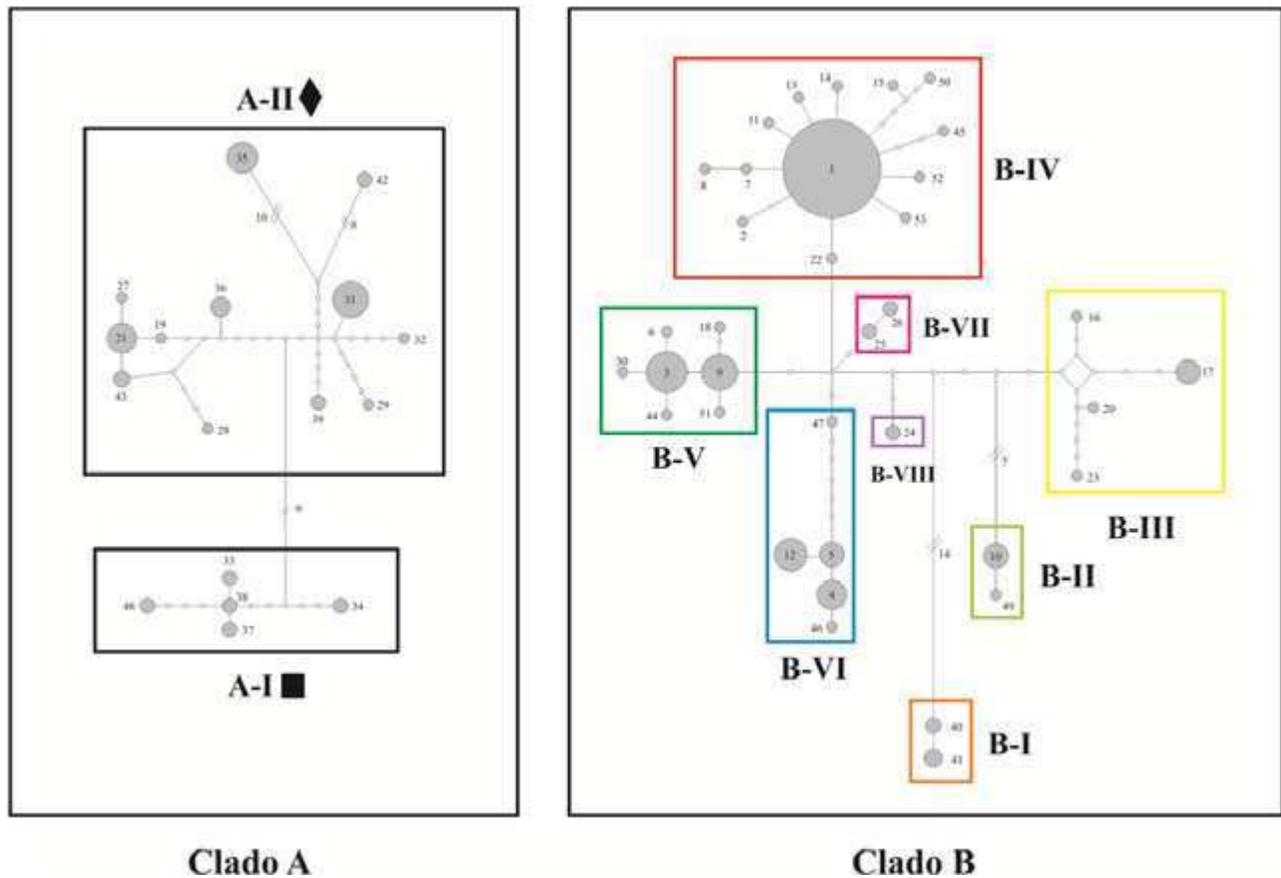


Figura 5.3. Red de haplotipos construida con TCS v.1.21. Cada círculo gris representa un haplotipo. El número al costado de cada haplotipo corresponde a su identidad, según se indica en la tabla S.5.5. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Cada círculo blanco más pequeño representa un paso mutacional. Cada rectángulo (cuyo color se corresponde con las figuras 5.1, 5.2 y 5.4) representa un haplogrupo.

Dentro del clado B, el haplogrupo B-I se encuentra en el noreste de Brasil (Bahía) y emerge basalmente con respecto al resto de los haplogrupos de este clado; los haplogrupos B-III, B-VII y

B-VIII se localizan en el sur de Brasil (aunque B-VII también está presente en el este de Bolivia), B-II incluye individuos del sudeste de Paraguay y el centro de Argentina, B-IV está presente en hábitats antrópicos del centro y noroeste argentino y en el sur de Uruguay, aunque sorpresivamente también se encontraron individuos de este haplogrupo en el norte de Brasil (Viruá, Maracá y Ducke, en Amazonia), todos pertenecientes al haplotipo 1 (H1). B-V está presente principalmente en hábitats naturales del noreste argentino y sudeste paraguayo, aunque también incluye individuos del Bosque Atlántico en el estado brasilero de Santa Catarina y de ambientes antrópicos del noroeste argentino. Por último, B-VI se encuentra principalmente en planicies de inundación del noreste argentino, aunque también hay individuos de este haplogrupo en hábitats antrópicos del centro y noroeste de Argentina (Figura 5.4). Es interesante que el haplotipo más basal de este último haplogrupo fue colectado en Amazonia (H47, Manaquiri, Figura 5.4 y Tabla S.5.5).

Todas las poblaciones de *W. auropunctata* presentes en Argentina pertenecen al clado B, indicando que solo este clado pudo colonizar las latitudes más altas hacia el sur de su rango nativo.

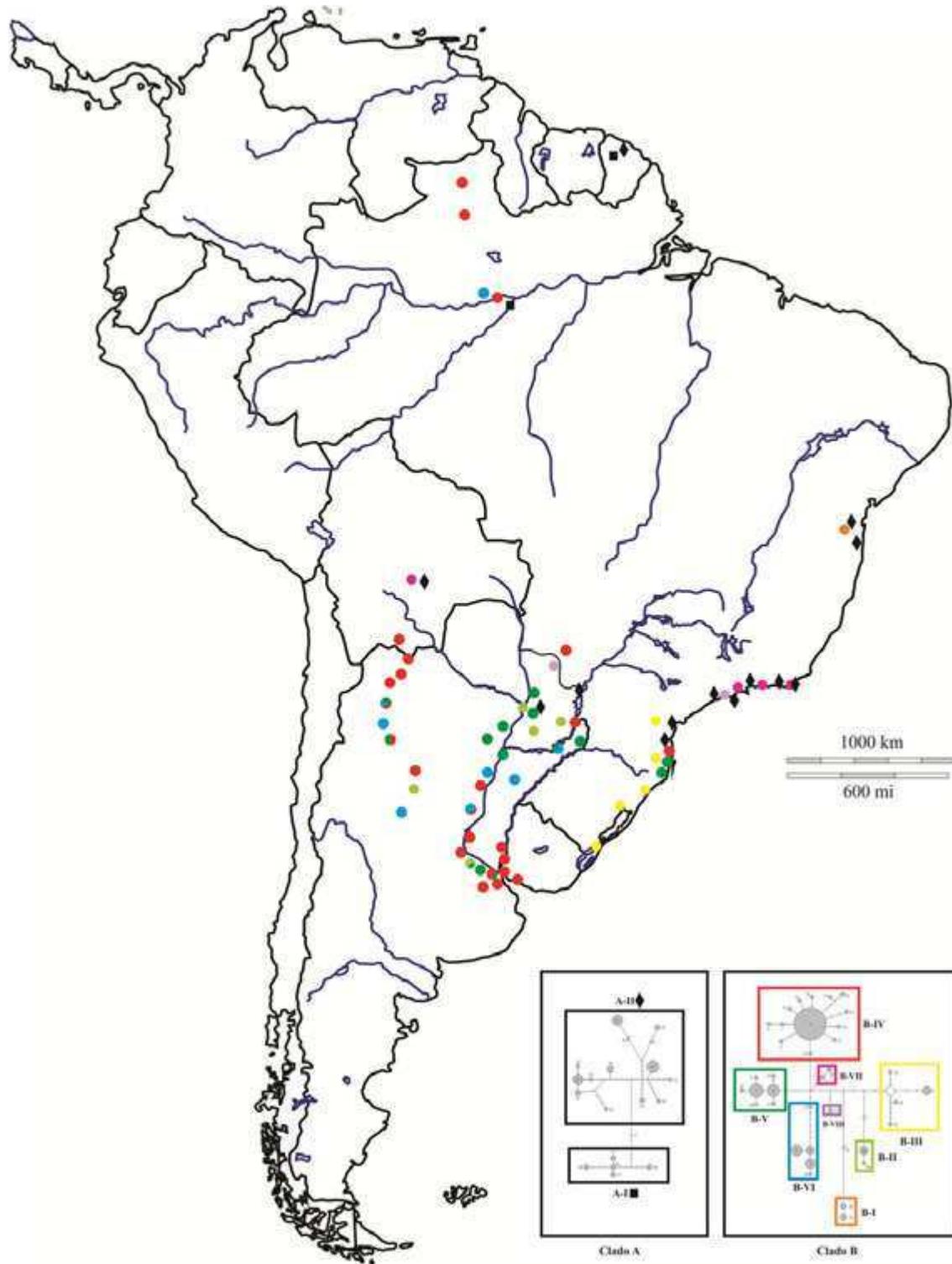


Figura 5.4. Distribución de los haplogrupos definidos en el Análisis Bayesiano. Cada símbolo representa una localidad o localidades vecinas muy cercanas. Los círculos representan los haplogrupos del clado B, los cuadrados el haplogrupo A-I y los rombos el A-II. Los colores corresponden al haplogrupo al que pertenece dicha población o individuo.

Diversidad genética

Considerando todo el conjunto de datos (las 154 secuencias), la diversidad haplotípica (H_d) fue 0,91 y la diversidad nucleotídica (π) fue 0,03. La diversidad nucleotídica del clado A fue dos veces mayor que la del clado B (Tabla 5.2) y la diversidad haplotípica ligeramente superior, a pesar de estar menos representado en nuestro muestreo. Dentro del clado A, el haplogrupo A-II presentó mayor diversidad nucleotídica que el A-I a pesar de tener menor diversidad haplotípica. Dentro del clado B, el haplogrupo con la mayor diversidad genética fue el B-III, el cual es endémico de la Mata Atlántica. El haplogrupo B-VI también exhibió una alta diversidad genética, pero esto puede ser explicado por la relativamente alta distancia genética entre el haplotipo 47, presente en Amazonas, y el resto de los haplotipos presentes en Argentina (H4, 5, 12, y 46) (Figura 5.3 y 5.4; Tabla S.5.5). El resto de los haplogrupos presentó valores de diversidad genética bajos.

Tabla 5.2. Índices de diversidad genética: número de muestras (N), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (H_d) y diversidad nucleotídica (π) calculados para todo el conjunto de datos, para los clados A y B y para los haplogrupos identificados por el Análisis Bayesiano y la red de haplotipos. Los estadísticos F_s de F_u y D de Tajima (D_T) se calcularon solo para los haplogrupos con más de 4 haplotipos.

| Haplogrupo | N | h | H_d | π | F_s de F_u | D_T |
|------------|-----|----|-------|---------|----------------|-------------|
| Clado A | 31 | 17 | 0,923 | 0,02232 | 0,127 | -0,19001 |
| A-I | 5 | 5 | 1 | 0,00796 | -1,345 | -0,95426 |
| A-II | 26 | 12 | 0,889 | 0,01869 | 1,839 | -0,09986 |
| Clado B | 123 | 36 | 0,868 | 0,01165 | -8,288 | -1,21548 |
| B-I | 2 | 2 | 1 | 0,00318 | - | - |
| B-II | 6 | 2 | 0,333 | 0,00053 | - | - |
| B-III | 6 | 4 | 0,8 | 0,00881 | 1,373 | -0,17192 |
| B-IV | 58 | 13 | 0,498 | 0,00134 | -10,945** | -2,34948 ** |
| B-V | 27 | 7 | 0,687 | 0,00153 | -3,069* | -1,42429 |
| B-VI | 18 | 5 | 0,765 | 0,00279 | 0,165 | -1,17143 |
| B-VII | 4 | 2 | 0,667 | 0,00106 | - | - |
| B-VIII | 2 | 1 | 0 | 0 | - | - |
| Total | 154 | 53 | 0,913 | 0,03288 | -2,746 | 0,0574 |

* $P < 0,05$; ** $P < 0,0001$

El patrón de diversidad genética en el paisaje obtenido por medio del Análisis de Interpolación Espacial mostró que, dentro del área geográfica analizada, la diversidad genética de

W. auropunctata es mayor a lo largo del Bosque Atlántico y el norte de Sudamérica (zona azul), y menor en el centro de Sudamérica y norte de Argentina (zona amarilla), aunque hay una pequeña zona de alta diversidad genética en el noroeste de Argentina (Figura 5.5a). Solo considerando el clado B, la diversidad genética es mayor en el norte de Argentina, Paraguay y el Bosque Atlántico y menor en el centro de Sudamérica y centro de Argentina (Figura 5.5b).

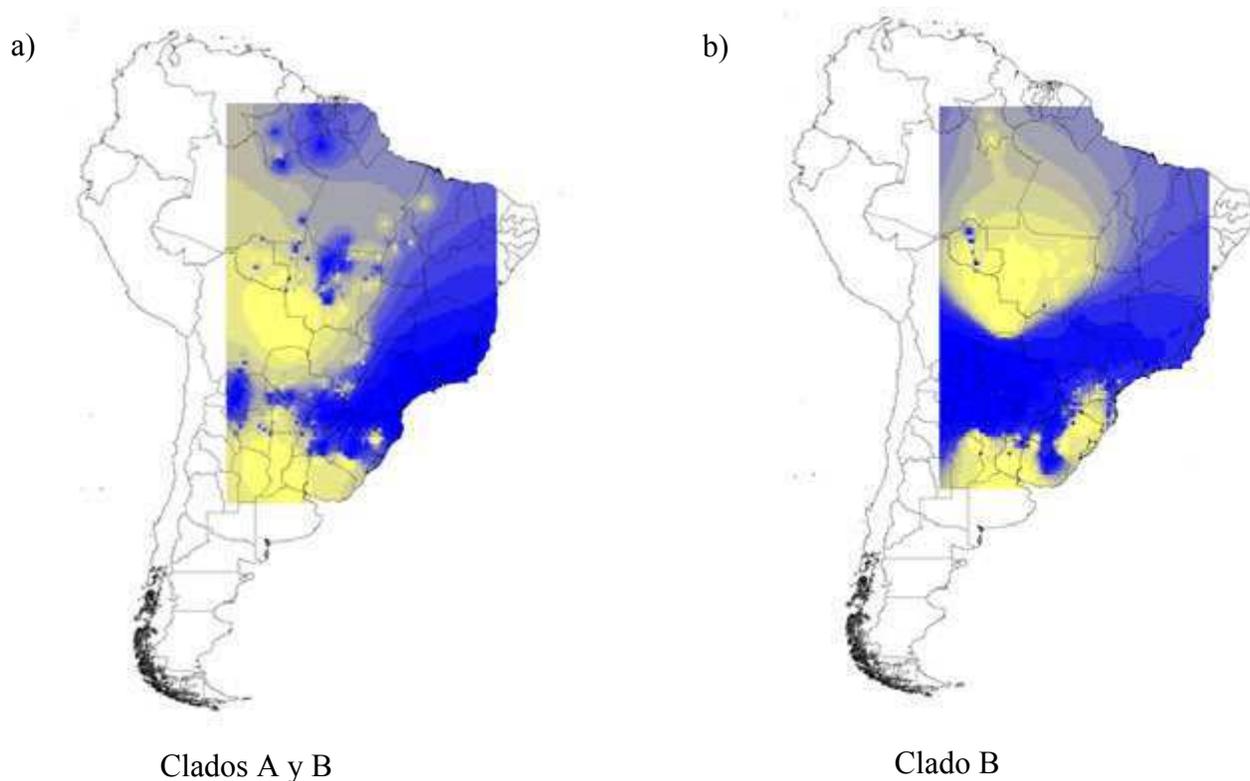


Figura 5.5. Resultado de la Interpolación Espacial. Las áreas azules muestran regiones de alta diversidad genética y las áreas amarillas indican menor diversidad genética. a) La distribución de la diversidad genética considerando todo el conjunto de datos, es decir ambos clados A y B; b) considerando sólo el clado B.

Historia demográfica

Dos de los diez haplogrupos definidos previamente presentaron signos de expansión poblacional: los haplogrupos B-IV y B-V (Tabla 5.2). El haplogrupo B-IV mostró la evidencia más fuerte de expansión (D_T y F_S de F_u negativos y significativos), lo que es congruente con su

configuración, con un haplotipo central y frecuente (H1) y muchos haplotipos menos frecuentes derivados del mismo por una o muy pocas mutaciones (Figura 5.3). Por su parte, el haplogrupo B-V está constituido por dos haplotipos frecuentes (H4 y H5), diferenciados en un solo paso mutacional, y pocos haplotipos recientemente derivados en bajas frecuencias, lo cual se corresponde con un signo demográfico más débil (Ambos estadísticos fueron negativos pero solo el F_S de F_u resultó significativo). Debido a que la mayoría de nuestras muestras pertenecen al clado B y teniendo en cuenta los resultados de las pruebas de neutralidad, que sólo detectan desviaciones de la neutralidad en este clado, el BSP se realizó también sólo en este clado. El mejor modelo de sustitución nucleotídica para este subgrupo de datos fue HKY + I (HKY significa que las bases nucleotídicas poseen distintas frecuencias y que existe una sola tasa de transversión y una de transición (Hasegawa et al., 1985)). El BSP sugirió un tamaño poblacional constante a través del tiempo, seguido de un ligero descenso y luego un crecimiento demográfico que parece continuar en la actualidad (Figura 5.6). Mediante la aplicación de la tasa de divergencia nucleotídica para el gen COI de 3,54% por millón de años (Papadopoulou et al., 2010), se estimó que el comienzo de la expansión habría ocurrido hace aproximadamente 28.000 años.

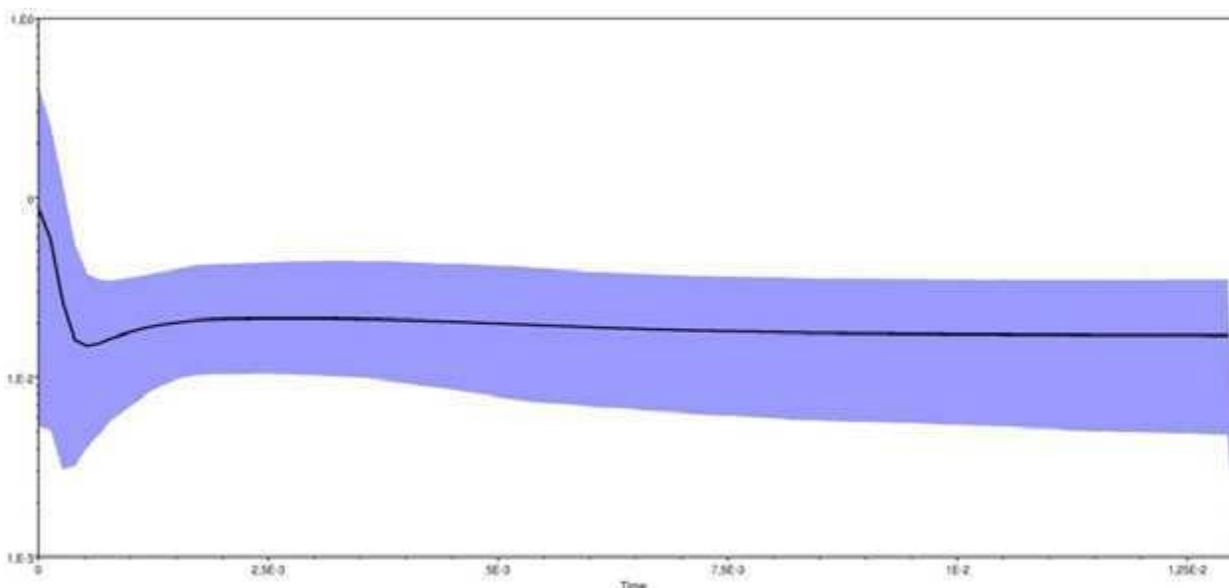


Figura 5.6. Estimación de las fluctuaciones del tamaño poblacional histórico del clado B de *Wasmannia auropunctata* obtenido por medio del Bayesian Skyline Plot. La línea continua representa la estimación de la mediana del tamaño poblacional y el área azul muestra los límites de densidad posterior mayores al 95%. El eje “y” muestra el tamaño poblacional y el eje “x” representa el número de sustituciones por sitio.

Análisis Filogeográfico Bayesiano

Una animación de la dispersión y diversificación de *W. auropunctata* desde su origen hasta la actualidad puede visualizarse en el siguiente link: <http://mlandis.github.io/phylowood/> abriendo la matriz txt del Apéndice S.3.1, disponible online como información suplementaria de Chifflet et al. (2016) o en <https://sites.google.com/site/ecologiaygenetica/inicio/material-didactico>). El análisis filogeográfico bayesiano infiere que el ancestro común de los dos clados principales de *W. auropunctata* habría existido con mayor probabilidad en el centro de Brasil, más precisamente en el estado de Tocantins, hace aproximadamente 3,92 millones de años (m.a.), con un 95% de confianza (HPD) entre 2,67 y 5,19 m.a. (Figura 5.7). El ancestro común de ambos clados se simboliza con la estrella roja de la figura 5.8a. Un evento de dispersión desde esta zona se habría producido entre 3,92 y 1,26 m.a. hacia el norte de Brasil llegando a la Selva Amazónica, y hacia el sur de Brasil alcanzando la cuenca del Plata y el Bosque Atlántico, dando lugar a los clados A y B, respectivamente (Figura 5.7 y 5.8a). El ancestro común del clado A se ubicó con mayor probabilidad en el estado de Pará, en el este de Brasil y habría surgido hace aproximadamente 1.26 m.a. (95% HPD: 0,84-1,66 m.a.). Luego, se habrían producido eventos de diferenciación genética y dispersión en varias áreas adyacentes a través de las cuencas del río Amazonas y del río San Francisco. El ancestro común del clado B se habría ubicado hacia el sur del ancestro del clado A, con mayor probabilidad en el noroeste del estado de Sao Paulo en Brasil, hace aproximadamente 1,22 m.a. (95% HPD: 0.73 -1.69 m.a.). Un evento de dispersión de este clado habría ocurrido hacia el sur de este país seguido de diversificación y diferenciación genética en múltiples áreas adyacentes: este de Brasil (haplogrupo B-I) y sur de Sudamérica como Argentina, Uruguay, Bolivia y Paraguay (haplogrupos B-II - BVIII) (Figura 5.7 y 5.8b-e). Vale la pena aclarar que existe una gran incertidumbre sobre la ubicación de los ancestros de cada clado, representado por las áreas dentro de las líneas punteadas de la figura 5.8a.

El análisis filogeográfico Bayesiano sugiere que un proceso de contacto secundario entre ambos clados comenzó a ocurrir hace 0,38 - 0,16 m.a. (Figura 5.8d-e.), en al menos cuatro regiones dentro del área de distribución nativa de la especie: noreste de Brasil (Bahía), sur de Brasil (Bosques costeros de la Serra do Mar, Mata Atlántica), Bolivia (Bosque Montano) y Paraguay (Bosque Atlántico semideciduo). Se registraron dos eventos de retromigración desde el sur de

Sudamérica hacia el norte de Brasil (Amazonas), correspondientes a los haplotipos H1 (haplogrupo B-IV) y H47 (haplogrupo B-VI) (Figura 5.8e).

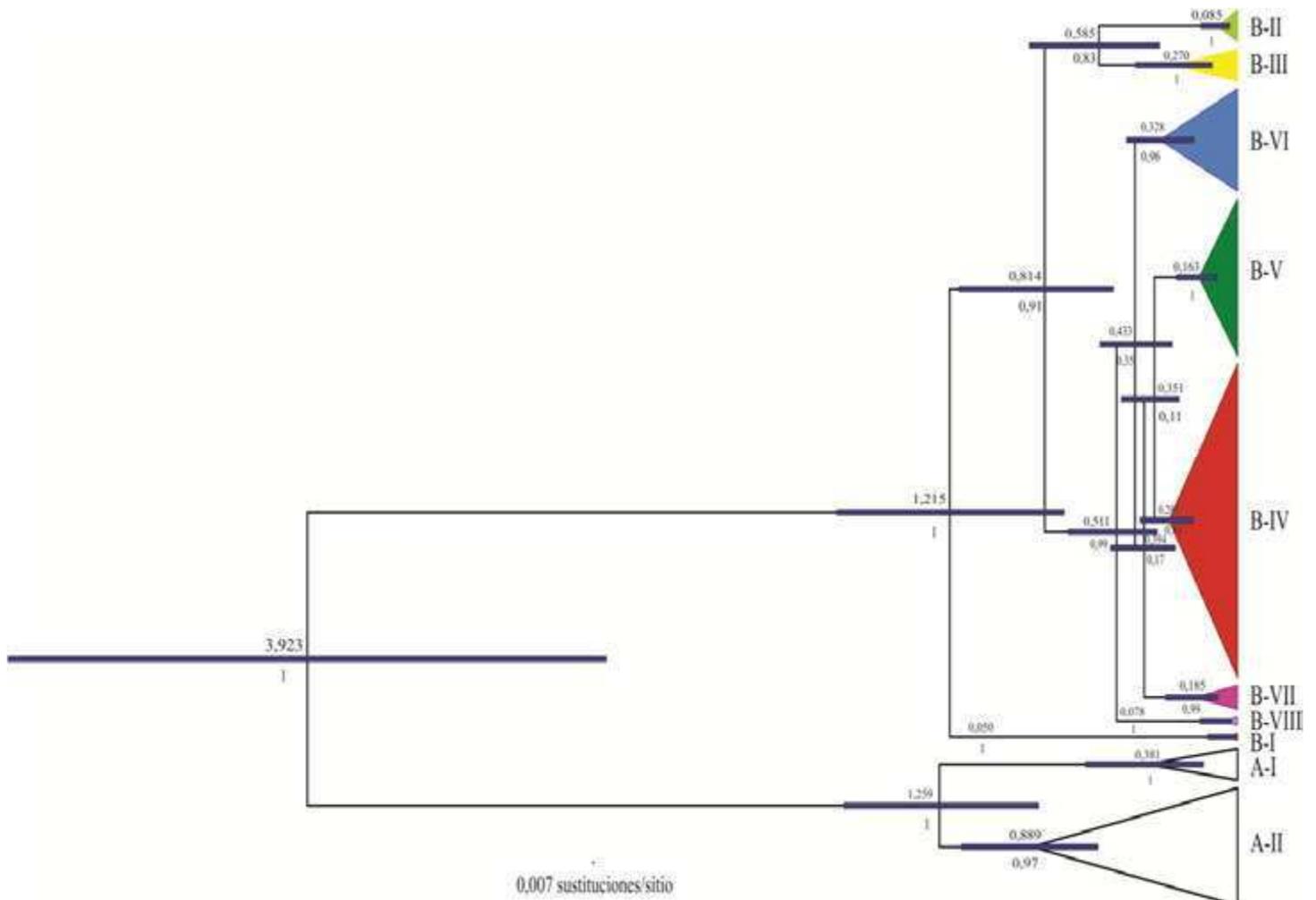


Figura 5.7. Árbol Bayesiano de mayor probabilidad posterior (*Maximum Clade Credibility tree*). El valor por encima de cada nodo corresponde a la edad del nodo y por debajo a la probabilidad posterior. Las barras en cada nodo representan el intervalo de confianza de 95% HPD de la edad del nodo. Las ramas dentro de cada haplogrupo fueron colapsadas para mayor claridad. El color de cada haplogrupo coincide con los de las figuras 5.1 - 5.4.

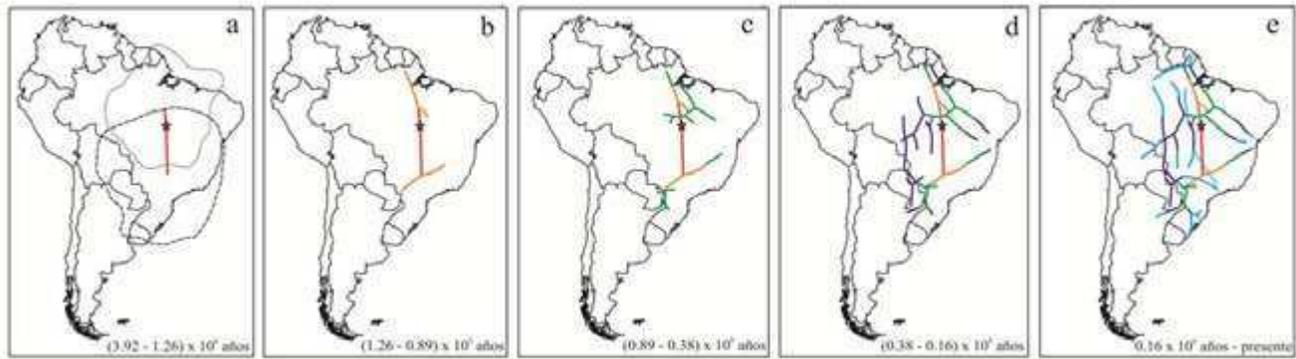


Figura 5.8. Esquema del patrón de dispersión de *Wasmannia auropunctata* desde su origen (a) hasta la expansión y diversificación de los clados A y B en el rango nativo (b-e). El ancestro común de todas las muestras se simboliza con la estrella roja (a) y las rutas de dispersión con líneas coloreadas. Los colores más cálidos representan dispersiones más antiguas y los colores más fríos dispersiones más recientes. Las áreas definidas por las líneas punteadas (a) representan la incertidumbre que existe en la asignación del área de origen de la especie (80% HPD).

Agrupamiento basado en microsátélites

Cuando el número de grupos predeterminados fue dos ($K = 2$), los grupos inferidos son idénticos a los clados A y B obtenidos con el ADNmt (Figura 5.9). Sólo unos pocos individuos muestran evidencia de pertenecer a ambos clados (sitio 17 (Una, Brasil); Figura 5.9), lo que podría reflejar la existencia de flujo de genes histórico (o actual) entre ellos. Al aumentar de los valores de K , ambos clados se subdividen internamente, pero se mantienen siempre como grupos separados. Para $K = 3$, las poblaciones del clado B se agrupan en un solo clúster, mientras que el clado A se divide en 2 grupos: 1) Costa Rica y 2) Brasil + Guayana Francesa. Para $K = 4$, ambos clados se subdividen internamente en dos grupos: el clado B se divide en 1) norte de Argentina + Itabuna, y 2) centro de Argentina; mientras que el clado A muestra la misma subdivisión que para $K = 3$. Para $K = 5$, el clado B muestra la misma subdivisión que para $K = 4$, mientras que el clado A se separa internamente en tres grupos: 1) Brasil, 2) Guayana Francesa y 3) Costa Rica.

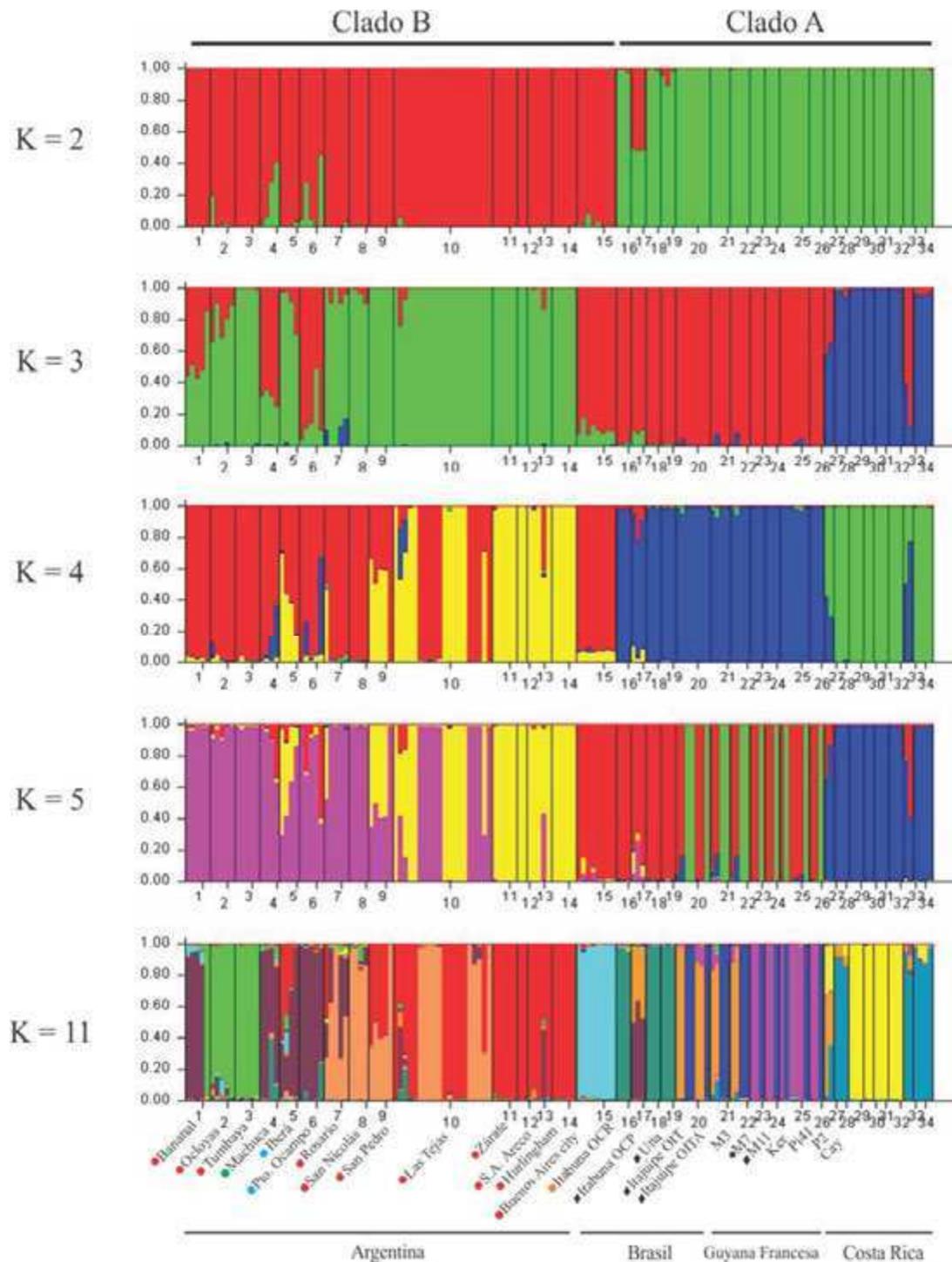


Figura 5.9. Agrupamiento individual inferido con el análisis de STRUCTURE. Cada genoma individual se representa con una barra vertical compuesta por secciones de color que representan su proporción de pertenencia a una población determinada. Sólo se muestran los valores de K de 2 a 5 y el valor más óptimo de K (11) para nuestros datos. En la parte inferior, los círculos coloreados y los cuadrados y diamantes negros, junto a los nombres de cada localidad de origen de cada individuo, representan el haplogrupo al que pertenece cada muestra de acuerdo con el análisis de ADNmt (según las figuras 5.1 – 5.4).

La probabilidad de los datos aumenta asintóticamente al aumentar K (Figura S.5.1). Sin embargo, K = 11 es el valor más óptimo inferido según el Delta K (Figura S.5.2). Para este valor no hay individuos con genotipos que sean mezcla de los clados A y B. El clado B comprende 5 grupos: 2 en el norte de Argentina, 2 en el centro de Argentina (Buenos Aires), y uno en Itabuna (OCR), Brasil; mientras que el clado A muestra un patrón de mezcla más complejo, con muchos individuos no asignados a una única población. Sin embargo, se pueden identificar 6 grupos: 2 en Brasil, 2 en Guayana Francesa y 2 en Costa Rica (Figura 5.9, K = 11).

Distribución de Wasmannia auropunctata durante el Cuaternario: Modelado de Nicho Ecológico utilizando variables climáticas actuales y pasadas

De acuerdo con los valores de AUC, la capacidad de los modelos para distinguir los puntos de presencia en comparación a puntos aleatorios fue superior a 0,9 indicando un buen rendimiento y una alta capacidad predictiva del modelo (Swets, 1988). Las variables más importantes que contribuyeron al modelo MAXENT, y por lo tanto determinan la distribución geográfica de *W. auropunctata*, dependieron del conjunto de datos utilizado para la generación del mismo. Cuando se entrenó el modelo con el conjunto de datos de toda la ocurrencia de *W. auropunctata* del rango nativo (clados A y B juntos), las variables más importantes que determinaron la distribución de la especie fueron, en primer lugar, la temperatura anual media, y con menor importancia la temperatura mínima del mes más frío, y el rango medio anual de temperatura. Al entrenar el modelo considerando solo los puntos de presencia del clado B, la variable que más influyó en su distribución fue la temperatura mínima del mes más frío, y en menor medida, el rango de temperatura anual y la temperatura media del trimestre más seco. Las curvas de respuesta de las variables ambientales más importantes para las predicciones se muestran en la Figura S.5.3. El nicho ecológico de *W. auropunctata* (clados A y B) parece estar definido por una temperatura mínima del mes más frío de 23°C o más, mientras que para las poblaciones que pertenecen únicamente al clado B parece estar definida por una temperatura mínima del mes más frío de 10°C.

El análisis de la distribución geográfica potencial basada en el modelo realizado con el grupo completo de datos (clados A y B juntos) mostró que las áreas actuales con mayor probabilidad de albergar a la especie se encuentran en Centroamérica –una pequeña área en Belice,

dos áreas en Nicaragua y en islas del Caribe como Jamaica– y en Sudamérica –en Brasil (Bahía y Bosque Atlántico, cerca de São Paulo) y en el noreste de Argentina (Figura 5.10, clados A y B) –. Durante el LGM, *W. auropunctata* se distribuyó con mayor probabilidad en el este de México y Centroamérica (Costa Rica y Panamá) y en el este de Brasil, lo que corresponde al núcleo Caatinga, definido por Prado & Gibbs (1993), y los refugios pleistocénicos de Pernambuco y Bahía, definidos por Carnaval & Moritz (2008). Con menos probabilidad, la especie se habría encontrado también en el norte de Argentina y el sur de Paraguay y Bolivia. También se identificó otra región con condiciones ambientales óptimas para la especie en el norte de Sudamérica, incluyendo partes de Colombia, Venezuela y Guyana, y en el sur de Brasil. El MNE realizado para el LIG (120 mil años atrás) mostró un patrón de distribución similar al actual, lo cual es predecible ya que ambos períodos (LIG y actual) corresponden a períodos interglaciares.

Cuando el modelo sólo incluyó muestras pertenecientes al clado B, el patrón de distribución se hizo más limitado a latitudes del sur (Figura 5.10, clado B). En la actualidad, las áreas con mayor probabilidad de presencia de este clado se localizan en el noroeste, noreste (incluyendo la Mesopotamia), y parte del centro de Argentina incluyendo la región de la desembocadura del río Paraná. Durante el LGM, el área de distribución se limitó con mayor probabilidad a lo largo de la costa atlántica de Brasil, en el refugio Bahía, y con menor probabilidad en el noreste y noroeste de Argentina (núcleos Misiones y Piedemonte Subandino, definidos por Prado & Gibbs (1993)). Por último, el MNE para el LIG mostró un patrón de distribución similar al actual.

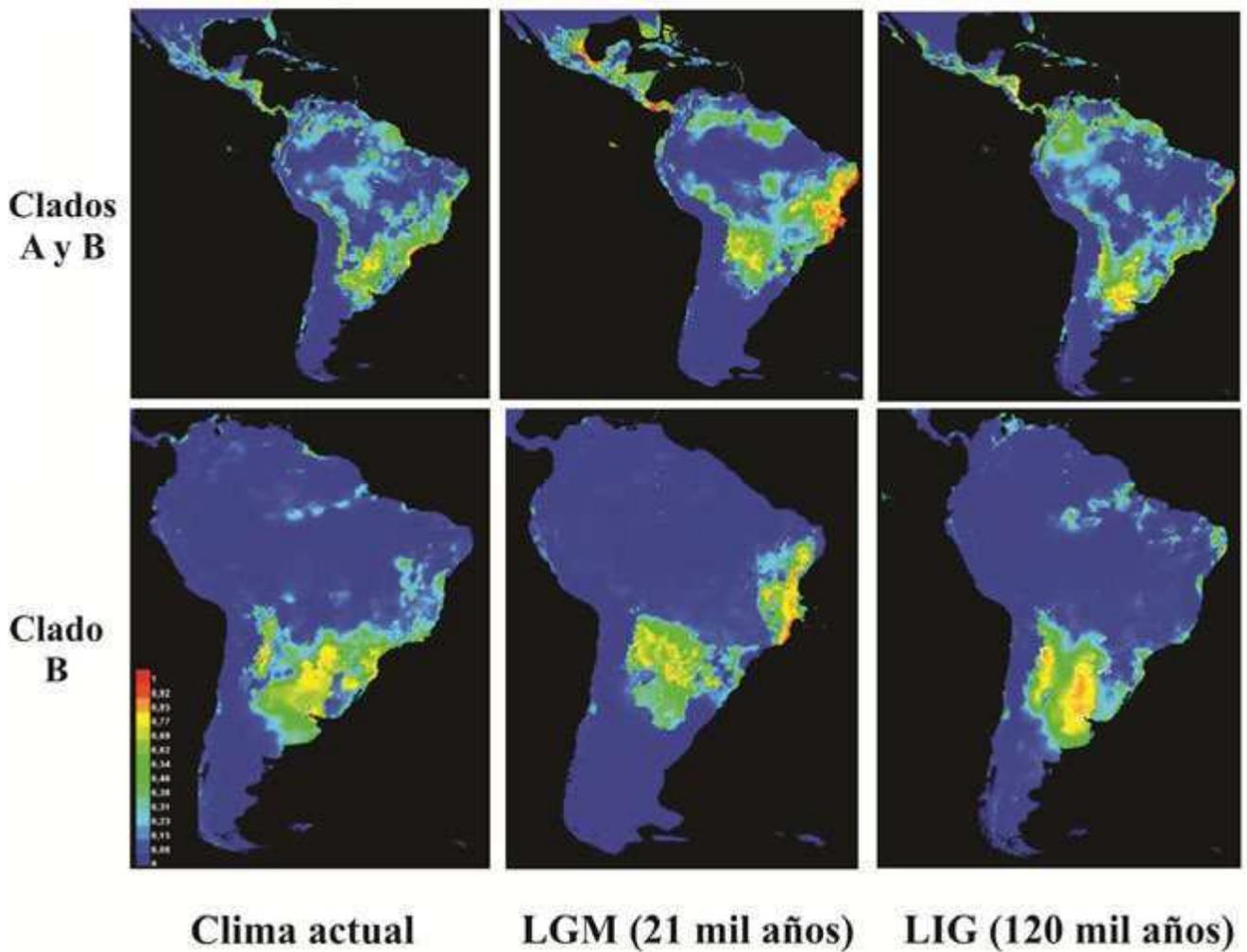


Figura 5.10. Distribución geográfica potencial de *Wasmannia auropunctata* modelada con la ocurrencia de toda la especie (clados A y B juntos) (arriba) y solo con datos de presencia del clado B (abajo) a través de las fluctuaciones climáticas del Cuaternario: escenario actual, LGM y LIG. Los colores más cálidos corresponden a las regiones con mayor probabilidad de ocurrencia y los colores más fríos las regiones menos favorables. Las áreas en rojo representan la mayor probabilidad de ocurrencia y las áreas azules no reúnen las condiciones adecuadas para la supervivencia de la especie.

Discusión

En este capítulo se analizó la variación en una región de 628 pb del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I de *W. auropunctata* a lo largo de una amplia porción de su rango nativo. El extenso muestreo realizado permitió llevar a cabo un análisis filogeográfico que contribuye a una

mejor comprensión de la historia evolutiva de esta hormiga altamente invasiva dentro de su área de distribución nativa, previamente a su dispersión en el mundo.

Distribución actual, origen y dispersión de los principales clados de Wasmannia auropunctata

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de Mikheyev & Mueller (2007), de una distribución geográfica diferencial de los clados A y B de *W. auropunctata*. Se confirmó que el clado A es un linaje casi exclusivamente tropical, mientras que el clado B es un linaje mayormente subtropical que se extiende también en regiones templadas y tropicales de Sudamérica.

El resultado del análisis filogeográfico Bayesiano sugiere que *W. auropunctata* se habría originado en el centro de Brasil (más probablemente en la región de Tocantins). La diversificación en dos clados pudo haber ocurrido durante el Plioceno hace aproximadamente 3,92 m.a. Dos linajes comenzaron a diferenciarse, uno hacia el norte y el otro hacia el sur, dando lugar a los antepasados de los actuales clados A y B respectivamente. El primero se habría originado en la Amazonia y el segundo en la Mata Atlántica. Varias especies de aves endémicas del Bosque Atlántico se separaron de sus especies hermanas amazónicas dentro de este mismo periodo de tiempo (Patel et al., 2011; Ribas et al., 2009; Cabanne et al., 2008; Miller et al., 2008). Estos eventos vicariantes pueden ser atribuidos a los ciclos de Milankovitch (Bennett, 1990; Haffer, 1993), lo cuales crearon condiciones ecológicas inestables durante todo el Cenozoico, con alternancia de períodos climáticos húmedos y secos que llevaron a cambios continuos en la vegetación (Haffer, 2008). Estos cambios climáticos cíclicos probablemente afectaron los biomas del mundo aislando poblaciones de diferentes especies en distintos refugios y ocurrieron cada 20.000 a 10.0000 años promoviendo así la especiación en diversos taxa (Haffer, 1993). El modelo de especiación mediado por refugios (Haffer, 1969, 1982, 1993; Vanzolini, 1992; Müller, 1973) se aplicó originalmente a bosques tropicales solo durante el Cuaternario, pero posteriormente se extendió también al Terciario, cuando se encontró que los ciclos de Milankovitch también afectaron este período geológico (Haffer, 2008). Por lo tanto, la diferenciación de varias especies endémicas del Bosque Atlántico y Amazónico (Patel et al., 2011; Ribas et al., 2009; Cabanne et al., 2008; Miller et al., 2008), así como la división de *W. auropunctata* en los dos clados A y B, podrían ser la consecuencia de estas fluctuaciones climáticas

que dieron lugar a una recurrente contracción de los bosques y la consecuente formación de refugios más o menos aislados.

Este estudio apoya la hipótesis de que la mayoría de los eventos de diversificación en el Neotrópico ocurrieron durante el Neógeno (Rull, 2008; Antonelli et al., 2009; Santos et al., 2009). La formación de la actual cuenca amazónica hace aproximadamente 2-3 millones de años (Campbell et al., 2006) sugiere que este gran río también podría haber actuado como barrera geográfica clave en la diferenciación de los clados A y B, ya que existe incerteza en la datación del origen de la especie (señalado por el intervalo de confianza del 95%). De hecho, la ubicación geográfica del ancestro común de ambos clados debería proponerse con cautela debido a que la inferencia filogeográfica bayesiana realizada en este estudio no tiene en cuenta toda la distribución nativa de la especie, sino sólo los sitios del presente muestreo. Por lo tanto, la locación del ancestro común podría cambiar si se incluyeran en el análisis más muestras del norte de Sudamérica y de Centroamérica. Independientemente de esto, es evidente que *W. auropunctata* fue capaz de cruzar la barrera del río Amazonas, ya que existen individuos de ambos clados a ambos lados del río. Esto puede estar relacionado con el hecho de que *W. auropunctata* es una especie bien adaptada a vivir en pantanos y planicies de inundación (Foucaud et al., 2009; Orivel et al., 2009) y su dispersión a través de estos hábitats ribereños no le es difícil ya que puede transportarse fácilmente mediante restos vegetales (principalmente troncos) flotantes durante las inundaciones (Hölldobler & Wilson, 1990; Passera, 1994; Walsh et al., 2004). Es por esto también que es probable que las principales cuencas hidrográficas hayan jugado un papel central en la dispersión de esta especie en su rango nativo, y probablemente este medio de dispersión sea el responsable de su amplia distribución geográfica actual. Tanto la cuenca Amazónica y la Tocantins-Araguaia hacia el norte y la del Plata hacia el sur parecen haber jugado un papel central en la dispersión de *W. auropunctata*. El análisis filogeográfico Bayesiano muestra cómo el clado B habría ingresado a la ecorregión del Pantanal (central en la dispersión) desde San Pablo, y de ahí, a través la cuenca del Plata, habría bajado por el Río Paraguay hasta la confluencia con el Río Paraná (la zona de la provincia de Corrientes, Argentina), desde donde luego se habría dispersado hacia el este llegando hasta Misiones, hacia el oeste llegando a las Yungas y hacia el sur llegando a Buenos Aires. También sugiere que un segundo linaje habría llegado a Misiones desde el sur de Brasil.

Se detectaron dos regiones donde los clados A y B son simpátricos; el haplogrupo A-I coexiste con el clado B en la Amazonia, mientras que el haplogrupo A-II coexiste con el clado B en Bolivia, Paraguay y este de Brasil. El análisis filogeográfico Bayesiano sugiere que estas serían zonas de contacto secundario y que los dos clados habrían comenzado a entrar en contacto hace aproximadamente 380 mil años, luego del comienzo de su expansión y diversificación, un proceso que continúa en la actualidad. La alternancia de ciclos de climas fríos y cálidos durante el Pleistoceno (hace 1,8 millones - 10 mil años) podría haber promovido cambios en la composición de los bosques (Oliveira-Filho y Fontes, 2000) que podrían haber generado estas nuevas zonas de contacto, tal como se propuso para planarias en el Bosque Atlántico (Alvarez-Presas et al., 2014).

Dentro de clado B hay un haplotipo (H1) que es muy común y está ampliamente distribuido en el sur de Sudamérica (principalmente Argentina). Fue sorprendente encontrar este haplotipo también en el norte de Brasil (Amazonas). Es difícil establecer si se trata de una retromigración natural del clado B desde el sur hacia el norte de Sudamérica, o si se trata de una introducción accidental reciente mediada por los seres humanos, o si en realidad el H1 está mucho más ampliamente distribuido que lo observado en este estudio. Otra posible retromigración del clado B al norte de Sudamérica estaría protagonizada por el haplotipo H47, el cual también fue hallado en Amazonas y pertenece al haplogrupo B-VI. Sin embargo, debido a que existe una región intermedia sin muestrear en este estudio, se necesitarían más muestreos en el centro de Brasil y norte de Bolivia para comprender mejor cómo las especies se movieron a través de esta región y corroborar estas hipótesis de retromigración.

*Áreas centrales y marginales y diversidad genética en el rango nativo de *Wasmannia auropunctata**

A través del MNE para el escenario climático actual, utilizando todos los registros de presencia de *W. auropunctata* (clados A y B juntos), se identificaron áreas centrales y marginales de distribución. Centroamérica contiene muchas áreas que presentan las condiciones más óptimas para la especie, así como también Colombia y Venezuela, el noreste (Bahía) y sudeste (San Pablo) de Brasil y el noreste de Argentina (a lo largo de la cuenca del Río Paraná). Como es de esperar para sitios con alta probabilidad de ocurrencia, estas áreas presentan una alta diversidad genética, como se muestra en la Interpolación Espacial.

Al considerar todo el conjunto de datos (clados A y B), casi todo el territorio argentino constituye un área marginal, con baja diversidad genética. Al restringir el conjunto de datos al clado B, las regiones con las condiciones más óptimas se encontraron solo en el sur de Sudamérica: en el sudeste de Brasil, noroeste (ecorregión de Yungas) y noreste (Selva Paranaense) de Argentina, y la región de la desembocadura del Río Paraná. Esto apoya el resultado filogeográfico bayesiano, que indica que el origen del clado B, y su posterior dispersión, se produjeron en la región del centro este y sur de Sudamérica. El haplogrupo B-III (presente en el sudeste de Brasil) albergó la mayor diversidad genética del clado B, lo cual constituye evidencia a favor de que este clado se originó en el Bosque Atlántico (región del actual estado de San Pablo). Todas las regiones que reúnen las condiciones climáticas más óptimas para el clado B presentan una alta diversidad genética según la Interpolación Espacial, excepto la zona próxima a la desembocadura del Río Paraná; esto puede deberse a que ésta fue la última zona colonizada por la especie en su proceso de expansión hacia el sur. Curiosamente, la población fuente de la invasión en Israel se localiza con mayor probabilidad en esta misma región (en la zona de Zárate, provincia de Buenos Aires) (Rey et al., 2012). Esta zona está dominada por el haplotipo H1, que es el más común dentro del clado B. Es posible que el H1 esté asociado a una combinación genética favorable que le permitió a *W. auropunctata* establecerse en Argentina, una región con una temperatura media anual menor que la del resto del rango nativo de la especie. La baja diversidad genética en esta área puede estar relacionada al hecho de que la evolución de los genomas presentes en esta región podría estar limitada por las condiciones climáticas menos propicias para la especie.

¿Son las poblaciones argentinas nativas o introducidas?

Este estudio apoya que las poblaciones de *W. auropunctata* presentes en Argentina son nativas y no introducidas recientemente por medio de la actividad antrópica, por las siguientes razones: 1) Los tiempos de divergencia inferidos a través del análisis filogeográfico bayesiano sugieren que la especie habría llegado a esta región hace aproximadamente 500 mil años, y 2) la alta diversidad haplotípica en Argentina (22 haplotipos) sólo puede lograrse luego de un largo proceso evolutivo. Sólo el clado B existe en Argentina, lo que sugiere que este linaje está mejor adaptado a un clima frío y seco que el clado A, únicamente tropical y subtropical. De hecho, el MNE indicó que una de las variables ambientales más importantes que determinan la distribución del clado B es

la temperatura mínima del mes más frío, y que la probabilidad de la presencia de este clado es mayor en las zonas con temperaturas más bajas. La alta diversidad clonal hallada en el capítulo 3 también apoya que la especie es nativa en esta región.

Como muestra el resultado del Bayesian Skyline Plot, *W. auropunctata* sufrió una expansión poblacional reciente en Argentina, hace 28.000 años aproximadamente. Esta datación coincide con el Interstadial de Paudorf, un período geológico durante la última glaciación, que ocurrió hace 28.000 – 32.000 años, en el que la temperatura de la tierra aumentó y el clima se volvió más templado (Mörner, 1971). La expansión gradual de *W. auropunctata* a latitudes más altas durante este período, puede haber sido consecuencia de la adaptación de ciertos genotipos a climas más fríos durante ese período glacial. En particular, el haplogrupo B-IV presentó valores de D de Tajima y F_s de F_u que también sugieren expansión demográfica. Este resultado, junto con la baja diversidad genética en esta región, en comparación con el este de Sudamérica, tal como se muestra en la Interpolación Espacial, apoya que la colonización de *W. auropunctata* en esta zona marginal fue reciente, en tiempos evolutivos. Este resultado también se refleja en el patrón de estrella del haplogrupo B-IV, como puede verse en la red de haplotipos de la figura 3.3. Dicho patrón, caracterizado por un haplotipo central muy frecuente, y diversos haplotipos menos frecuentes derivados de éste, separados por solo uno o dos pasos mutacionales del primero, es característico de explosiones demográficas (Avise, 2000).

Distribución histórica de Wasmannia auropunctata basada en el MNE con variables paleoambientales

El MNE proyectado con variables climáticas pasadas (del Último Máximo Glacial y del Último período Interglacial) coincide con otros trabajos que apoyan la existencia de bosques en el norte de la Mata Atlántica en las últimas glaciaciones (Cabanne et al., 2008) y una recolonización reciente del sur del Bosque Atlántico (Grazziotin et al., 2006; Cabanne et al., 2007; Carnaval & Moritz, 2008; Carnaval et al., 2009). Al considerar los dos clados A y B de *W. auropunctata*, el MNE durante el LGM mostró que la distribución más probable de *W. auropunctata* se encontraría en el este de México, Centroamérica (Costa Rica y Panamá) y este de Brasil, lo que corresponde al núcleo Caatinga (*sensu* Prado & Gibbs, 1993) y la costa del bosque Atlántico. Estos refugios

brasileños coinciden con otros dos refugios pleistocénicos (Pernambuco y Bahía) reportados en trabajos anteriores (por ejemplo, para hormigas cortadoras de hojas, Solomon et al. (2008); para bosques tropicales estacionalmente secos, Werneck et al. (2011); y para ranas, Carnaval et al. (2009). El MNE sugiere la existencia de otro refugio en el norte de Argentina y el sur de Paraguay y Bolivia (núcleos Misiones y Piedemonte (*sensu* Prado & Gibbs, 1993) y Bosques Interandinos Bolivianos) y en el norte de Sudamérica (bloque norte amazónico definido por Werneck et al. (2011), que incluye regiones de Colombia, Venezuela y Guayana) y en el sur de Brasil, que coincide con el refugio de San Pablo descrito por Carnaval et al. (2009). El modelo predijo la presencia de una amplia zona de hábitat desfavorable en gran parte de la cuenca del Amazonas, con las restantes áreas de hábitat favorable al norte y al sur de esta zona, al igual que lo observado para la hormiga cortadora de hojas *Atta laevigata* (Solomon et al., 2008).

Evidencia de diferenciación de nicho entre ambos clados

Dentro de los tres períodos climáticos analizados, las regiones más aptas para la especie, al considerar ambos clados, parecen diferir de las que se infieren sólo teniendo en cuenta el clado B. El primero predice con alta probabilidad, las regiones más aptas en el centro, norte/noreste y sur/sudeste de Sudamérica, mientras que el segundo predice sólo regiones aptas en el sur y sudeste de Sudamérica. Esto sugiere que ambos clados habrían sido sometidos a diferentes condiciones ambientales a las que también se habrían adaptado. No es extraño que durante el LGM el clado B se haya trasladado hacia el norte de Sudamérica, donde la temperatura a través del año era más alta y estable. Sin embargo, durante los periodos interglaciares, las zonas más adecuadas para este clado parecen estar situadas en altas latitudes del sur de Sudamérica, lo cual sugiere que el clado B está más adaptado a condiciones climáticas más frías que el clado A. El experimento realizado por Rey et al. (2012), donde obreras del clado B sobrevivieron significativamente mejor que obreras del clado A al ser sometidas a estrés por frío, proporciona evidencia que apoya esta afirmación.

Wasmannia auropunctata pudo haberse diferenciado en los dos principales clados por medio de un proceso de selección divergente o aislamiento geográfico. Sería interesante identificar genes bajo selección positiva en ambos clados y buscar otras diferencias ya sea fisiológicas, morfológicas y de comportamiento que apoyen esta idea. Si bien un gran número de mutaciones

mitocondriales (21 en total) diferencian al clado A del B, se vio que en condiciones de laboratorio individuos de distinto clado pueden reproducirse sexualmente (Rey et al., 2013a), por lo tanto no sería apropiado sugerir que estos clados constituyen especies distintas. Sin embargo, debido a la ausencia de evidencia de flujo génico entre ambos clados en poblaciones naturales, sugerido por los análisis con microsátélites, los clados podrían estar experimentando un proceso de especiación incipiente y la zona de contacto secundario podría ser una zona híbrida.

Un estudio más exhaustivo de las poblaciones del clado A será necesario para corroborar que los requerimientos de nicho de este clado difieren de los del clado B. También será necesario analizar genes nucleares para corroborar la hipótesis sobre especiación incipiente. De ser así, no sería extraño que una especie invasora, hasta ahora considerada típica de clima tropical, se haya establecido exitosamente en una región templada del mundo, como la región Mediterránea. La presencia del clado B en islas tropicales del mar Caribe como Guadalupe y Dominica, del Pacífico como Nueva Caledonia y Tahití, y regiones tropicales de África (Gabón y Camerún), como así también en el Mediterráneo, sugiere que este clado posee una mayor habilidad colonizadora que el clado A (el cual únicamente invadió regiones tropicales del mundo), siendo capaz de invadir un espectro climático más amplio.

Posible efecto de la infección por simbioses en el ADNmt

La bacteria *Wolbachia* fue el único simbiote detectado en poblaciones naturales de *W. auropunctata* (Rey et al., 2013b). Estos autores encontraron una fuerte correlación entre la infección y el sistema de reproducción: poblaciones sexuales (no dominantes) están infectadas, mientras que la mayoría de las poblaciones clonales (dominantes) no presentan infección. Por otro lado, se vio que las poblaciones dominantes y no dominantes de *W. auropunctata* no pertenecen a unidades evolutivas diferentes: árboles construidos con microsátélites o ADNmt no muestran agrupamientos monofiléticos, lo que indica que las poblaciones infectadas y no infectadas no presentan secuencias de ADNmt divergentes (Foucaud et al., 2007, 2009.).

En el presente capítulo, la mayor parte de los muestreos proviene de hábitats modificados, y pertenece a poblaciones clonales (ver capítulos 2 y 3), lo que permite suponer que la mayoría de las poblaciones muestreadas no presentan infección. De hecho, se realizaron búsquedas

de evidencia de infección por *Wolbachia* en 25 sitios elegidos al azar, de los cuales sólo 6 presentaron infección (24% de las poblaciones) (datos no mostrados). Ningún haplotipo estuvo vinculado a la infección. En particular, las muestras que pertenecen al haplotipo más común (H1) no estuvieron infectadas con *Wolbachia*. Esto es lo contrario a lo esperado en el caso de una selección de una variante de ADNmt mediada indirectamente por un simbiote (ver Hurst & Jiggins, 2005). Por lo tanto, estos resultados junto con el agrupamiento congruentes obtenido con los marcadores mitocondriales y nucleares, descarta cualquier interpretación basada en la presencia del simbiote en poblaciones de *W. auropunctata*.

CAPÍTULO 6

Habilidad competitiva de *Wasmannia auropunctata* en un ensamble local de su rango nativo



Fotos: Alex Wild

Resumen. Las especies de hormigas invasoras, como es el caso de *W. auropunctata*, tienen en general severos impactos en las comunidades de hormigas nativas por competencia interespecífica, ya sea por interferencia o por explotación de recursos o territorios de nidificación, escenario que suele ser muy distinto al del ambiente nativo, donde sus hormigas competidoras por lo general limitan su acceso a los recursos. En este capítulo se evaluó, por medio de una combinación de trampas de caída y cebos, la habilidad competitiva de una población clonal y supercolonial de *W. auropunctata* en un ensamble de hormigas en su rango nativo, en el centro de Argentina. Se analizó su capacidad para descubrir y dominar fuentes de alimento, así como su habilidad para desplazar de éstas a otras especies. Se evaluó cuáles fueron las especies más dominantes y la posición de *W. auropunctata* dentro del ensamble. El ensamble estudiado presentó 56 especies de hormigas, de las cuales *W. auropunctata* fue la más abundante. *Wasmannia auropunctata* descubrió el 40% de los cebos en los que se registró y su habilidad como descubridora fue intermedia entre las especies mejores descubridoras (*C. quadriformis* y *N. fulva*) y las peores (*S. invicta*, *Solenopsis* sp.1 y *D. breviscapis*). *Wasmannia auropunctata* logró dominar solo el 21% del total de cebos a los que fue atraída, no fue exitosa al intentar usurpar cebos y solo logró reclutar masivamente en el 13% de los cebos del total donde se la registró. *Wasmannia auropunctata* perdió la mayoría de las interacciones con otras especies, siendo *S. invicta* y algunas especies de *Pheidole* sus principales rivales. Las especies más dominantes fueron *S. invicta* y *C. quadriformis*, seguidas de *W. auropunctata*, *Solenopsis* sp1, *D. breviscapis* y *N. fulva*. Estos resultados sugieren que *W. auropunctata* no posee una alta habilidad competitiva en este ensamble nativo, solo siendo capaz de dominar cebos cuando estos se presentan dentro del territorio de nidificación de su supercolonia, donde la especie es capaz de reclutar un alto número de obreras y así evitar ser desplazada por especies más agresivas. Este estudio corrobora que ni la clonalidad ni la supercolonialidad se asocian directamente a la dominancia ecológica de *W. auropunctata*.

Introducción

Existen muchos factores que afectan la estructura de las comunidades de hormigas, como el efecto directo e indirecto del clima sobre los suelos y la vegetación (Albrecht & Gotelli, 2001), la temperatura (Delsinne et al., 2007), los cambios ambientales (Cerdá et al., 1998a), la complejidad del hábitat (Majer & Camer-Pesci, 1991; Andersen, 1997), las perturbaciones físicas (Savolainen & Vepsäläinen, 1989) y los enemigos naturales (LeBrun & Feener, 2002, 2007). Las interacciones entre las distintas especies de la comunidad también afectan su estructura, principalmente la competencia interespecífica (Hölldobler & Wilson, 1990). Ésta puede ser por mecanismos de explotación o interferencia (Wilson, 1971; Fellers, 1987; Hölldobler & Wilson, 1990; Davidson, 1998; Holway, 1999). La competencia por explotación consiste en el consumo de un recurso limitante antes de que lo hagan otras especies. Tal recurso puede ser alimenticio o espacial (ej. sitios de nidificación). En la competencia por interferencia, en cambio, una especie excluye a otras por

medio de agresión directa, o utilizando repelentes químicos (Schoener, 1983; Fellers, 1987; Davidson, 1998). En este caso, el resultado de las interacciones agonísticas depende del tamaño del cuerpo, la edad, energía, experiencia, presencia de aguijón y otras formas de defensa química de las hormigas que interactúan, así como del tamaño y la forma del alimento (Cerdá et al., 1998a; LeBrun, 2005).

A su vez, la coexistencia de distintas especies dentro de una comunidad implica diferentes estrategias competitivas, descritas según cómo las distintas especies luchan por los recursos. Estas estrategias están asociadas a los dos mecanismos de competencia descritos anteriormente y se clasifican en: oportunista, extirpadora e insinuadora (Wilson, 1971; Hölldobler & Wilson, 1990). Las especies oportunistas practican la competencia por explotación y son aquellas que descubren rápidamente el recurso alimenticio y lo utilizan eficientemente. Las especies extirpadoras, en cambio, exhiben competencia por interferencia al dominar el recurso mediante agresión, logrando desplazar a las oportunistas (Delsinne et al., 2007). Las insinuadoras son capaces de robar el recurso a las oportunistas y a las extirpadoras, pasando desapercibidas gracias a que son inconspicuas (Wilson, 1971).

Las comunidades de hormigas pueden estar organizadas jerárquicamente de la especie más dominante a la menos dominante (Savolainen & Vepsäläinen, 1988; Hölldobler & Wilson, 1990; Davidson, 1998). Además, las distintas especies en general conviven en equilibrio gracias a que existe un compromiso entre la competencia por explotación y por interferencia y a las distintas estrategias mencionadas anteriormente (Lynch et al., 1980; Fellers, 1987; Davidson, 1998).

Las hormigas invasoras sobresalen en ambos tipos de competencia, utilizando tanto la competencia por interferencia como por explotación como mecanismos de desplazamiento de otras especies, aunque se desconoce su verdadera importancia relativa (Holway et al., 1999 y 2002). Las hormigas invasoras tienen altas habilidades de competencia por explotación (rápido descubrimiento de alimentos, rápido reclutamiento y reclutamiento masivo (Holway et al., 2002)) en comparación con las especies locales, las cuales se ven desplazadas. Se reconoce que las hormigas invasoras tienen una alta capacidad para desplazar a las especies de hormigas locales en su área de introducción (Holway et al., 2002; Reitz & Trumble, 2002). Diversos estudios han analizado el comportamiento y la posición ecológica de hormigas invasoras en distintos ensambles, tanto de

comunidades nativas como introducidas. Las especies más estudiadas han sido *Solenopsis invicta*, *Solenopsis richteri* y *Linepithema humile* (Folgarait et al., 2004, LeBrun et al., 2007, Calcaterra et al., 2008, 2016; Feener et al., 2008). Todas estas especies fueron inicialmente caracterizadas como competidoras superiores, con mayor habilidad para explotar los recursos que las especies nativas, atribuyéndoles la declinación de especies nativas de hormigas y otros artrópodos por medio de competencia por interferencia y explotación (ej. Ward, 1987; Human & Gordon, 1996; Holway et al., 1999, 2002; Tschinkel, 2006).

Wasmannia auropunctata ha sido descrita por distintos autores como una competidora superior tanto en el rango nativo como en el introducido. Se ha demostrado su capacidad para desplazar comunidades de hormigas nativas en las regiones donde fue introducida, utilizando una combinación de competencia por interferencia y por explotación, y depredando otras hormigas (Clark et al., 1982; Wetterer & Porter, 2003; Le Breton et al., 2003, 2005; Vonshak et al., 2010). También se ha observado su gran agresividad frente a otras especies de hormigas invasoras (Bertelsmeier et al., 2015).

En el rango nativo, también se sugiere que *W. auropunctata* puede desplazar otras especies de hormigas por su alta abundancia y agresividad interespecífica (Armbrecht & Ulloa-Chacón, 2003; Tennant, 1994; Grangier et al., 2007). Por ejemplo, en una comunidad de hormigas en la región del Chaco Seco, en Paraguay, se la caracterizó como una especie extirpadora (Delsinne et al., 2007), por lo cual *W. auropunctata* ejercería competencia por interferencia. Por otro lado, un estudio realizado en el Valle del Río Cauca, en Colombia, atribuye la dominancia de *W. auropunctata* a la competencia por explotación, permitiéndole un rápido aprovechamiento de los recursos al reclutar un gran número de obreras (Achury et al., 2008). Según este estudio, entonces, *W. auropunctata* sería una especie oportunista. Por lo tanto, aún no queda claro cuál es el mecanismo competitivo por el cual *W. auropunctata* logra tal abundancia y desplazamiento de otras especies, tanto en las comunidades nativas como introducidas, ni su verdadera importancia relativa.

Sin embargo, un estudio realizado en Nueva Caledonia, sugiere que en realidad el éxito de *W. auropunctata* se debería a que las hormigas nativas no explotan de manera eficiente las fuentes de alimento disponibles ni defienden varios sitios de anidamiento, proporcionando un nicho vacío, el cual es fácilmente ocupado por un invasor como *W. auropunctata* (Le Breton et al., 2005). Por

otro lado, un estudio en laboratorio realizado por Vonshak et al. (2012), analizando la población de Israel, rechaza todas las afirmaciones previas y sugiere que en realidad la habilidad competitiva de *W. auropunctata* es baja, caracterizándola como una especie insinuadora y descartando que sea una extirpadora (ya que es fácilmente desplazada de los recursos) o una oportunista (ya que tarda más tiempo que otras especies en descubrir el alimento). Esta evidencia sugiere entonces, que el éxito de *W. auropunctata* fuera de su rango nativo, no se debe a su habilidad competitiva sino a que lograría invadir sitios donde existen nichos disponibles, como las islas o sitios perturbados por el hombre.

El objetivo de este capítulo es evaluar, en un ensamble dentro del rango nativo de *W. auropunctata*, qué mecanismo competitivo utiliza y su jerarquía de dominancia en relación a otras especies. Esto se puede evaluar utilizando cebos, que permiten observar directamente cómo interactúa con otras especies, y una combinación con trampas de caída, que permiten considerar su abundancia en el ensamble. En base a los trabajos de Le Breton et al. (2005) y Vonshak et al. (2012), la hipótesis es que *W. auropunctata* no es buena competidora. Se espera que muestre una baja habilidad para dominar recursos, una baja posición jerárquica respecto a otras hormigas del ensamble y que pierda la mayoría de las interacciones con otras especies.

Materiales y Métodos

Sitio de estudio

El estudio fue realizado a principios del otoño de 2015, en un sitio localizado a 4 km de la ciudad de Loreto, en la ruta provincial N° 18, provincia de Santiago del Estero, Argentina (28°19.35'S, 64°08.06'O), perteneciente a la ecorregión del Chaco Seco. Loreto está a una altura de 137 msnm, posee una temperatura media del mes más cálido (enero) de 27,9°C y la temperatura media del mes más frío (julio) es de 12,6°C, con una precipitación media anual de 378 mm (De Fina 1992, datos históricos para el decenio 1941-1950). Se eligió este sitio en particular por la abundancia relativamente alta de *W. auropunctata* y por su coexistencia e interacción con muchas otras especies de hormigas.

Para poder evaluar la habilidad competitiva de *W. auropunctata* el sitio de estudio debía ser un lugar donde *W. auropunctata* presente un alto porcentaje de interacción con el resto de las

especies de la comunidad. Esta situación era muy difícil de encontrar ya que *W. auropunctata* se encuentra habitualmente agregada, y como vimos en el capítulo 4, formando supercolonias. Pruebas preliminares con cebos en distintos sitios potenciales para realizar este estudio (Puerto Ocampo y Camping Las Tejas), donde la abundancia de *W. auropunctata* era alta, y el ensamble de hormigas relativamente rico, no mostraron interacciones entre *W. auropunctata* y el resto de las especies. Se observó que *W. auropunctata* solo aparecía y dominaba los cebos presentes en el territorio de su supercolonia, sin interactuar con otras especies. Por el contrario, fuera de este territorio, solo se registraba la presencia de las otras especies del ensamble y la ausencia de *W. auropunctata*. Este mismo patrón fue también observado por Delsinne et al. (2007). Sorpresivamente, descubrimos que este sitio en Loreto reunía las características buscadas para analizar la habilidad competitiva de *W. auropunctata* en su ambiente nativo (alta abundancia de *W. auropunctata* y alto porcentaje de interacciones con otras especies).

Se decidió realizar el estudio a principios del otoño y no en verano debido a que se trata de una región extremadamente calurosa durante el verano, época en la cual la actividad de las hormigas disminuye, y existen evidencias de que la temperatura ambiental puede afectar la habilidad de distintas especies para descubrir y/o dominar fuentes de alimento (Cerdá et al., 1998b; 1998b). De esta manera, temperaturas extremas afectan los patrones de forrajeo de las hormigas favoreciendo la actividad de especies oportunistas (Bestelmeyer et al., 2000, Delsinne et al., 2007). Debido a que se ha definido a *W. auropunctata* como una especie extirpadora no termofílica (Delsinne et al., 2007), para favorecer las interacciones de esta especie con otras era necesario realizar el estudio en condiciones de temperaturas moderadas. La temperatura media ambiental durante el período de estudio fue de 21,5°C, la humedad rondó el 72,3 %. Si bien las hormigas son más sensibles a la temperatura del suelo que a la ambiental, ambas variables están correlacionadas (Delsinne et al., 2007; Coulin, 2013), y esta temperatura ambiental es óptima para favorecer la actividad de las especies extirpadoras no termofílicas, es decir las especies competitivamente más agresivas (Calcaterra et al., 2008; 2016).

Se trabajó en dos sitios separados por 4,6 kilómetros (Figura 6.1). Ambos sitios poseen un nivel de perturbación medio ya que se trata de hábitats cercanos a caminos de tierra. Ambos sitios se encuentran próximos a un canal de riego, por lo que conservan cierta humedad a lo largo de todo el año, requisito necesario para la supervivencia de *W. auropunctata* en ambientes secos. El sitio 1

(28°19'26"S, 64°08'06"O) alberga una supercolonia de *W. auropunctata* (se realizaron pruebas de agresión *in situ* para conocer el tipo de organización social de esta población), con un sistema de reproducción clonal (datos microsátélites a partir de 11 reinas analizadas, ver capítulo 3), mientras que en el sitio 2 (28°20'11"S, 64°05'23"O) *W. auropunctata* está presente pero es menos abundante, por lo que no se encontraron nidos para realizar ensayos de agresión y evaluar el sistema reproductivo.

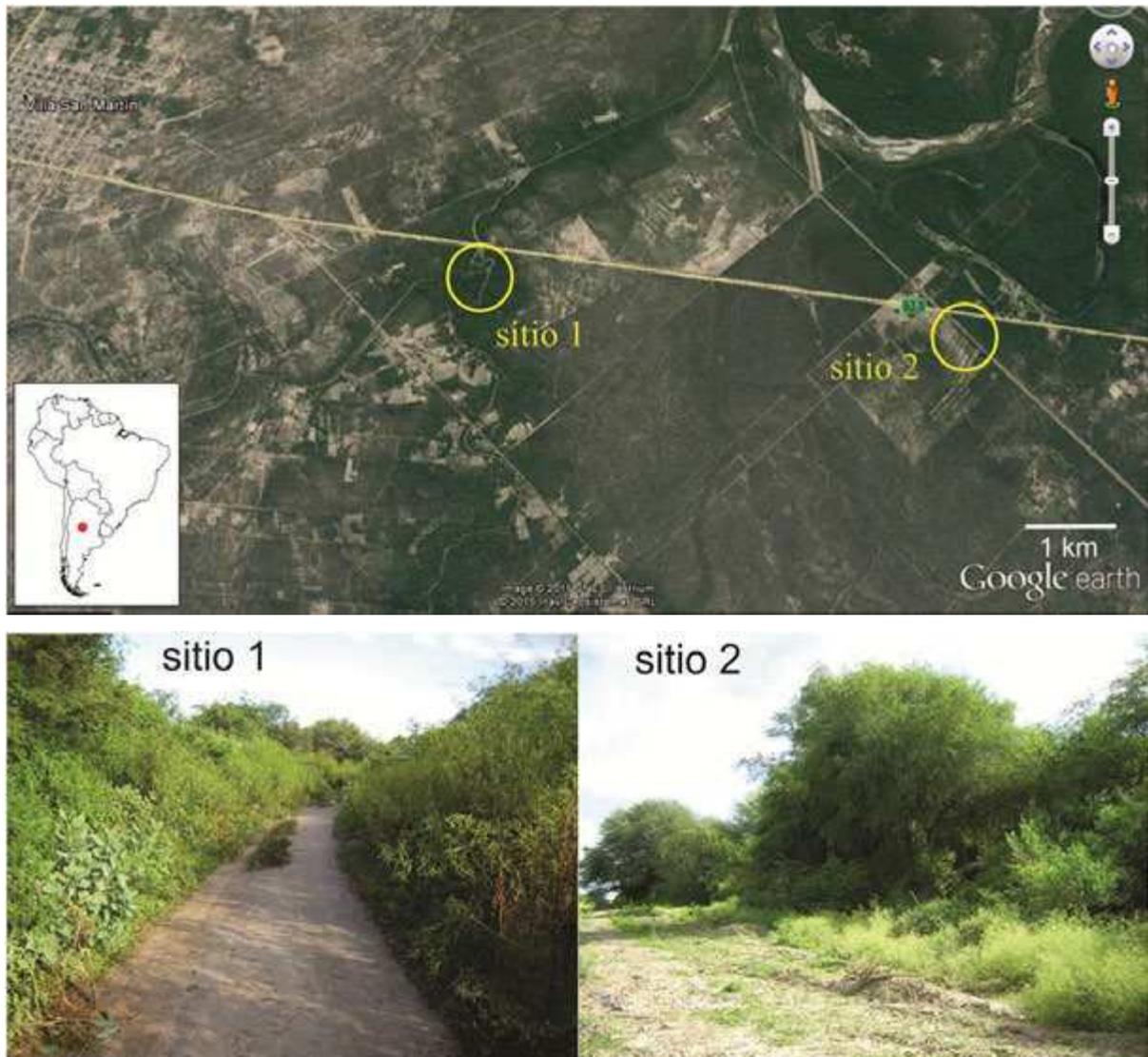


Figura 6.1. Sitios de estudio donde se evaluó la habilidad competitiva de *Wasmannia auropunctata* en el campo.

Medición de dominancia y habilidad para descubrir fuentes de alimento

Se utilizó una combinación de trampas de caída y cebos para caracterizar la comunidad de hormigas y sus relaciones de dominancia (Savolainen and Vepsäläinen, 1988; King and Porter, 2005; Calcaterra et al., 2008 y 2016), prestando especial atención en la habilidad competitiva de las dos especies altamente invasivas *W. auropunctata* y *S. invicta*. Las trampas de caída (*pitfalls*) proporcionan un método útil para estimar la actividad y la abundancia (dominancia numérica) de las distintas especies de hormigas en un ensamble, mientras que los cebos (tarjetas plásticas con alguna fuente de alimento que atraiga hormigas) permiten estimar la dominancia comportamental. Ambos métodos en conjunto proporcionan una estimación de la dominancia ecológica de cada especie en una comunidad de hormigas (Calcaterra, 2010). Resulta importante complementar los datos obtenidos de los cebos con los datos de las trampas de caída para independizarse de la época del año y la temperatura y así analizar la habilidad competitiva de la especie de interés en relación a su actividad-abundancia durante los días de estudio.

Trampas de caída

La abundancia numérica se midió como el número de hormigas (obreras y soldados) capturadas en trampas de caída, y la abundancia espacial de cada especie (frecuencia de ocurrencia) se midió como la proporción de trampas en la que cada especie fue capturada (King & Porter, 2005). Se colocó un total de 126 trampas distanciadas al menos 5 metros entre sí para asegurar su independencia (Woodcock, 2005). Se colocaron 96 trampas en el sitio 1 y 30 en el sitio 2, a lo largo de transectas lineales. Cada trampa consistió en un tubo plástico de 50 ml, de 3 cm de diámetro, con 25 ml de agua y unas gotas de detergente para disminuir la tensión superficial y evitar el escape de las hormigas. Cada trampa fue enterrada al ras del suelo, y luego de 48 horas el contenido de las mismas fue removido y las hormigas separadas y preservadas en alcohol al 96% para su posterior identificación en el laboratorio. Todas las hormigas fueron identificadas a especies o morfoespecies con las claves de Kusnezov (1978) y otras claves disponibles para cada género disponibles en AntWeb (<https://www.antweb.org/>). Especímenes de referencia se depositaron en la colección entomológica de la FuEDEI, Hurlingham, Argentina.

Cebos

Los cebos son útiles para estudiar los patrones de descubrimiento de alimento, reclutamiento, estrategias de forrajeo y dominancia ecológica interespecífica de hormigas generalistas que forrajean en el suelo, excluyendo a especies que tengan otras preferencias alimenticias como las cortadoras de hojas o depredadoras especializadas (Fellers, 1987; Savolainen & Vepsäläinen, 1988; Andersen, 1997; Bestelmeyer et al., 2000). Se escogió la manteca de maní como fuente de alimento ya que es fácil de manipular y posee una alta permanencia en el cebo al no ser transportable de una vez por las hormigas al nido.

Se colocó un total de 176 cebos en los dos sitios. Cada cebo consistió en ~1 gramo de manteca de maní sobre una tarjeta plástica de 7 cm de diámetro. El plástico, a diferencia de las tarjetas de papel, impide que las hormigas forrajeen por debajo de la tarjeta, evitando así la partición del cebo (que distintas especies dominen las distintas caras del mismo), y promoviendo las interacciones. Los cebos se colocaron a lo largo de una transecta lineal en cada sitio, en los mismos lugares donde se habían colocado las trampas de caída y, al igual que éstas, estuvieron distanciados por 5 metros aproximadamente. Para evitar la interferencia de los cebos en las hormigas que caen en las trampas, los primeros fueron colocados siempre varias horas después de haber extraído las trampas. Vale la pena aclarar que el número de trampas no fue exactamente igual al número de cebos debido, en parte, debido a la imposibilidad de colocar trampas antes que cebos en algunas transectas, y también, porque algunas trampas fueron removidas por animales silvestres.

Se colocaron 116 cebos en la transecta del sitio 1 (todos los cebos se colocaron en la vegetación próxima al borde del camino de tierra) y 60 cebos en el sitio 2 a lo largo de dos transectas lineales separadas ~25 metros entre sí (una transecta de 30 cebos en el borde del bosque y otra de 30 cebos dentro del bosque). El diseño fue distinto en ambos sitios debido a que el sitio 1 no poseía un bosque paralelo al camino, sino solo vegetación arbustiva. Se identificó y contabilizó la cantidad de hormigas presentes en cada cebo desde que los mismos fueron colocados y luego cada 15 minutos, hasta 90 minutos. Es decir, se realizaron siete observaciones por cebo: a los 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos de colocado. Las observaciones se realizaron a la mañana (entre las 10 y las 12 hs) o a la tarde (entre las 17 y las 19 horas) para evitar la alta temperatura del mediodía, en la que la actividad general de las hormigas decae (solo son activas algunas especies termofílicas). Para

no interferir en las interacciones, no se extrajo ninguna obrera de los cebos para su posterior identificación durante los 90 minutos de observación (se colectaron algunas obreras al final de los 90 minutos). Adicionalmente se tomaron fotografías de los cebos para contar el número de obreras de cada especie presente. Asimismo, se relacionó la identidad de las especies de hormigas capturadas en cada trampa de caída con las presentes en el cebo asociado, para facilitar las identificaciones. Tanto *W. auropunctata* como *S. invicta*, las especies de mayor interés en este estudio, fueron siempre fácilmente identificadas *in situ*. También se video grabaron las distintas interacciones donde *W. auropunctata* participó para caracterizar posteriormente su comportamiento frente a la presencia de otras especies en los cebos. Las fotografías y video grabaciones de alta resolución se realizaron con una cámara fotográfica digital marca Nikon, modelo COOLPIX P500, con un zoom de 36X y 12,1 megapíxeles.

Observación de las interacciones en los cebos

Descubrimiento

La primera especie en contactar el cebo fue considerada la descubridora del mismo. La habilidad relativa para descubrir los cebos fue cuantificada por el método residual (LeBrun & Feener, 2007), que define el descubrimiento residual (DR) como el grado en el cual una especie se aleja de su valor de descubrimiento esperado según un modelo nulo. El modelo nulo es el número de cebos que se espera que descubra cada especie según su abundancia en el ambiente, si todas fueran igualmente hábiles descubridoras. Por lo tanto, el DR da una idea de la habilidad de descubrimiento de las especies independientemente de su abundancia. En el caso de cebos con presencia de más de una especie, se consideró como descubridora a la que poseía más de una obrera, asumiendo que la especie que reclutó más obreras llegó al cebo antes que las que no reclutaron. En los cebos donde solo había una obrera por especie no fue posible definir cuál fue la descubridora.

Reclutamiento

Una vez descubiertos los cebos, se registró la respuesta de reclutamiento cada 15 minutos y la proporción de cebos dominados por cada especie a los 90 minutos. Como en Morrison et al. (2000), una especie dominó un cebo cuando al menos 5 obreras fueron reclutadas y permanecieron

en el mismo por al menos 30 minutos, no estando presente más de 2 obreras de otras especies. Para cada especie, se comparó el número de cebos descubiertos con los dominados a los 90 minutos por medio de una prueba de bondad de ajuste, que analiza si las proporciones se ajustan a una distribución 1:1, es decir, si las frecuencias observadas no difieren de las esperadas por azar.

También se analizó el número de cebos en los que cada especie logró reclutar obreras masivamente, acaparando todo el cebo y sin dejar lugar para otra especie; este número depende del tamaño de las obreras, ya que si son pequeñas, necesitan más cantidad para acaparar el cebo. Por lo tanto en el caso de especies con obreras pequeñas (~1-2 mm), se consideró reclutamiento masivo a la presencia de más de 100 obreras en el cebo, y para especies con obreras más grandes (>5 mm), más de 30 obreras.

Usurpación de cebos

También se analizaron los intentos y éxitos de usurpación de los cebos por las distintas especies. Un intento de usurpar un cebo ocurrió cuando al menos 3 obreras de una segunda especie arribaron al cebo y permanecieron por lo menos 30 minutos. Si la especie usurpadora desplazaba a otra que estaba previamente dominando un cebo, reteniéndolo por al menos 30 minutos y reclutando al menos 5 obreras, se la consideró como reemplazo y se registró el resultado de la interacción como éxito de usurpación. Para cada especie que intentó usurpar un cebo se comparó el número de veces que intentó hacerlo con el número de veces que logró usurparlo exitosamente, por medio de pruebas de bondad de ajuste que analizan si las observaciones se ajustan a una proporción 1:1.

*Interacciones con *Wasmannia auropunctata**

A lo largo de los 90 minutos de observación, fue posible, en algunos cebos, registrar el resultado de más de una interacción entre distintas especies que iban llegando a los mismos. Para las especies que más frecuentemente interactuaron con *W. auropunctata*, se registró el número de veces que ganaban (dominaban a los 90 minutos o lograban usurparle un cebo) o perdían una interacción con ésta (eran desplazadas o luego de descubrir un cebo con presencia de *W. auropunctata* no lograban reclutar obreras o usurparlo, o directamente no intentaban hacerlo). Luego, se comparó el porcentaje de éxitos y fracasos entre *W. auropunctata* y sus principales

competidoras en los cebos mediante pruebas de bondad de ajuste, para analizar si la proporción se ajusta a 1:1.

Dominancia ecológica interespecífica

La dominancia ecológica (interespecífica) (DE'), definida como la habilidad para controlar un recurso (Davidson, 1998), fue calculada de dos maneras: 1) DE'c y el número de cebos y 2) DE't como la razón entre el número de cebos dominados por una especie y el número de trampas con dicha especie, como en LeBrun et al. (2007) y Calcaterra et al. (2008 y 2016). Las especies ecológicamente dominantes dominarán una mayor cantidad de cebos que lo esperado según su abundancia en el ambiente (Cerdá et al., 2013). Notar que no se debe confundir la DE' con la dominancia ecológica intraespecífica descrita para *W. auropunctata* en los capítulos anteriores.

Presencia de fóridos

Adicionalmente, se registró la presencia de moscas parasitoides del género *Phoridae* (fóridos) que atacaran hormigas en los cebos, para analizar su posible efecto sobre el resultado de las interacciones. Generalmente, la presencia de fóridos disminuye la eficacia de forrajeo de las especies hospedadoras, inhibiendo el reclutamiento de las hormigas a las fuentes de alimento, y permitiendo que otras hormigas de la comunidad accedan a los mismos (Calcaterra, et al., 2008).

Análisis estadísticos

La coexistencia de *W. auropunctata* con las especies más frecuentemente capturadas junto a ella se evaluó mediante una prueba de co-ocurrencia utilizando en programa Ecosim v.7.71 (Entsminger, 2014). Este análisis consiste en un modelo nulo que prueba si las especies co-ocurren por azar, a partir de los datos de presencia- ausencia de las trampas de caída. El estadístico C-score es el que mide la co-ocurrencia (Stone & Roberts, 1990). Si este valor es mayor al obtenido luego de realizar 5000 ensambles construidos al azar, dos especies coexisten menos de lo esperado por azar, lo que indica que existe competencia interespecífica; si C es igual a lo esperado por azar entonces las dos especies se distribuyen aleatoriamente; si C es menor al obtenido por azar, las especies superponen sus áreas de forrajeo (están agregadas). Las pruebas de bondad de ajuste se realizaron con el programa Past v.1.17 (Hammer et al., 2001).

Resultados

Caracterización del ensamble de hormigas

Se capturó un total de 2403 hormigas pertenecientes a 56 especies (o morfo especies), de 17 géneros y 5 subfamilias (Tabla 6.1). La especie más abundante, tanto espacial como numéricamente, fue *W. auropunctata*, con 332 obreras capturadas en 60 trampas, representando el 14% del total de hormigas capturadas (en el 55% del total de trampas colocadas). Las otras especies más abundantes fueron *Dorymyrmex breviscapis*, *Pheidole radoszkowskii*, *Solenopsis invicta*, *Pheidole obscurithorax*, *Camponotus rufipes*, y *Solenopsis* sp 1 (*Solenopsis* cf. *substituta*). Notar que la especie numéricamente más abundante fue en realidad *Pheidole* sp. 11 (Tabla 6.1); sin embargo, todas estas obreras cayeron en la misma trampa, la cual posiblemente se encontraba muy cercana a su nido, por lo que consideramos este valor de abundancia numérica como un *outlier*. La gran abundancia de *W. auropunctata* en un ensamble de hormigas muy rico (56 especies, 20 de las cuales aparecieron en más del 5% de las trampas) es una condición difícil de encontrar en el rango nativo de la especie, pero esencial para evaluar la habilidad competitiva de *W. auropunctata* en relación al resto de las hormigas del ensamble, para lo cual es necesario contar con la mayor cantidad de interacciones posibles con sus potenciales hormigas competidoras.

Las especies más frecuentemente capturadas junto con *W. auropunctata* fueron *D. breviscapis* (capturada en el 48% de las trampas donde también cayó *W. auropunctata*), *S. invicta* (en el 43%), *P. radoszkowskii* y *P. obscurithorax* (ambas en el 38%) y *C. rufipes* (en el 37%). Sin embargo, el análisis pareado de coexistencia con *W. auropunctata* no fue significativamente diferente de lo esperado por azar (Análisis de co-ocurrencia, $P > 0,05$).

Tabla 6.1. Lista de las especies de hormigas capturadas con trampas de caída en el sitio de estudio, Para cada especie se indica el número de trampas en las que fue capturada (abundancia espacial) y, entre paréntesis, el porcentaje de trampas respecto al total de trampas recuperadas. También se indica el número total de obreras capturadas en las trampas, lo cual es un índice de su abundancia numérica.

| Especie | No. de trampas con presencia (%) | No. de obreras capturadas |
|--|---|----------------------------------|
| <i>Wasmannia auropunctata</i> | 60 (54,5) | 336 |
| <i>Dorymyrmex breviscapis</i> | 51 (46,4) | 126 |
| <i>Pheidole radoszkowskii</i> | 44 (40) | 193 |
| <i>Solenopsis invicta</i> | 41 (37,3) | 180 |
| <i>Pheidole obscurithorax</i> | 38 (34,5) | 223 |
| <i>Camponotus rufipes</i> | 28 (25,5) | 52 |
| <i>Solenopsis</i> sp1 (cf. <i>substituta</i>) | 22 (20) | 227 |
| <i>Pheidole</i> sp7 | 18 (16,4) | 70 |
| <i>Acromyrmex striatus</i> | 16 (14,5) | 45 |
| <i>Forelius nigriventris</i> | 16 (14,5) | 72 |
| <i>Dorymyrmex</i> aff. <i>pulchellus</i> | 11 (10) | 13 |
| <i>Pheidole bergi</i> | 11 (10) | 25 |
| <i>Pheidole spininodis</i> | 11 (10) | 54 |
| <i>Kalathomyrmex emeryi</i> | 10 (9,1) | 35 |
| <i>Pheidole</i> sp1 | 10 (9,1) | 23 |
| <i>Pheidole aberrans</i> | 10 (9,1) | 17 |
| <i>Pheidole</i> cf. <i>guilelmimuelleri</i> | 9 (8,2) | 20 |
| <i>Dorymyrmex exsanguis</i> | 8 (7,3) | 25 |
| <i>Solenopsis interrupta</i> | 8 (7,3) | 42 |
| <i>Acromyrmex lundii</i> | 7 (6,4) | 10 |
| <i>Solenopsis substituta</i> | 7 (6,4) | 43 |
| <i>Atta vollenweideri</i> | 6 (5,5) | 11 |
| <i>Brachymyrmex</i> sp1 | 6 (5,5) | 10 |
| <i>Camponotus substitutus</i> | 6 (5,5) | 52 |
| <i>Brachymyrmex patagonicus</i> | 5 (4,5) | 11 |
| <i>Crematogaster quadriformis</i> | 5 (4,5) | 6 |
| <i>Nylanderia</i> sp2 | 5 (4,5) | 8 |
| <i>Trachymyrmex prinus</i> | 4 (3,6) | 5 |
| <i>Camponotus punctulatus</i> | 3 (2,7) | 4 |
| <i>Forelius rufus</i> | 3 (2,7) | 15 |
| <i>Nylanderia fulva</i> | 3 (2,7) | 3 |
| <i>Pheidole</i> sp3 | 3 (2,7) | 3 |
| <i>Pheidole</i> sp4 | 3 (2,7) | 8 |
| <i>Pheidole</i> sp5 | 3 (2,7) | 8 |
| <i>Pheidole</i> sp6 | 3 (2,7) | 12 |
| <i>Camponotus punctulatus cruentus</i> | 2 (1,8) | 6 |
| <i>Camponotus</i> sp1 | 2 (1,8) | 4 |
| <i>Crematogaster</i> sp1 | 2 (1,8) | 2 |
| <i>Forelius brasiliensis</i> | 2 (1,8) | 8 |

| | | |
|-------------------------------|-------------|-------------|
| <i>Pheidole</i> sp10 | 2 (1,8) | 8 |
| <i>Pheidole</i> sp9 | 2 (1,8) | 2 |
| <i>Pheidole triconstricta</i> | 2 (1,8) | 9 |
| <i>Camponotus bonaerensis</i> | 1 (0,9) | 1 |
| <i>Camponotus mus</i> | 1 (0,9) | 1 |
| <i>Cephalotes</i> sp | 1 (0,9) | 1 |
| <i>Ectatoma brunneum</i> | 1 (0,9) | 1 |
| <i>Ectatoma edentatum</i> | 1 (0,9) | 1 |
| <i>Forelius pusillus</i> | 1 (0,9) | 1 |
| <i>Myrmicocrypta</i> sp | 1 (0,9) | 1 |
| <i>Neivamyrmex pertii</i> | 1 (0,9) | 11 |
| <i>Neivamyrmex</i> sp1 | 1 (0,9) | 2 |
| <i>Pheidole bruchella</i> | 1 (0,9) | 5 |
| <i>Pheidole</i> sp11 | 1 (0,9) | 350 |
| <i>Pheidole</i> sp8 | 1 (0,9) | 1 |
| <i>Solenopsis</i> sp2 | 1 (0,9) | 1 |
| Total | 110* | 2403 |

*Total de trampas recuperadas

Hormigas atraídas a los cebos

Un total de 11 especies de hormigas fueron atraídas a los cebos (Tabla 6.2). Las especies del género *Pheidole* fueron en conjunto las que más visitaron los cebos. Sin embargo, dentro de las especies identificadas, *W. auropunctata* fue la más atraída, siendo registrada en el 29,5% de los cebos (52/176 cebos), seguida por *S. invicta* (25,6%) y *Camponotus* sp. (21%) (Tabla 6.2). El 32% de los cebos atrajo a una sola especie y el 65% a más de una especie, dando lugar a diversas interacciones; el 3% restante no atrajo a ninguna hormiga.

Tabla 6.2. Hormigas más atraídas a los cebos colocados en Loreto, Santiago del Estero. Se indica el número de cebos que cada especie visitó y entre paréntesis el porcentaje respecto al total de cebos colocados.

| Especie/género | No. de cebos (%) |
|--|-------------------------|
| <i>Pheidole</i> sp | 120 (68,2) |
| <i>Wasmannia auropunctata</i> | 52 (29,5) |
| <i>Solenopsis invicta</i> | 45 (25,6) |
| <i>Camponotus</i> sp. | 37 (21,0) |
| <i>Dorymyrmex breviscapis</i> | 27 (15,3) |
| <i>Solenopsis</i> sp. 1 (cf. <i>substituta</i>) | 27 (15,3) |
| <i>Acromyrmex</i> sp. | 21 (11,9) |

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| <i>Crematogaster quadriformis</i> | 18 (10,2) |
| <i>Nylanderia fulva</i> | 17 (9,7) |
| <i>Crematogaster</i> sp. 1 | 3 (1,7) |
| <i>Brachymyrmex</i> sp. | 2 (1,1) |

Participación en los cebos

La tabla 6.3 caracteriza la participación de cada especie en los cebos: el número de cebos descubierto por cada una, el número de cebos dominados luego de 90 minutos, el número de cebos donde cada especie logró reclutar obreras masivamente y los intentos y éxitos de usurpación de un cebo por cada especie.

Tabla 6.3. Número de cebos descubiertos, dominados a los 90 minutos, con reclutamiento masivo. Número de intentos de usurpación, y cuántos de esos intentos fueron exitosos.

| Especie | Número de cebos | | | | |
|---|-----------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|-----------|
| | Descubiertos | Dominados a los 90 min. | Con reclutamiento masivo | Con intentos de usurpación | Usurpados |
| <i>W. auropunctata</i> | 21 | 11 | 7 | 10 | 1 |
| <i>S. invicta</i> | 11 | 24 | 27 | 13 | 12 |
| <i>Pheidole</i> sp | 77 | 67 | 69 | 8 | 2 |
| <i>C. quadriformis</i> | 11 | 7 | 5 | 0 | 0 |
| <i>Solenopsis</i> sp 1 (cf. <i>substituta</i>) | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>D. breviscapis</i> | 9 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>N. fulva</i> | 4 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| <i>Camponotus</i> sp | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Acromyrmex</i> sp | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Descubrimiento

Si bien el género *Pheidole* fue el más atraído a los cebos (68,2%) y descubrió una alta proporción de los mismos (64%, Tabla 6.3), este valor incluye diversas especies del género no identificadas *in situ*, por lo que *Pheidole* sp. fue excluida del cálculo de DR. La especie mejor descubridora, fue *C. quadriformis* (DR = 9,3), seguido por *N. fulva* (DR = 1,28). Estas dos especies

descubrieron más cebos de lo esperado según su abundancia en el ensamble, si todas las especies fueran igualmente hábiles descubridoras (Figura 6.2). La habilidad de *W. auropunctata* para descubrir un cebo fue similar a la esperada según su abundancia (DR = 0,63). Por el contrario, las descubridoras menos eficientes fueron *S. invicta* (DR = -2,92), *Solenopsis* sp.1 (DR = -5,71) y *D. breviscapis* (DR = -8,31).

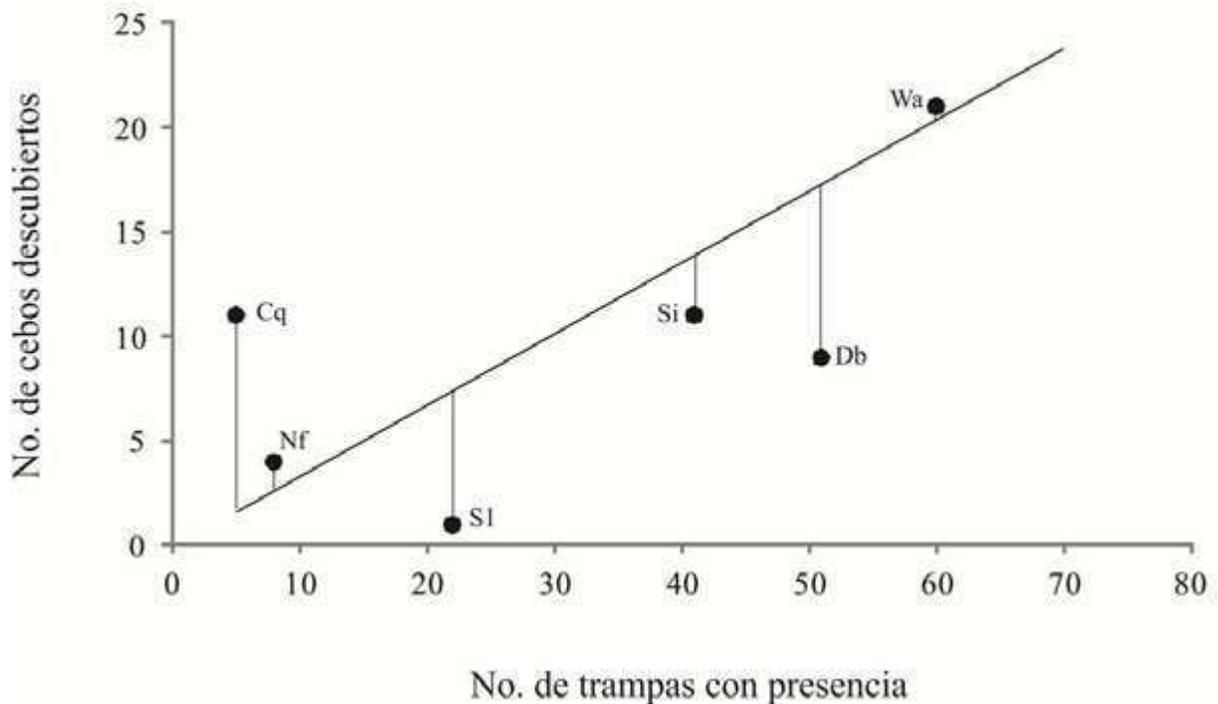


Figura 6.2. Descubrimiento residual (DR) de cada especie identificada en los cebos. La línea representa el modelo nulo, es decir el número de descubrimientos esperados para cada especie según su abundancia en el ambiente si todas son igualmente hábiles descubridoras. Cada punto representa el número de descubrimientos observados. La diferencia entre lo esperado y lo observado constituye el DR. Cq: *Crematogaster quadriformis*, Db: *Dorymyrmex breviscapis*, Nf: *Nylanderia fulva*, Si: *Solenopsis invicta*, S1: *Solenopsis* sp. 1 y Wa: *Wasmannia auropunctata*.

Reclutamiento

Solo dos especies dominaron más cebos de los que descubrieron: *S. invicta* ($\chi^2 = 10,76$; gl = 1; $P < 0,05$) y *D. breviscapis* ($\chi^2 = 6,4$; gl = 1; $P < 0,05$) (Tabla 6.2; Figura 6.3). *Wasmannia auropunctata* dominó menos cebos de los que descubrió, pero estas diferencias no resultaron

significativas ($\chi^2 = 3,125$; $gl = 1$; $P > 0,05$). *Crematogaster quadriformis* tampoco presentó diferencias entre dominar y descubrir ($\chi^2 = 0,346$; $gl = 1$; $P > 0,05$). *Solenopsis* sp 1 dominó y descubrió solo un cebo y *N. fulva* descubrió 4 cebos y no dominó ninguno luego de los 90 minutos. No fue posible realizar pruebas estadísticas con estas dos últimas especies debido a la escasa cantidad de datos.

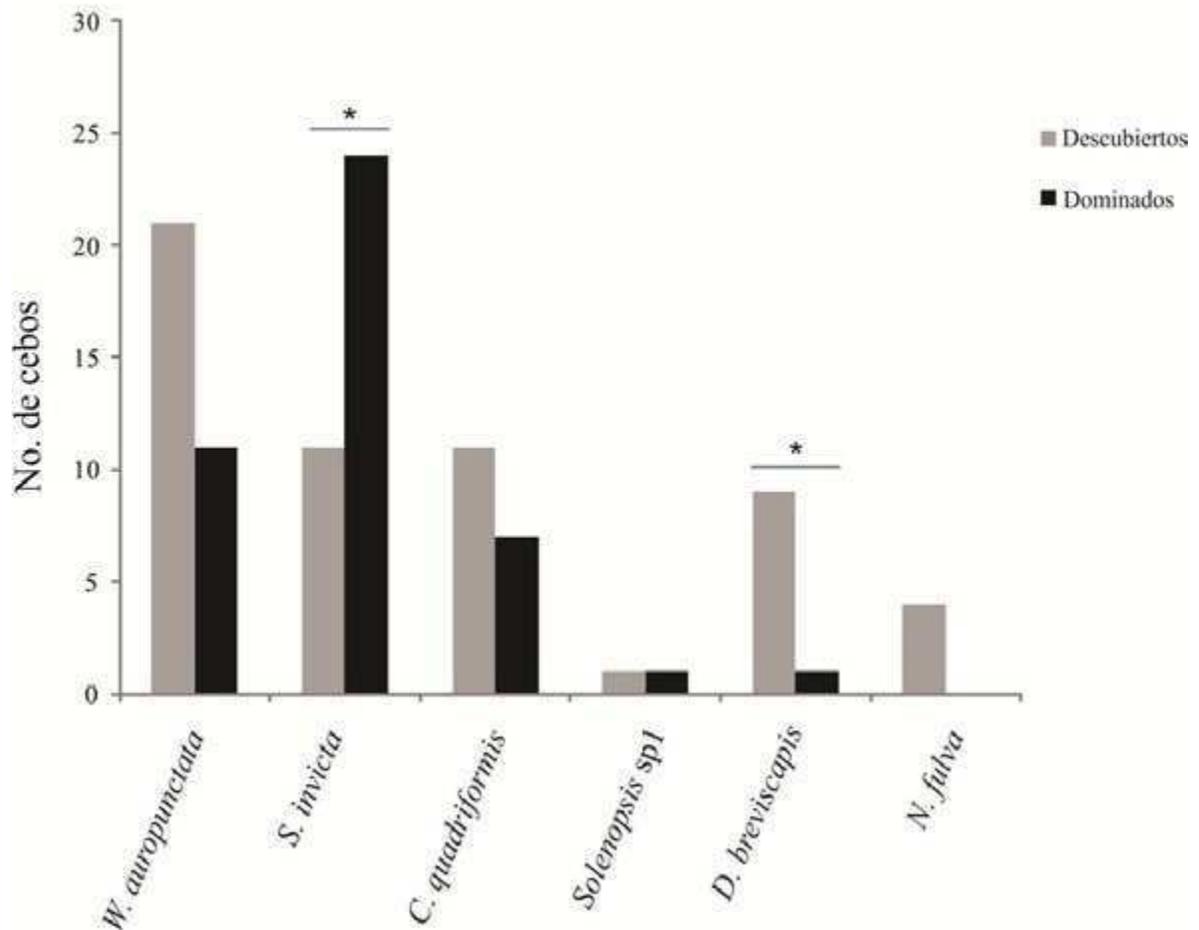


Figura 6.3. Número de cebos descubiertos y dominados, luego de 90 minutos, por las seis especies más atraídas a los cebos, sin considerar las especies de *Pheidole*. *: $P < 0,05$ (Prueba de Bondad de Ajuste).

Wasmannia auropunctata (obreras pequeñas) tuvo oportunidad de reclutar masivamente en el 13% de los cebos en los que participó (7 de 52). *Solenopsis invicta*, en cambio (obreras grandes), reclutó masivamente en el 60 % del los cebos que visitó (27 de 45), *Pheidole* sp (obreras grandes), reclutó masivamente en el 58% de los cebos (69 de 120), *C. quadriformis* (obreras

grandes) en el 28% (5 de 18) y *Solenopsis* sp1 (obreras pequeñas) en solo un cebo (el 4%). Ninguna de las otras especies comunes en los cebos, reclutó obreras masivamente (Tabla 6.2).

Usurpación de cebos

Cinco especies intentaron usurpar cebos dominados por otras especies. La que más intentó usurpar cebos fue *S. invicta* (Tabla 6.3), siendo exitosa en el 92% de los intentos (Figura 6.4), lo cual revela que es una usurpadora exitosa, ganando más de lo esperado por azar ($\chi^2 = 9,3$; gl = 1; $P < 0,01$). Sus únicos fracasos fueron contra especies de *Pheidole* (de 6 intentos, fracasó solo en uno, donde si bien logró disminuir el número de obreras de *Pheidole* sp, no logró desplazarlas totalmente). *Solenopsis invicta* intentó desplazar a *W. auropunctata* en 8 oportunidades, con un éxito del 100%.

La especie que sigue en orden de intentos de usurpar cebos fue *W. auropunctata*, con 10 intentos (4 contra *S. invicta*, 5 contra *Pheidole* sp y uno contra *Solenopsis* sp 1), de los cuales ganó solo uno (contra *Solenopsis* sp 1), es decir el 10% de los intentos (Figura 6.4, Tabla 6.2), por lo que su éxito de usurpación fue significativamente bajo, perdiendo más de lo esperado por azar ($\chi^2 = 6,4$; gl = 1; $P < 0,05$). Por otro lado, *S. invicta* fue significativamente más exitosa que *W. auropunctata* al usurpar cebos ($\chi^2 = 9,307$; gl = 2; $P < 0,05$).

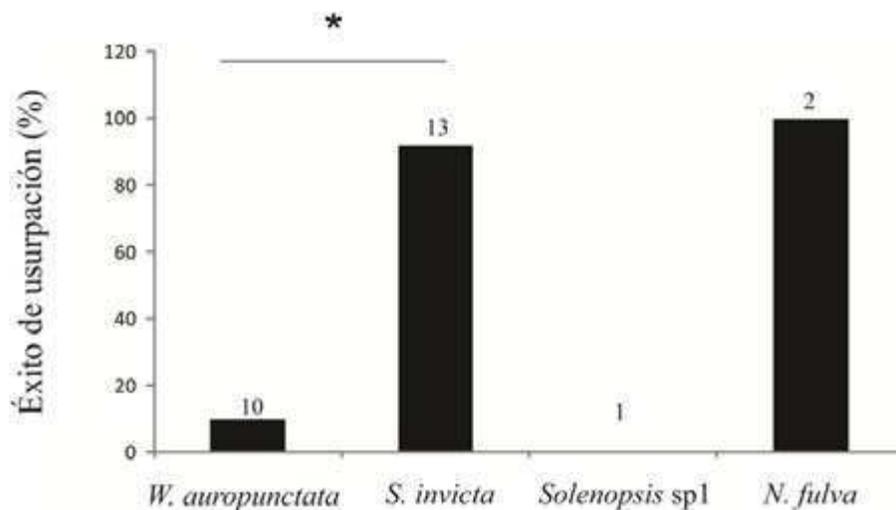


Figura 6.4. Éxito de usurpación de cebos de las especies que intentaron usurpar, sin considerar a *Pheidole* sp, expresado como el porcentaje de cebos que cada especie logró usurpar con respecto al total de intentos de usurpación (indicados por encima de cada barra). *: $P < 0,05$.

Interacciones con *Wasmannia auropunctata*

Wasmannia auropunctata interactuó con al menos una especie en el 94% de los cebos donde se la registró (49 de 52), lo cual representa el 28% del total de cebos colocados. La mayoría de las interacciones fueron con especies de *Pheidole* (14%), seguido de *S. invicta* (9%), y en menor medida con *Solenopsis* sp1, *N. fulva*, *Camponotus* sp., *C. quadriformis* y *D. breviscapis* (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Número de interacciones entre *Wasmannia auropunctata* y otras especies en los cebos. Se indica el número de ocasiones donde *W. auropunctata* perdió, ganó y empató una interacción.

| Contrincante | No. interacciones que <i>W. auropunctata</i> | | | Total |
|------------------------|--|-----------|----------|-----------|
| | Pierde | Gana | Empata | |
| <i>Pheidole</i> sp | 14 | 10 | 1 | 25 |
| <i>S. invicta</i> | 13 | 2 | 1 | 16 |
| <i>Solenopsis</i> sp 1 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| <i>N. fulva</i> | 2 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Camponotus</i> sp | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>C. quadriformis</i> | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>D. breviscapis</i> | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Total | 31 | 15 | 3 | 49 |

En la figura 6.5 se puede observar el resultado de las interacciones observadas en los cebos entre *W. auropunctata* y el resto de las especies del ensamble. Del total de 25 interacciones con especies de *Pheidole*, *W. auropunctata* ganó el 40%, perdió el 56% y empató el 4%, sugiriendo que *W. auropunctata* tiene la misma probabilidad de ganar o perder que las especies de *Pheidole* ($\chi^2 = 0,67$; gl = 1; $P > 0,05$). Es importante notar que en este cálculo se está suponiendo que todas las especies de *Pheidole* se comportan igual frente a *W. auropunctata*, lo cual podría no ser cierto. Por lo tanto, se recomienda tomar este resultado con cautela. Al disputar un cebo con *S. invicta* (16 cebos en total), *W. auropunctata* ganó solo el 13% (2 cebos), perdió el 81% (13 cebos) y empató el 6% (1 cebo), sugiriendo que la probabilidad de *S. invicta* para ganar un cebo es mayor que la de *W. auropunctata* ($\chi^2 = 10,83$; gl = 1; $P < 0,05$; Figura 6.5). A pesar de observar un comportamiento agresivo de *W. auropunctata* contra *S. invicta* al disputar un cebo, *S. invicta* fue siempre competitivamente superior, logrando desplazarla de todos los cebos (ej. Figura 6.6). En 7 de estos 16 cebos se detectó la presencia de fóridos (moscas parasitoides de *S. invicta*), pero no tuvieron

ningún efecto sobre el resultado de las interacciones. Es decir, en ninguno de los cebos donde se registraron fórdidos se registró la victoria de *W. auropunctata*.

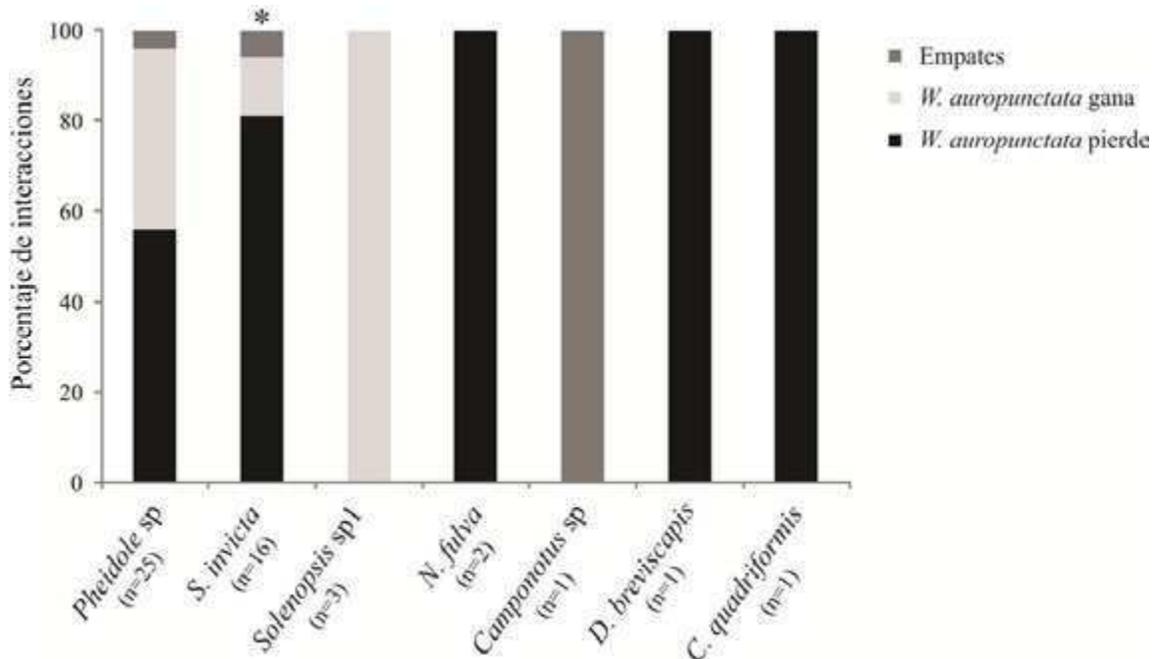


Figura 6.5. Porcentaje de éxitos y fracasos de *W. auropunctata* al disputar un cebo con otras especies. Al lado de cada especie se indica el número de interacciones con *W. auropunctata*. *: $P < 0,05$ (Prueba de Bondad de Ajuste).

El resto de las interacciones no presentó un tamaño muestral suficiente para analizar su significancia. Sin embargo, se observó que *W. auropunctata* perdió en los dos encuentros que tuvo con *N. fulva*, ya que en los dos casos en los que apareció esta especie, ambos al caer la noche, al final de las observaciones, disminuyó la cantidad de obreras de *W. auropunctata* en el cebo. En uno de los cebos observamos cómo obreras de *N. fulva* tomaban obreras de *W. auropunctata* en sus mandíbulas retirándolas del mismo y *W. auropunctata* adoptando un comportamiento sumiso. *W. auropunctata* también perdió el único encuentro que tuvo con *D. breviscapis*, ya que luego de descubrir el cebo dominado por esta especie, no reclutó obreras. Tampoco fue capaz de reclutar obreras en un cebo dominado por *C. quadriiformis*. La única especie que *W. auropunctata* logró desplazar de los cebos fue *Solenopsis* sp 1, en las 3 interacciones registradas, en las que se observó que cuando *W. auropunctata* reclutaba obreras, la cantidad de obreras de *Solenopsis* sp 1 disminuía.



Figura 6.6. Imagen de una interacción entre *Wasmannia auropunctata* (obreras pequeñas) y *S. invicta* en un cebo (obreras grandes) a los 15, 30 y 45 minutos de colocado el cebo. El mismo había sido descubierto por *W. auropunctata*, la cual había reclutado 35 obreras. **a)** A los 15 minutos *S. invicta* reclutó obreras intentando usurparlo. Las obreras de *W. auropunctata* están por debajo de las de *S. invicta*. Al costado izquierdo también hay una obrera de *Camponotus* sp. Se puede observar el comportamiento agresivo de *W. auropunctata* hacia *S. invicta*, tratando de picar una obrera (círculo rojo). **b)** A los 30 minutos *S. invicta* desplazó totalmente a *W. auropunctata*. **c)** A los 45 minutos se ve mayor reclutamiento de *S. invicta* y una obrera de *W. auropunctata* por fuera (círculo verde).

Dominancia ecológica interespecífica (DE')

La especie con mayor dominancia ecológica fueron *C. quadriformis*, al considerar la abundancia espacial a partir de las trampas de caída, y *S. invicta*, al considerar la presencia en los cebos (Tabla 6.5). *Wasmannia auropunctata* ocupó el tercer lugar, tanto considerando la abundancia en trampas de caída o la presencia en los cebos. Luego le siguieron *Solenopsis* sp 1, *D. breviscapis* y por último *N. fulva*.

Tabla 6.5. Valores utilizados para calcular la Dominancia Ecológica (DE') de las especies que más participación mostraron en los cebos, excluyendo a *Pheidole* sp y *Camponotus* sp. Para cada especie se indica el número de cebos dominados luego de los 90 minutos, la abundancia espacial calculada a partir de las trampas (número de trampas donde la especie fue capturada) y calculada a partir de los cebos (número de cebos visitados por la especie). Luego, la DE' se calculó a partir de las trampas ($DE't = \text{Número de cebos dominados} / AE_{\text{trampas}}$) y de los cebos ($DE'c = \text{Número de cebos dominados} / AE_{\text{cebos}}$).

| Especie | No. Cebos dominados | Abundancia Espacial | | Dominancia Ecológica | |
|------------------------|---------------------|---------------------|-------|----------------------|------|
| | | trampas | cebos | DE't | DE'c |
| <i>S. invicta</i> | 24 | 41 | 45 | 0.59 | 0.53 |
| <i>C. quadriformis</i> | 7 | 5 | 18 | 1.4 | 0.39 |
| <i>W. auropunctata</i> | 11 | 60 | 52 | 0.18 | 0.21 |
| <i>Solenopsis</i> sp 1 | 1 | 22 | 27 | 0.05 | 0.04 |
| <i>D. breviscapis</i> | 1 | 51 | 27 | 0.02 | 0.04 |

Discusión

En este capítulo se logró analizar el comportamiento de *W. auropunctata* en su rango nativo en un ensamble sumamente diverso, donde *W. auropunctata* fue la especie numérica y espacialmente más abundante. Encontrar tal abundancia de en un ensamble de hormigas tan rico (56 especies capturadas, en solo 126 trampas de caída) fue una condición excepcional dado que, como se vio en los capítulos anteriores, la alta abundancia y dominancia ecológica de *W. auropunctata* se asocia a hábitats antrópicos, donde la comunidad de hormigas es pobre. Adicionalmente, conseguir un 28% de interacciones entre *W. auropunctata* y otras especies también fue excepcional, debido a que en general, *W. auropunctata* es territorial y solo domina cebos presentes dentro del territorio de nidificación de su supercolonia, sin dar lugar a interacciones (resultados preliminares de esta tesis y Delsinne et al., 2007). Debido a esta condición difícil de encontrar en la naturaleza, es que hasta el momento no fue posible replicar el mismo estudio en otro sitio, lo cual enriquecería ampliamente las conclusiones obtenidas aquí. Sin embargo, el presente capítulo constituye una valiosa primera aproximación a la pregunta y los resultados obtenidos representan la primera evidencia del comportamiento de *W. auropunctata* en un ensamble local de su rango nativo. Debido a que el ensamble estudiado aquí pertenece a la ecorregión del Chaco Seco, la cual, como se vio en el capítulo 2, no constituye el hábitat principal de *W. auropunctata*, sería interesante repetir estos análisis en un sitio más representativo de su rango nativo, o bien en un sitio con otra composición de especies u otras condiciones climáticas, para reforzar las conclusiones aquí obtenidas.

Si bien las especies más asociadas con *W. auropunctata*, según las trampas de caída, fueron *D. breviscapis*, *S. invicta*, *P. radoszkowskii*, *P. obscurithorax* y *C. rufipes*, la mayoría de las interacciones en los cebos las protagonizó junto con *Pheidole* spp. y *S. invicta*, y en menor medida con *Solenopsis* sp 1 (cf. *substituta*) y *N. fulva*. Esto sugiere que *W. auropunctata* no compite significativamente con *D. breviscapis* y *C. rufipes* por los mismos recursos alimenticios, pero sí con *Pheidole* spp. y *S. invicta*, donde hubo una clara competencia por interferencia.

Debido a que no se pudo diferenciar las especies de *Pheidole in situ*, no se pueden sacar conclusiones acerca de si *W. auropunctata* es mejor o peor competidora que cada una de las especies de *Pheidole* en particular. Al tratarlas todas juntas, no presentaron diferencias con *W. auropunctata* en la habilidad para obtener un recurso. Sin embargo, este resultado podría cambiar,

si se tratara cada especie por separado. Del total de interacciones con *S. invicta*, *W. auropunctata* perdió la mayoría. Los únicos dos casos donde se considera que “ganó” la fuente de alimento por sobre *S. invicta*, fueron casos en los que ésta última no reclutó obreras, es decir se registró la presencia de una sola obrera de *S. invicta* al principio y luego ausencia de la misma. Es decir que no hubo en estos dos casos un intento de *S. invicta* por desplazar a *W. auropunctata*. Al contrario, en todos los casos en los que *S. invicta* intentó desplazar a *W. auropunctata*, tuvo éxito, demostrando ser una especie extirpadora, competitivamente superior a *W. auropunctata*.

La superioridad de *S. invicta* sobre *W. auropunctata* se observó con o sin la presencia de fóridos que atacaran a *S. invicta*. Si bien los parasitoides provocaban una disminución en la cantidad de obreras de *S. invicta* que estaban en el cebo, en ningún caso esto fue suficiente para que *W. auropunctata* lograra dominarlo. Por el contrario, *W. auropunctata* fue mejor descubridora de cebos que *S. invicta*, lo cual sugiere que existiría algún tipo de compromiso entre ambas especies que facilitaría su coexistencia.

En muchas de las interacciones entre *W. auropunctata* y *S. invicta* se observó agresión entre las mismas. A pesar de que *W. auropunctata* mordía e intentaba picar con su aguijón a *S. invicta*, no lograba desplazarla. En uno de los cebos se observó un comportamiento peculiar de *W. auropunctata*: mientras obreras de *S. invicta* traían materia orgánica y tapaban el cebo, un comportamiento común en esta especie (Calcaterra et al., 2008), obreras de *W. auropunctata* traían cabezas de hormigas muertas (aparentemente de *S. invicta*, aunque no podemos asegurarlo) (Figura 6.7c y d). Kusnezov (1951) observó cadáveres de hormigas coloradas en nidos de *W. auropunctata*, sugiriendo que se alimenta de cadáveres de insectos. Por lo tanto, es probable que *W. auropunctata* traiga las cabezas de *S. invicta* de su propio nido. Varias especies de hormigas rechazan el basurero que genera su colonia, el cual contiene además de desechos, cuerpos de hormigas muertas, por lo tanto, traer hormigas muertas al cebo podría estar asociado a provocar la retirada de la especie enemiga del mismo. Sería interesante evaluar esta hipótesis en futuros estudios, y así contribuir a entender mejor el comportamiento de *W. auropunctata* y de otras especies de hormigas con comportamientos similares.

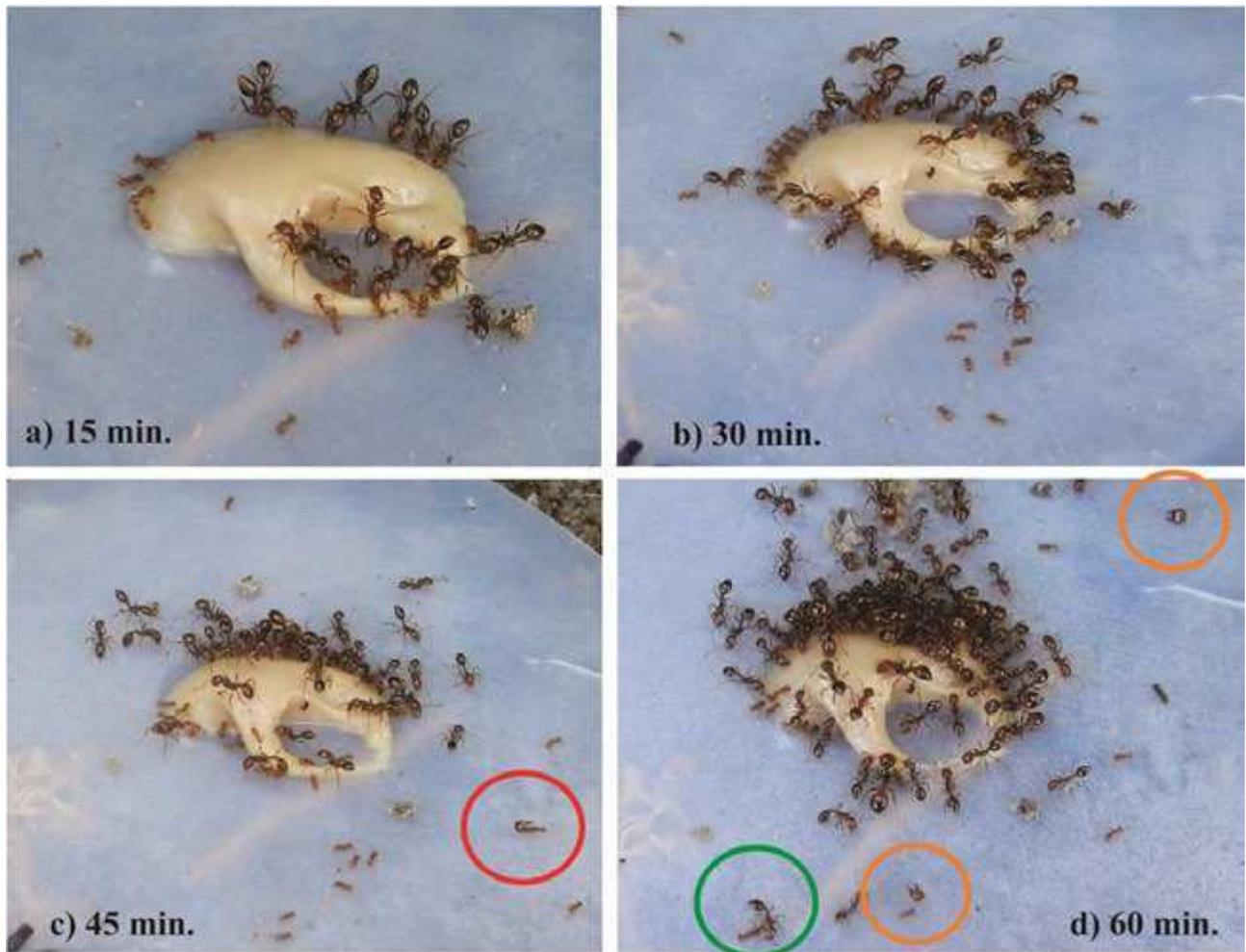


Figura 6.7. Interacción entre *W. auropunctata* y *S. invicta* en un cebo. El cebo había sido descubierto por *W. auropunctata*, pero a los 15 minutos *S. invicta* intentaba desplazarla. A los 45 minutos se observa a *W. auropunctata* trayendo una cabeza de *S. invicta* en sus mandíbulas (círculo rojo) y depositándola alrededor del cebo. A los 60 minutos se observan más cabezas de *S. invicta* alrededor del cebo traídas por obreras de *W. auropunctata* (círculos naranjas). Se observa también agresión entre ambas especies (círculo verde).

Como era de esperar, *W. auropunctata* no fue buena descubridora ya que presentó la habilidad para descubrir esperada según su abundancia en el ambiente. Por otro lado, a pesar de ser la especie más abundante, su dominancia ecológica interespecífica (DE') (excluyendo a *Pheidole* spp.) fue intermedia comparado con las otras especies del ensamble. Esto corrobora la hipótesis, de que *W. auropunctata* posee una baja habilidad competitiva.

La población de *W. auropunctata* estudiada en este ensamble poseía una organización social supercolonial, un sistema de reproducción clonal y una dominancia (intraespecífica) intermedia; es decir, a pesar de que se encontraron pocos nidos, cada nido poseía una densidad de

reinas, obreras y crías relativamente alta. Sin embargo, al analizar las interacciones de *W. auropunctata* con el resto de las especies, ésta presentó una muy baja capacidad para desplazar a otras especies de las fuentes de alimento y perdió la mayoría de las interacciones, ya sea porque era desplazada de los cebos, o porque no lograba reclutar obreras en cebos que estaban dominados por otra especie. Los únicos cebos que logró dominar, fueron aquellos que descubrió rápidamente y por lo tanto reclutó obreras rápidamente. En general, los cebos dominados por *W. auropunctata*, con ~100-200 obreras, no sufrían un intento de usurpación por parte de otras especies. Esto ocurría si los cebos se encontraban cerca de sus sitios de nidificación, comportándose como una especie oportunista (como propuesto Achury et al. (2008)), pero nunca como extirpadora, como había sido propuesto por Delsinne et al. (2007) y rechazado por Vonshak et al. (2012). Por el contrario cuando las fuentes de alimento se encuentran más lejos de sus nidos, *W. auropunctata* tarda más en llegar a las fuentes de alimento, al no lograr reclutar un gran número de obreras rápidamente es fácilmente desplazada y en los casos donde logra permanecer en el cebo se comporta como insinuada.

Por todo esto, los resultados obtenidos sugieren que *W. auropunctata* tiene una habilidad competitiva baja en ensamblajes ricos, a pesar de formar supercolonias y poseer reproducción clonal. Los resultados obtenidos aquí, corroboran la hipótesis de que *W. auropunctata* no domina sitios gracias a que posee la capacidad de desplazar a otras especies del ensamblaje.

En sitios naturales, como el Camping Machuca en Corrientes, donde *W. auropunctata* tiene una organización social multicolonial y un sistema de reproducción sexual, su abundancia y habilidad competitiva es muy baja (Calcaterra 2010). La riqueza específica del ensamblaje en el Camping Machuca era similar a la presente en el ensamblaje analizado aquí. Sin embargo, la perturbación del ambiente, junto con la formación de una supercolonia y la reproducción clonal en Loreto, parecen jugar un papel importante al permitirle alcanzar cierta dominancia numérica, pero no son características suficientes para que *W. auropunctata* sea dominante competitivamente. La dominancia (intraespecífica) parece ser una consecuencia de la exclusión de sus competidores en ambientes altamente perturbados, como había sido previamente observado por Foucaud et al. (2009).

CAPÍTULO 7

Conclusiones generales

Esta tesis constituye un estudio integral acerca de los procesos evolutivos que sufrió la pequeña hormiga de fuego *W. auropunctata* en su rango nativo desde su origen hasta su actual distribución a lo largo del Neotrópico, con especial énfasis en las poblaciones ubicadas en el límite sur de su distribución nativa. En general, el presente trabajo de investigación constituye una prueba de cómo la historia evolutiva de *W. auropunctata* ha influenciado su capacidad de colonización y destaca que su exitoso establecimiento en la región Mediterránea es el resultado de un proceso evolutivo que primero se llevó a cabo dentro de su área de distribución nativa.

***Wasmannia auropunctata* posee poblaciones con características invasivas en el límite sur de su distribución nativa**

A partir de los muestreos realizados en esta tesis, se encontró que *W. auropunctata* está ampliamente distribuida en Argentina, principalmente en ambientes antrópicos, (altamente perturbados). Aunque en menor medida, también fue encontrada en bosques (primarios o secundarios) a lo largo de la planicie de inundación del Río Paraná y en los Esteros del Iberá, en el noreste de Argentina. Si bien estos ambientes son principalmente naturales, están sometidos periódica y naturalmente a perturbaciones dadas por el aumento en el nivel del agua. En menor medida aún, *W. auropunctata* fue encontrada en ambientes naturales sin perturbación humana (bosques primarios); siendo muy rara y difícil de encontrar en estos hábitats, y por lo tanto difícil también de estudiar.

Se corroboró que en el límite sur de distribución nativa, *W. auropunctata* posee poblaciones con características similares a las del rango introducido y que el patrón observado en el norte de Sudamérica por Foucaud et al. (2009) se repite en el sur del continente. Es decir, en el sur de Sudamérica, existen poblaciones ecológicamente dominantes (con alta densidad de nidos, obreras, reinas y crías), asociadas mayormente a ambientes antrópicos, y no dominantes asociadas principalmente a ambientes naturales (con bajo nivel de perturbación). En los sitios con perturbación media, las poblaciones fueron mayormente no dominantes, aunque hubo mayor proporción de poblaciones dominantes que en los sitios de perturbación baja (Figura 7.1a).

El sistema reproductivo en el límite sur de distribución nativa de *W. auropunctata* fue principalmente clonal, y la clonalidad estuvo asociada a los ambientes altamente perturbados

(antrópicos). En estas poblaciones, las reinas presentes en distintos nidos dentro de un mismo *cluster* compartían el mismo genotipo, perteneciendo al mismo linaje clonal. Los ambientes medianamente perturbados presentaron sistemas de reproducción mixto y clonal en casi la misma proporción. En el sistema mixto, cada nido individual es clonal, pero los nidos dentro de un *cluster* pertenecían a distintos linajes clonales; es decir, estas poblaciones sufren periódicamente eventos de reproducción sexual que provocan que la diversidad clonal en estos sitios sea mayor a la diversidad clonal (prácticamente nula) en los sitios antrópicos. Contrariamente, los sitios con bajo nivel de perturbación (naturales), solo presentaron reproducción sexual (Figura 7.1b). Estos sitios estuvieron limitados al noreste de Argentina, en Misiones y el norte de Corrientes, lo cual corresponde a la Selva Paranaense y la transición a la ecorregión del Espinal. Es interesante notar que el sistemas de reproducción sexual está mayormente representado en los ambientes naturales, el mixto en los medianamente perturbados, y el clonal en los ambientes antrópicos, o altamente perturbados.

En cuanto al sistema de organización social, como era de esperar, la mayoría de las poblaciones fue supercolonial independientemente del nivel de perturbación del ambiente. Sin embargo, se observó que la diferencia en la proporción de poblaciones multicoloniales/supercoloniales fue menor en los sitios de perturbación baja, haciéndose más pronunciada en los sitios medianamente y altamente perturbados (Figura 7.1c), lo cual sugiere que la supercolonialidad es una característica más común en ambientes perturbados que naturales. Las supercolonias en Argentina tuvieron un tamaño mucho menor a las de las poblaciones introducidas, al igual que lo observado en el norte de Sudamérica por Foucaud et al. (2009) y Le Breton et al. (2004). En general, cada linaje clonal formó una supercolonia, y nunca una supercolonia abarcó más de una localidad: la supercolonia más grande solo se extendió a lo largo de una transecta de 500 metros (en el Camping Las Tejas, Zárate, provincia de Buenos Aires). Normalmente, los nidos empezaron a mostrar agresión a partir de una distancia promedio de 300 metros, sin importar si pertenecían o no al mismo linaje clonal, lo cual sugiere, que en el rango nativo, dos nidos cooperarán entre sí, y no mostrarán agresión, si pertenecen al mismo linaje clonal pero a la vez se encuentran próximos entre sí. Será interesante analizar en el futuro qué factores existen en el rango nativo, ausentes en el rango introducido, que limita el tamaño de las supercolonias.

La presencia de poblaciones de características invasoras en Argentina, particularmente en la posible población fuente de la introducción de *W. auropunctata* en la región Mediterránea (la

población del camping Las Tejas, Zárate; particularmente el *cluster* Wa-45), apoya el escenario de invasión propuesto por Foucaud et al. (2010a) para esta especie, quienes sugieren que las poblaciones introducidas se originan a partir de poblaciones nativas dominantes, con un sistema de reproducción clonal, y mayormente organización supercolonial, es decir poblaciones con características similares a las presentes en el rango introducido.

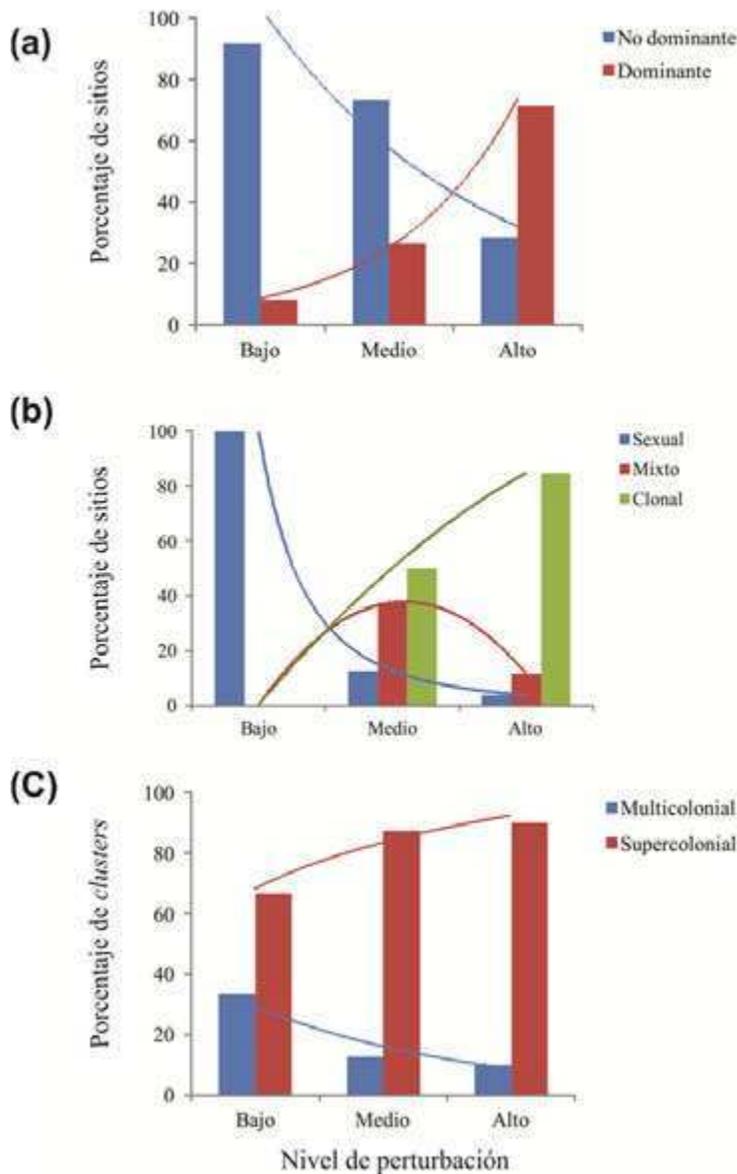


Figura 7.1. Porcentaje de sitios con poblaciones dominantes y no dominantes (a), con cada tipo de sistema de reproducción (sexual, mixto y clonal) (b) y porcentaje de *clusters* cada tipo de sistema de organización (multicolonial y supercolonial) (c) en sitios con distinto nivel de perturbación (bajo, medio y alto). A modo descriptivo se grafican líneas de tendencia para cada variable.

Escenario de invasión de Wasmannia auropunctata

Aunque por el momento solo puede tratarse como una tendencia el hallazgo de poblaciones con sistema de reproducción mixto principalmente en sitios medianamente perturbados, como las planicies de inundación, constituye un resultado valioso de esta tesis. Este tipo de ambientes no había sido considerado en estudios previos de poblaciones nativas de *W. auropunctata*. Estos estudios propusieron que la clonalidad sería particularmente seleccionada en ambientes antrópicos, ignorando qué factores habrían favorecido su aparición en la naturaleza. Es posible que los pulsos de inundación periódicos que ocurren en estos hábitats hayan jugado un papel clave como fuerzas evolutivas responsables del surgimiento de la clonalidad en *W. auropunctata*. La producción de diversas reinas (y machos) clonalmente, podría ser un mecanismo con el cual las reinas de *W. auropunctata* garantizan la supervivencia de su genotipo. La reproducción clonal implica menor gasto de energía que la reproducción sexual, y permite por lo general la producción de un mayor número de descendencia. Esta podría haber sido seleccionada en sistemas sujetos a inundaciones periódicas. Se ha propuesto al disturbio como una fuerza que dispara la reproducción clonal o vegetativa en diversos taxa (ej. en corales, Coffroth, 1998; en invertebrados bentónicos, Jackson, 1985). Particularmente, diversas especies de árboles que habitan en planicies de inundación se reproducen clonalmente, lo cual les conferiría una mayor tolerancia a las inundaciones (Ernst & Brooks, 2003).

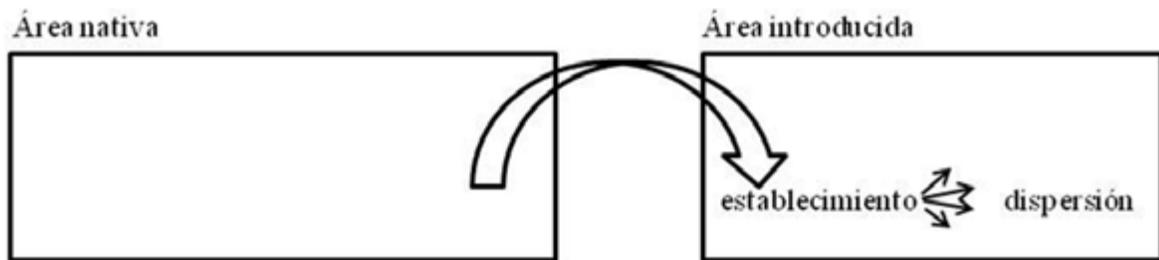
Del mismo modo, la unicolonialidad también podría haber surgido en este tipo de ambientes. La polidomia, sería una organización colonial más antigua que la supercolonialidad. Este tipo de organización colonial surge como consecuencia de la brotación (Debout et al., 2007). Este mecanismo, supone menos gasto de energía que la fundación de colonias distantes y la presencia de vuelos nupciales (Keller, 1995); y tiene la ventaja de que, en el caso de que ocurra un evento de estrés ambiental, a mayor cantidad de nidos en un *cluster*, mayor será la probabilidad de que al menos uno sobreviva. En el caso de que un nido sea destruido, los otros permanecerán sanos (Debout et al., 2007).

La poliginia también podría haber evolucionado en estos ambientes naturalmente perturbados, ya que si bien en *W. auropunctata*, la mayoría de los nidos no posee reinas (independientemente del nivel de perturbación del ambiente), tanto los nidos en sitios

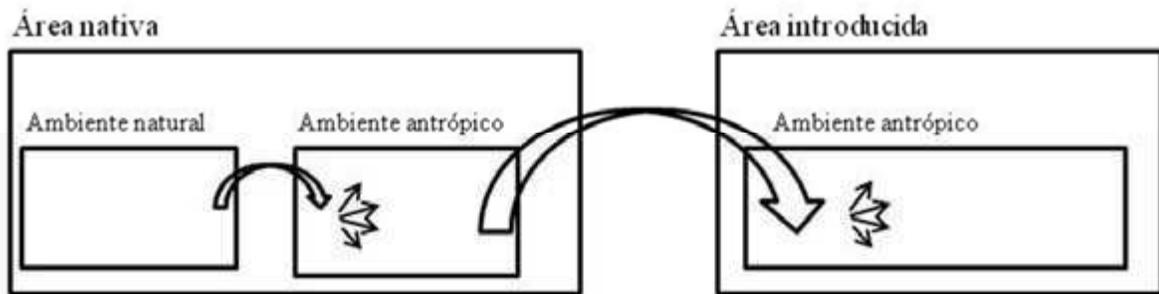
medianamente perturbados como altamente perturbados, poseen mayor proporción de nidos políginos que los sitios naturales. La poliginia ha estado generalmente asociada a la polidomia (Hölldobler & Wilson, 1977), y se piensa que es una característica que acompaña a la polidomia, a partir de un ancestro monógino (Debout et al., 2007) (aunque existen muchas especies de hormigas monóginas que también presentan polidomia).

Por todo esto, el escenario de invasión de “dos pasos” propuesto por Foucaud et al. (2010a) para *W. auropunctata*, podría ser completado, por un tercer paso en su rango nativo, que explica cómo las poblaciones nativas, adquirieron las características de poblaciones dominantes, antes de la influencia del hombre. Así, las poblaciones de ambientes naturales, inconspicuas, multicoloniales, y de reproducción sexual, habrían desarrollado el mecanismo de clonalidad, como respuesta al estrés en ambientes perturbados naturalmente. Este mecanismo, les habría otorgado una ventaja con respecto a otras especies de hormigas que no sobreviven al estrés de estos ambientes. A su vez, la alta incidencia de reproducción sexual en estos ambientes, generaría el surgimiento de linajes clonales nuevos, manteniendo una alta variabilidad genética en la población. Luego, en los ambientes antrópicos se vería favorecido el sistema de reproducción clonal, y debido a que son ambientes más estables que las planicies de inundación, y con menor número de hormigas competidoras, las poblaciones de *W. auropunctata* no necesitarían tales eventos de reproducción sexual que originen linajes clonales nuevos tan frecuentemente. Por ello, en ambientes antrópicos, existiría exclusivamente el sistema de reproducción clonal. Así los ambientes medianamente perturbados, como las planicies de inundación, representarían situaciones ambientales intermedias, entre los sitios naturales y los sitios antrópicos, claves para el desarrollo de las características asociadas a la invasividad de *W. auropunctata* y su capacidad de sobrevivir y proliferar en ambientes antrópicos (Figura 7.2). Será interesante para estudios futuros, corroborar si este patrón se repite en el resto del rango nativo de *W. auropunctata*, aumentando los muestreos en la planicie de inundación del Río Paraná, aunque será particularmente interesante estudiar las poblaciones presentes en la planicie de inundación del Río Amazonas y el Pantanal brasileiro, por tratarse de sistemas fluviales que, según el análisis filogeográfico, parecen haber sido escenarios importantes de la historia evolutiva de *W. auropunctata*.

(a) Visión tradicional de escenarios de invasiones biológicas: “un paso”



(b) Visión alternativa ilustrada para *W. auropunctata*: “dos pasos”



(c) Visión completa propuesta para *W. auropunctata*: “tres pasos”

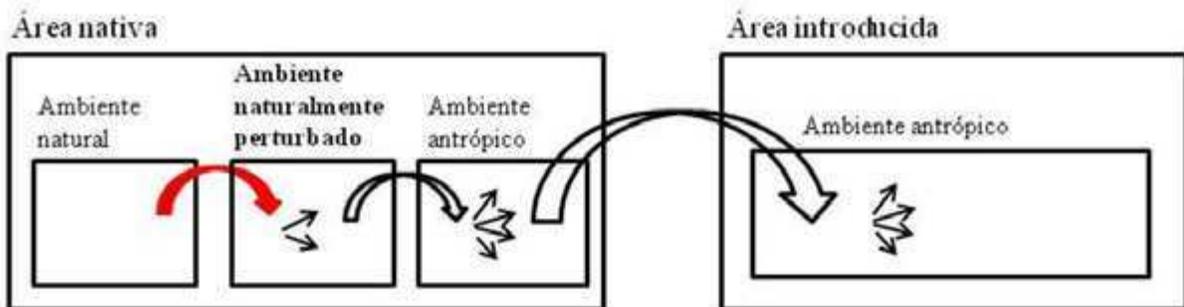


Figura 7.2. Escenario de invasión clásico, de “un paso” (a); el escenario de “dos pasos” propuesto por Foucaud et al. (2010a) para *Wasmannia auropunctata* (b); y el escenario de “tres pasos” propuesto en esta tesis (c). La flecha roja simboliza la transición de poblaciones sexuales, en sitios naturales, a poblaciones con sistema de reproducción mixto, en sitios perturbados naturalmente, principalmente planicies de inundación. La siguiente flecha simboliza la transición de poblaciones de reproducción mixta a poblaciones clonales en los sitios altamente perturbados, principalmente sitios antrópicos.

La historia filogeográfica de *Wasmannia auropunctata* se corresponde con una dispersión gradual a altas latitudes en Sudamérica, concordante con una adaptación a climas más fríos

Gracias al estudio filogeográfico se pudo determinar que los dos clados principales de *W. auropunctata* (clados A y B) corresponden a unidades evolutivas que se separaron hace ~3,9 millones de años. El ancestro común de estos clados se ubicó con mayor probabilidad en el centro de Brasil, desde donde el clado A se dispersó hacia el norte y el B hacia el sur, y luego de un proceso de diferenciación, ambos clados habrían iniciado un proceso de contacto secundario que comenzó hace ~380 mil años. Los modelados de nicho ecológicos evaluados bajo el escenario climático actual y escenarios pasados (LGM y LIG) sugieren que ambos clados podrían presentar diferentes requerimientos de nicho ecológico. Será interesante evaluar en el futuro si ambos clados constituyen especies crípticas dentro de *W. auropunctata* o si están atravesando un proceso de especiación incipiente, siendo la zona de contacto secundario una zona híbrida.

Solo el clado B, se extiende hasta Argentina, y parece estar más adaptado a temperaturas más frías que el clado A, exclusivamente tropical y subtropical. Si bien todas las poblaciones en las latitudes más altas se encontraron exclusivamente en hábitats antrópicos, podríamos inferir que la especie logró expandirse hacia estas latitudes extremas solo gracias a la actividad humana y a su modificación del hábitat. Sin embargo, dos fuentes de evidencia nos indican que la especie alcanzó estas latitudes muy previamente a la expansión humana en Sudamérica ocurrida hace menos de 10 mil años y la pronunciada urbanización en esta región hace solo ~130 años. La alta diversidad genética (tanto mitocondrial como nuclear) en la región, las pruebas de expansión demográfica hacia el sur hace 28 mil años y la alta probabilidad de presencia de la especie en esta región durante el Último Interglacial indican que la especie habitaba la región previamente. Por lo tanto, la población de origen que invadió zonas con ambientes extremos, como Israel, alcanzó el límite sur de distribución nativa a través de un proceso de dispersión natural, en tiempos evolutivos y no por invasión mediada por el hombre. Por lo tanto, es probable que haya sufrido un proceso de adaptación progresivo a condiciones climáticas extremas, que le habría facilitado su establecimiento exitoso en ambientes no tropicales.

Curiosamente, el área de distribución nativa de *W. auropunctata* parece haberse extendido hacia el sur durante los últimos 50 años (ver capítulo 2). En el presente trabajo se

encontró que *W. auropunctata* es muy común en la provincia de Buenos Aires, asociada a hábitats perturbados, principalmente en ecosistemas urbanos. Por lo tanto, *W. auropunctata* es una especie cuyo rango de distribución aparentemente continúa expandiéndose hacia el sur de Sudamérica, proceso que probablemente continuará, facilitado por la actividad humana y acompañado por el actual escenario de cambio climático global. De hecho, la especie se encuentra en lugares no previstos por el MNE, es decir en regiones donde las condiciones climáticas no son favorables, como el desierto del Monte en el centro-oeste de Argentina (localidad de Anillaco en la provincia de La Rioja, Cuezco et al., 2015). Es probable que esta población sea una introducción mediada por el hombre, ya que se encontró en un jardín en un sitio urbano. *Wasmannia auropunctata* podría establecerse en ecosistemas antrópicos irrigados como jardines y cultivos en las regiones áridas del oeste de Argentina, de la misma manera que logró establecerse en la región Mediterránea en los últimos 20 años. Esta podría ser la razón por la cual la distribución de *W. auropunctata* depende más fuertemente de la temperatura ambiente que del nivel de precipitación, como señala el MNE.

***Wasmannia auropunctata* posee una baja habilidad competitiva con respecto a las otras hormigas del ensamble**

Wasmannia auropunctata no resultó ser una buena descubridora de fuentes de alimento, por lo que no puede considerarse una especie oportunista, y tampoco fue hábil desplazando otras especies de los cebos, por lo que no es una especie extirpadora. Logró dominar solo el 21% del total de cebos a los que fue atraída, no fue exitosa al intentar usurpar cebos y solo logró reclutar masivamente en el 13% de los cebos del total donde se la registró. *Wasmannia auropunctata* perdió la mayoría de las interacciones con otras especies. Las especies ecológicamente más dominantes del ensamble fueron *S. invicta* y *C. quadriformis*, seguidas de *W. auropunctata*, *Solenopsis* sp1, *D. breviscapis* y *N. fulva*, sugiriendo que *W. auropunctata* tendría una habilidad competitiva intermedia. Sin embargo, al ser la especie numéricamente más dominante del ensamble, estos resultados sugieren que su habilidad competitiva es en realidad, baja. Estos resultados se contradicen con los estudios previos que proponían a *W. auropunctata* como un especie agresiva capaz de desplazar a otras especies de las fuentes de alimento. Aquí su agresividad fue mucho menor que la de *S. invicta* una especie extirpadora, muy agresiva.

El mecanismo de competencia que utiliza *W. auropunctata* parece depender de qué tan cerca se encuentran las fuentes de alimento de sus nidos. Cuando el alimento se encuentra cerca de sus sitios de nidificación, *W. auropunctata* los descubre y domina rápidamente. Sin embargo, no se la puede considerar como una oportunista, ya que a pesar de que desabre rápidamente, una vez que recluta un gran número de obreras, parece no poder ser desplazada por otras especies. Por el contrario, lejos de su territorio de nidificación, tarda más en encontrar los recursos, y en el caso de que pueda acceder a ellos se comporta como una insinuadora.

La supercolonialidad y la clonalidad parecen jugar un papel importante en su dominancia sobre los recursos, ya que le permiten adquirir gran abundancia numérica y dominar los recursos que están en el territorio de su supercolonia. Es probable que el crecimiento de las supercolonias en el rango nativo de *W. auropunctata* se vea limitado por la presión por competencia que ejercen sus hormigas competidoras.

Estos resultados apoyan que *W. auropunctata* domina sitios donde sus competidoras están excluidas, como los sitios antrópicos o islas, como había sido propuesto por Le Breton et al. (2005). En los sitios antrópicos, la clonalidad sería favorecida y, junto con la supercolonialidad, permitiría a *W. auropunctata* alcanzar poblaciones densas, gracias a una pérdida de la competencia interespecífica. Y en el caso de las islas, las poblaciones fuente de esas invasiones, provendrían de ambientes antrópicos del área nativa, por lo cual también se trata de poblaciones clonales y supercoloniales, con lo cual al arribar a las islas aumentan rápidamente su densidad poblacional, debido a la gran cantidad de recursos disponibles y la baja presión competitiva por parte de las especies nativas.

En el caso de *S. invicta*, King & Tschinkel (2006) demostraron, mediante un experimento de remoción en ecosistemas degradados en los Estados Unidos, que en realidad esta especie no es una competidora superior que desplaza otras especies de hormigas. Sugieren que la baja diversidad y abundancia de hormigas nativas en esos ecosistemas no es el resultado de la invasión de *S. invicta* sino de la menor tolerancia de las hormigas a ambientes perturbados. Al igual que *S. invicta*, la dominancia de *W. auropunctata* en los ambientes perturbados podría deberse a que, a diferencia de otras especies, tolera la perturbación, la cual a la vez excluye a sus hormigas competidoras, y no a

que tiene la capacidad de desplazarlas. Aunque se necesitará un estudio similar al que realizaron King & Tschinkel (2006) para demostrarlo.

***Wasmannia auropunctata* y sus enemigos naturales**

La ausencia de enemigos naturales en Argentina y zonas aledañas, que constituyen el límite sur de distribución nativa de *W. auropunctata*, es coherente con su llegada reciente a esta región y con su jerarquía de dominancia en su rango nativo. La relación entre una especie y sus enemigos naturales es producto de un largo proceso de coevolución, es por eso que se asume que los enemigos naturales de cualquier especie se encuentran con mayor probabilidad en sitios que esa especie habita hace miles de años, es decir, sitios centrales de distribución. La presente tesis indica que *W. auropunctata* se originó en el norte de Brasil y se expandió hacia el norte (clado A), y hacia el sur (clado B), llegando a Argentina hace solo 380 - 160 mil años. Si bien los parasitoides podrían acompañar a sus hospedadores en su expansión ya que su supervivencia depende más del microambiente que le genera su hospedador que del ambiente externo, éste no parece ser el caso de los enemigos naturales de *W. auropunctata*, quien parece haber dejado a sus enemigos naturales atrás en su proceso de expansión.

Por otro lado, la mayoría de las especies de parasitoides del género *Phoridae*, están asociados a especies de hormigas competitivamente dominantes como *Pheidole*, *Solenopsis*, *Camponotus*, *Atta* y *Acromyrmex* (Disney, 1994; Borgmeier, 1928). Estas especies alcanzan grandes colonias y se organizan en largos senderos de reclutamiento, que involucran numerosas obreras al encontrar fuentes de alimento. Las feromonas utilizadas para formar y mantener dichos senderos, para dominar y defender sus fuentes de alimento actúan también como fuertes atrayentes que los fóridos utilizan para localizar sus huéspedes (Feener et al., 1996). Asimismo, las grandes colonias hacen que dichas especies de hormigas sean más conspicuas y blancos más fáciles para los fóridos que especies de colonias pequeñas, y sus amplios senderos de reclutamiento atraen a estos parasitoides más efectivamente que especies que no forman dichos senderos (Folgarait & Gilbert, 1999). Si bien *W. auropunctata* sufrió una expansión natural hacia grandes latitudes al sur, llegando al actual territorio argentino, sólo logra ser abundante en ambientes perturbados, principalmente antrópicos, lo que sugiere que la especie se volvió numéricamente dominante en la región muy

recientemente, mediado por la perturbación humana del ambiente. Por el contrario, la especie es inconspicua en sitios no modificados, como bosques primarios o con un nivel bajo de perturbación, como bosques secundarios, lo que concuerda con la ausencia de enemigos naturales en dichos sitios, y por ende también en sitios antrópicos recientemente colonizados, ya que si no existen enemigos naturales en las poblaciones fuente, tampoco lo habrá en las subsiguientes poblaciones presentes en sitios antrópicos. Por otro lado, si bien la especie alcanza cierta abundancia en sitios naturalmente perturbados, como la planicie de inundación del río Paraná, estos sitios son solo unos pocos en relación a toda la distribución de la especie en la región y con ausencia aparente de enemigos naturales.

La identificación de las áreas centrales de distribución de *W. auropunctata* por medio del estudio filogeográfico, que reúnen las condiciones más óptimas para la especie y albergan la diversidad genética más alta, y el hallazgo de las zonas más ancestrales de la especie, constituyen información muy valiosa a la hora de definir sitios óptimos para buscar enemigos naturales (Pschorn-Walcher, 1977). Hasta la fecha, el único enemigo natural conocido de *W. auropunctata*, el parasitoide *Oraesema minutissima* (Heraty, 1994; Wetterer & Porter, 2003), se encuentra en las islas del Caribe, Costa Rica, Colombia, Ecuador, Venezuela, Guayana y Surinam (región dominada por clado A), y debido a la alta abundancia de este parasitoide en las islas del Caribe, se ha considerado como un potencial agente de control biológico contra *W. auropunctata* (Heraty, 1994; Wetterer & Porter, 2003). Sin embargo, el impacto de este parasitoide en poblaciones de *W. auropunctata* ha sido cuestionada debido a que en las regiones donde *O. minutissima* es abundante (por ejemplo, Dominica) *W. auropunctata* es de todas maneras muy dominante (Soto et al., 2010). Valdrá la pena evaluar si *O. minutissima* es un parasitoide específico del clado A, y en ese caso, explorar enemigos naturales desconocidos para clado B. Independientemente de la especificidad del clado, este estudio proporciona información valiosa para orientar la búsquedas de nuevos enemigos naturales de *W. auropunctata* hacia las áreas de mayor diversidad genética.

Por todo lo expuesto, sugerimos que lo más apropiado para comenzar un plan de control biológico de esta especie sería guiar la búsqueda de enemigos naturales a los sitios naturalmente perturbados que habita la especie ya que es en estos sitios donde la especie es capaz de formar supercolonias adquiriendo mayor abundancia numérica, pero que a su vez se encuentren en regiones próximas al origen de la misma (norte y centro de Brasil) y regiones de mayor diversidad genética,

y por lo tanto, mayor probabilidad de haber desarrollado una relación parasitoide-hospedero a lo largo de la historia evolutiva de la especie.

Próximos pasos

Será interesante para estudios futuros, corroborar que el patrón observado en esta tesis, en el que sitios con perturbación media poseen sistema de reproducción mixto, se repite en el resto del rango nativo de *W. auropunctata*, aumentando los muestreos en la planicie de inundación del Río Paraná, aunque será particularmente interesante estudiar las poblaciones presentes en la planicie de inundación del Río Amazonas y el Pantanal brasileiro, por tratarse de sistemas fluviales que, según el análisis filogeográfico, parecen haber sido escenarios importantes de la historia evolutiva de *W. auropunctata*.

Dado que la clonalidad tiene el potencial para fijar combinaciones genéticas favorables (Mergey et al., 2006), sería interesante estudiar en el futuro si este tipo de sistema de reproducción está relacionado con la expansión del clado B hacia el sur, debido a las características climáticas más extremas presentes en esta región, comparando con el ambiente tropical y subtropical originario de la especie. Esto podría ser posible ya que el sistema reproductivo predominante en el límite sur de distribución nativa fue el clonal.

Información suplementaria

Inf. Sup. Capítulo 2

Tabla S.2.1. Lista de localidades donde se encontró a *Wasmannia auropunctata*. Se indica el número de nidos y de *clusters* hallados por localidad. En los sitios donde no se encontraron los nidos, sino solo obreras se indica “obreras” en la celda de número de nidos. Se indican las coordenadas geográficas de cada localidad, la altitud, una breve descripción del hábitat, el grado de perturbación del ambiente y la dominancia ecológica de las poblaciones.

| País | Provincia/Estado | Localidad | No. nidos | No. clusters | Coordenadas | | Altitud (m) | Tipo de hábitat | Nivel de disturbio | Dominancia ecológica |
|-----------|------------------|------------------------|-----------|--------------|-------------|------------|-------------------|---|--------------------|----------------------|
| | | | | | latitud S | longitud O | | | | |
| Argentina | Buenos Aires | Ciudad de Buenos Aires | 6 | 2 | 34 35,041 | 58 23,785 | 48 | Parque urbano | Alto | Dominante |
| | | Camping Las Tejas | 22 | 4 | 34 06,223 | 58 59,665 | -22 | Bosque secundario en planicie de inundación | Medio | Dominante |
| | | San Antonio de Areco | 6 | 1 | 34 14,830 | 59 28,239 | 26 | Debajo de veredas | Alto | Dominante |
| | | Zárate | 7 | 3 | 34 05,507 | 59 01,545 | 23 | Debajo de veredas | Alto | Dominante |
| | | San Pedro | 4 | 1 | 33 39,472 | 59 42,843 | 6 | Banquina, Bosque secundario | Medio | Dominante |
| | | San Nicolás | 3 | 2 | 33 17,384 | 60 15,409 | 43 | Sabana secundaria | Medio | No dominante |
| | | Lozano | 1 | 1 | 34 50,94 | 59 02,99 | 60 | Campo | Alto | Dominante |
| | | Mercedes | obreras | | 34 41,570 | 59 26,777 | 67 | Jardín | Alto | Dominante |
| | | Carmen de Areco | 1 | 1 | 34 22,84 | 59 49,34 | 48 | Debajo de veredas | Alto | No dominante |
| | | Suipacha | 5 | 1 | 34 46,146 | 59 41,146 | 47 | Debajo de veredas | Alto | No dominante |
| | Vicente López | 2 | 2 | 34 31,97 | 58 29,46 | | Debajo de veredas | Alto | No dominante | |
| | Hurlingham | 5 | 1 | 34 35,602 | 58 38,560 | 21 | Jardín | Alto | No dominante | |
| | Catamarca | Alijilán | obreras | | 28 11,649 | 65 28,054 | 691 | Bosque secundario | Bajo | No dominante |
| | Chaco | Isla del Cerrito | 3 | 1 | 27 17,791 | 58 40,861 | -2 | Bosque secundario en planicie de inundación | Medio | No dominante |
| | | P.N. Chaco | obreras | | 26 48,517 | 59 36,298 | 64m | Bosque secundario | Bajo | No dominante |
| | Córdoba | Camping La Hoya | obreras | | 30 56,949 | 64 36,401 | 704 | Bosque secundario | Medio | No dominante |
| | Corrientes | El Socorro, Iberá | 5 | 3 | 28 39,307 | 57 25,833 | 85 | Fragmento de bosque secundario | Medio | Dominante |
| | | Iberá | obreras | | | | | Sabana en planicie de inundación | media | No dominante |
| | | Camping Machuca | 8 | 1 | 27 22,209 | 58 41,062 | 62 | Bosque secundario | Medio | No dominante |
| | | Estación Biológica de | 1 | 1 | 27 33,158 | 58 40,779 | 73 | Bosque en galería | Bajo | No dominante |

| | | | | | | | | | |
|------------|------------------------------|----|---|-----------|-----------|------|--|-------|--------------|
| | Corrientes | | | | | | secundario | | |
| Entre Ríos | Colón | 5 | 1 | 32 13,640 | 58 07,801 | 22 | Parque urbano | Alto | Dominante |
| | Paraná | 6 | 1 | 31 43,042 | 60 32,377 | 26 | Parque urbano | Alto | Dominante |
| Formosa | San Francisco de Laishi | 2 | 2 | 26 14,394 | 58 37,631 | 77 | Bosque en galería secundario | Bajo | No dominante |
| | Chuqui Cué | 2 | 2 | 26 29,229 | 58 16,743 | 69 | Bosque en galería secundario | Medio | No dominante |
| | El Bagual | 2 | 1 | 26 18,269 | 58 49,030 | 80 | Bosque primario | Bajo | No dominante |
| | Herradura obreras | | | 26 29,164 | 58 16,690 | 79m | Bosque secundario | Medio | No dominante |
| | P.N. Pilcomayo obreras | | | 25 07,430 | 58 10,507 | 81m | Bosque secundario | Bajo | No dominante |
| Jujuy | Ocloyas | 6 | 1 | 23 58,544 | 65 17,570 | 1783 | Pradera en bosque montañoso (Yungas) | Alto | Dominante |
| | Tumbaya | 6 | 1 | 23 51,347 | 65 27,915 | 2125 | Banquina de ruta, Debajo de piedras (Puna) | Alto | Dominante |
| | Yuto | 12 | 2 | 23 34,441 | 64 30,567 | 436 | Plantación de banana | Alto | Dominante |
| | Volcán | 1 | 1 | 23 55,104 | 65 28,039 | 2093 | Banquina de ruta, Debajo de piedras (Puna) | Alto | Dominante |
| | San Salvador de Jujuy | 1 | 1 | 24 08,935 | 65 17,575 | 1385 | Bosque secundario | Medio | No dominante |
| | El Carmen | 3 | 3 | 24 25,695 | 65 17,846 | 1227 | Banquina de ruta, Debajo de piedras | Alto | Dominante |
| | PN Calilegua obreras | | | 23 44,148 | 64 51,045 | 750 | Bosque secundario | Bajo | No dominante |
| Misiones | Posadas | 1 | 1 | 27 24,414 | 55 53,783 | 144 | Parque urbano | Alto | Dominante |
| | P.N. Iguazú obreras | | | 25 31,155 | 54 08,09 | 176 | Bosque secundario | Bajo | No dominante |
| | Aristóbulo del Valle obreras | | | 27 05,296 | 54 57,141 | 225 | Bosque secundario | Bajo | No dominante |
| | San Javier obreras | | | 27 53,3 | 55 07,79 | 129 | Bosque secundario | Bajo | No dominante |
| | Loreto | 1 | 1 | 27 19,814 | 55 31,556 | 165 | Bosque secundario | Medio | No dominante |
| | Alba Posse | 1 | 1 | 27 34,023 | 54 40,552 | 127 | Bosque secundario | Medio | No dominante |
| | El Soberbio | 4 | 2 | 27 17,931 | 54 12,264 | 201 | Jardín | Alto | No dominante |
| | Aldea Yabotí | 1 | 1 | 27 12,825 | 54 02,592 | 154 | Bosque primario | Bajo | No dominante |
| Salta | Chicoana | 2 | 1 | 25 05,449 | 65 34,008 | 1299 | Banquina de ruta | Alto | No dominante |
| | La Población | 2 | 1 | 25 04,850 | 65 31,247 | 1218 | Banquina de ruta | Alto | Dominante |
| | Cafayate | 1 | 1 | 26 05,969 | 65 58,249 | 1611 | Banquina de ruta | Alto | No dominante |
| | Tolombón | 1 | 1 | 26 10,989 | 65 56,390 | 1618 | Parque urbano | Alto | Dominante |

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----------------------|-------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|---------------|---|------------------|--------------|
| Argentina | Santa Fe | Rosario | 4 | 1 | 32 53,644 | 60 41,459 | 7 | Parque urbano | Alto | Dominante |
| | | Puerto Ocampo | 18 | 1 | 28 33,092 | 59 06,846 | 57 | Bosque secundario en planicie de inundación | Medio | Dominante |
| | Santiago del Estero | Reconquista | 2 | 1 | 29 07,986 | 59 39,194 | -5 | Parque urbano | Alto | Dominante |
| | | Gobernador Crespo | 4 | 1 | 30 21,763 | 60 24,051 | 57 | Parque urbano | Alto | Dominante |
| | | San Javier | 6 | | 30 34,920 | 59 55,729 | 9 | Debajo de veredas | Alto | Dominante |
| | | Ojo de Agua | 1 | 1 | 29 30,877 | 63 42,235 | 517 | Parque urbano | Alto | No dominante |
| | | Loreto-San Martín | 2 | 1 | 28 19,354 | 64 08,062 | 148 | Bosque secundario | Medio | Dominante |
| | | Tucumán | Simoca obreras | | | 27 28,598 | 65 15,894 | 311 | Banquina de ruta | Medio |
| | San Miguel de Tucumán | | 2 | 1 | 26 48,168 | 65 12,290 | 545 | Parque urbano, Debajo de escombros | Alto | Dominante |
| | Bolivia | Tarija | Bermejo | 2 | 1 | 22 43,686 | 64 21,202 | 408 | Banquina de ruta | Alto |
| Tarija, Bolivia | | | 1 | 1 | 21 31,733 | 64 44,453 | 1913 | Parque zoológico, Debajo de piedras | Alto | |
| Santa Cruz de la Sierra | | Pampa Grande | 1 | 1 | 18 03,130 | 64 07,306 | 1308 | En la barranca de un río | Bajo | |
| Brasil | Mato Grosso do Sul | Cuevas | 4 | 1 | 18 10,555 | 63 43,316 | 1382 | Banquina de ruta, bosque secundario | Alto | |
| | | Dourados | 1 | 1 | 22 12,549 | 54 48,690 | 426 | Debajo de veredas | Alto | |
| | Paraná | Ponta Porá | 1 | 1 | 22 32,292 | 55 43,506 | 659 | Parque urbano | Alto | |
| | | Curitiba | 1 | 1 | 25 25,598 | 49 19,042 | 918 | Bosque secundario | Medio | |
| | | Paranagua | 5 | 1 | 25 30,928 | 48 30,477 | 9 | Parque urbano | Alto | |
| | Rio de Janeiro | Caioba | 2 | 1 | 25 49,874 | 48 32,453 | 7 | Parque urbano | Alto | |
| | | Guaira | 3 | 1 | 24 04,825 | 54 15,011 | 250 | Debajo de veredas | Alto | |
| | | Paraty | 1 | 1 | 23 12,920 | 44 42,699 | 16 | Parque urbano | Alto | |
| | Rio Grande do Sul | Buzios | 3 | 2 | 22 46,670 | 41 54,639 | 19 | Parque urbano | Alto | |
| | | Rio de Janeiro | 1 | 1 | 22 58,764 | 43 12,919 | 13 | Parque urbano | Alto | |
| | | Rio Grande | 3 | 1 | 32 01,853 | 52 05,788 | 8 | Parque urbano | Alto | |
| | Santa Catarina | Porto Alegre | 5 | 2 | 30 01,920 | 51 13,391 | 20 | Parque urbano | Alto | |
| | | Torres | 5 | 1 | 29 20,670 | 49 43,781 | 11 | Parque urbano | Alto | |
| | | Garopaba | 1 | 1 | 28 01,236 | 48 36,643 | 2 | Parque urbano | Alto | |
| | | Florianopolis | 1 | 1 | 27 39,830 | 48 32,422 | -14 | Parque urbano | Medio | |
| | Tijucas | 2 | 1 | 27 14,448 | 48 37,280 | -33 | Parque urbano | Alto | | |
| | San Francisco do Sul | 2 | 1 | 26 14,863 | 48 37,276 | 13 | Parque urbano | Alto | | |

| | | | | | | | | | |
|----------|------------------|----------------------------|----|-----|------------|-----------|-----|----------------------------|-------|
| | | Rio do Sul | 4 | 1 | 27 12,173 | 49 37,921 | 346 | Parque urbano | Alto |
| | Sao Paulo | Santos | 2 | 1 | 23 57,885 | 46 22,825 | 40 | Parque urbano | Alto |
| | | Guaruja | 2 | 1 | 24 00,448 | 46 16,314 | 9 | Parque urbano | Alto |
| | | Sao Sebastiao | 3 | 1 | 23 45,749 | 45 24,656 | 29 | Parque urbano | Alto |
| | | Caraguatatuba | 1 | 1 | 23 37,100 | 45 23,881 | 3 | Parque urbano | Alto |
| | | Ubatuba | 1 | 1 | 23 29,263 | 45 06,273 | 5 | Parque urbano | Alto |
| Paraguay | Alto Paraná | Juan E O'Leary | 1 | 1 | 25 24,876 | 55 25,365 | 264 | Tronco en banquina de ruta | Alto |
| | De la Cordillera | Piribebuy | 1 | 1 | 25 33,273 | 57 02,207 | 296 | Tronco en banquina de ruta | Medio |
| | | Itacurubi de la Cordillera | 1 | 1 | 25 27,689 | 56 51,111 | 184 | Parque urbano | Alto |
| | Itapua | Encarnación | 2 | 1 | 27 19, 356 | 55 52,100 | 104 | Parque urbano | Alto |
| | Misiones | San Miguel | 1 | 1 | 26 31,929 | 57 02,333 | 121 | Parque urbano | Alto |
| | San Pedro | 25 de diciembre | 1 | 1 | 24 48,976 | 56 43,517 | 130 | Parque urbano | Alto |
| | | Asunción | 1 | 1 | 25 14,851 | 57 34,278 | 167 | Parque urbano | Alto |
| Uruguay | Colonia | Nueva Palmira | 3 | 1 | 33 51,882 | 58 24,858 | -9 | Parque urbano | Alto |
| | | Carmelo | 3 | 1 | 34 00,098 | 58 17,203 | 12 | Debajo de veredas | Alto |
| | | Colonia | 1 | 1 | 34 28,211 | 57 51,143 | -46 | Parque urbano | Alto |
| | Río Negro | Fray Bentos | 1 | 1 | 33 06,819 | 58 19,013 | -15 | Parque urbano | Alto |
| Total | | | 92 | 252 | 97 | | | | |

Inf. Sup. Capítulo 3

Tabla S.3.1. Detalle de las secuencias de los *primers* utilizados para las 2 PCRs *multiplex* de 12 marcadores microsatélites, el fluorocromo con el que se marcó cada *primer*, el motivo repetido del alelo clonado (Fournier et al., 2005) y su temperatura de *annealing*.

| | Locus | Fluorocromo | Motivo repetido (alelo clonado) | Secuencia de los <i>primers</i> | T° <i>annealing</i> (°C) |
|--------------|---------|-------------|------------------------------------|--|-----------------------------|
| PCR 1 | Wa-1gam | FAM | (AG) ₁₉ | F: TGCTCTCAGTGTTCCGACAG R: CCCTAAAGAACATGAATATGACG | 57 |
| | Wa-2164 | NED | (AG) ₄₀ | F: GCCCGTTATTATACAGCTGG R: CTACTCGCAGCACCTCCATA | 57 |
| | Wa-3176 | FAM | (GA) ₁₇ | F: AAGGCCGTCCTGTGCGTTA R: GAACAGGTCCTCGCCAGTCT | 57 |
| | Wa-418 | FAM | (GA) ₁₈ | F: GCATCAATTTTCTCCCGAACC R: CGCAATGTGCAATGTGCGTGT | 57 |
| | Wa-566 | HEX | (CT) ₁₄ | F: GTTCAACGAGGATGGTTACG R: GCTTAATCGCACGTGAACGTG | 57 |
| | Wa-716 | NED | (GA) ₁₈ | F: TCTGACTGGTTCGAATTCCTG R: GACTGCACGAATGTGACGTA | 57 |
| | Wa-730 | FAM | (CT) ₁₈ | F: GAATGAGCGAAGCGTGTTAC R: GAGATTCTCGACGCGTATGA | 57 |
| PCR 2 | Wa-1166 | HEX | (GA) ₂₂ | F: GAACCAGAAGCGAGAACG R: AGCTGCATGAACTCCAAG | 63 |
| | Wa-225 | NED | (CA) ₁₀ | F: GTGCGCAGACATAGATAAAGG R: TGAATAGCTGCGACTCTACG | 63 |
| | Wa-275 | NED | (CT) ₁₄ | F: AGAACTTTGATGCTCCACTTTC R: CTTTGAACCTCCTGGTTAATGC | 63 |
| | Wa-521 | HEX | (GA) ₁₅ | F: AGATATGAGCGGAACCAGTC R: TCAGCCTCCTGGGTAGC | 63 |
| | Wa-680 | HEX | (AG) ₂₂ | F: GCACAGTGCCGACTTGTTGC R: CGCACGTCTGGCACTCAATC | 63 |

Tabla S.3.2. Genotipos multilocus de los 10 loci microsatélites analizados en los 115 individuos reproductores (reinas (Q), hembras aladas (G) y machos (M) de *Wasmannia auropunctata*. El código (Id.) de cada muestra se refiere al número de sitio, número de nido y número de individuo. NA: no aplica (en el caso del segundo alelo de los machos ya que son haploides).

| Localidad | Linaje | GML | Id. Muestra | Locus | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------|-----|-------------|--------|---------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | Wa-418 | Wa-3176 | Wa-1gam | Wa-716 | Wa-2164 | Wa-566 | Wa-1166 | Wa-680 | Wa-521 | Wa-225 | | | | | | | | | | |
| Yabotí | 1 | 1 | wa66-01-G1 | 96 | 128 | 235 | 237 | 286 | 318 | 173 | 191 | 282 | 284 | 255 | 257 | 94 | 94 | 150 | 166 | 213 | 223 | 220 | 226 |
| | 2 | 2 | wa66-01-G2 | 96 | 99 | 235 | 237 | 286 | 286 | 183 | 210 | 278 | 282 | 255 | 255 | 94 | 96 | 166 | 172 | 205 | 223 | 220 | 226 |
| | 3 | 3 | wa66-01-G4 | 96 | 128 | 235 | 237 | 286 | 318 | 173 | 191 | 278 | 282 | 257 | 257 | 94 | 94 | 150 | 172 | 213 | 219 | 220 | 226 |
| El Soberbio | 4 | 4 | wa64-01-G1 | 99 | 99 | 217 | 237 | 318 | 322 | 199 | 199 | 278 | 278 | 255 | 279 | 112 | 112 | 191 | 191 | 199 | 205 | 223 | 229 |
| | 5 | 5 | wa64-01-G2 | 99 | 99 | 217 | 237 | 318 | 322 | 199 | 199 | 278 | 278 | 255 | 279 | 97 | 97 | 189 | 189 | 199 | 205 | 223 | 229 |
| | 6 | 6 | wa64-01-G3 | 99 | 99 | 237 | 237 | 288 | 322 | 183 | 183 | 278 | 278 | 280 | 282 | 97 | 112 | 170 | 170 | 203 | 219 | 223 | 223 |
| | 7 | 7 | wa64-01-G4 | 97 | 97 | 217 | 237 | 319 | 323 | 199 | 199 | 278 | 278 | 253 | 269 | 97 | 97 | | | 199 | 205 | 223 | 229 |
| Alba Posse | 8 | 8 | wa63-01-G1 | 101 | 101 | 211 | 225 | 319 | 326 | 199 | 199 | 298 | 300 | 269 | 269 | 92 | 94 | 166 | 180 | 228 | 230 | 221 | 223 |
| | 9 | 9 | wa63-01-G2 | 97 | 103 | 211 | 225 | 318 | 324 | 199 | 199 | 298 | 300 | 269 | 269 | 92 | 92 | 166 | 180 | 228 | 230 | 221 | 223 |
| | 10 | 10 | wa63-01-G3 | 103 | 103 | 225 | 237 | 318 | 324 | 199 | 199 | 298 | 300 | 269 | 269 | 92 | 92 | 166 | 180 | 228 | 230 | 221 | 223 |
| | 11 | 11 | wa63-01-G4 | 103 | 103 | 211 | 217 | 288 | 318 | 199 | 201 | 298 | 298 | 255 | 279 | 92 | 102 | 178 | 180 | 205 | 205 | 221 | 221 |
| Posadas | 12 | 12 | wa111-01-Q1 | 102 | 102 | 230 | 230 | 289 | 328 | 186 | 186 | 293 | 293 | 261 | 261 | 88 | 96 | 150 | 164 | 203 | 205 | 220 | 226 |
| Encarnación | 13 | 13 | wa112-01-Q1 | 102 | 102 | 230 | 240 | 289 | 328 | 187 | 187 | 291 | 291 | 261 | 261 | 94 | 96 | 150 | 164 | 203 | 205 | 220 | 226 |
| | 14 | 14 | wa112-01-Q2 | 102 | 102 | 230 | 230 | 289 | 328 | 187 | 187 | 291 | 291 | 261 | 261 | 94 | 96 | 150 | 164 | 203 | 205 | 220 | 226 |
| Dourados | 14 | 15 | wa118-01-Q2 | 101 | 101 | 231 | 231 | 285 | 285 | 195 | 203 | 282 | 294 | 262 | 262 | 100 | 100 | 160 | 160 | 217 | 219 | 220 | 226 |
| | | | wa118-01-Q3 | 101 | 101 | 231 | 231 | 285 | 285 | 195 | 203 | 282 | 294 | 262 | 262 | 100 | 100 | 160 | 160 | 217 | 219 | 220 | 226 |
| | | | wa118-01-Q4 | 101 | 101 | 231 | 231 | 285 | 285 | 195 | 203 | 282 | 294 | 262 | 262 | 100 | 100 | 160 | 160 | 217 | 219 | 220 | 226 |
| | | 16 | wa118-01-Q1 | 101 | 104 | 231 | 231 | 285 | 285 | 195 | 203 | 282 | 294 | 262 | 262 | 100 | 100 | 160 | 160 | 217 | 219 | 220 | 226 |
| El Socorro (Iberá) | 15 | 17 | wa76-01-Q2 | 102 | 102 | 232 | 232 | 289 | 329 | 186 | 186 | 291 | 291 | 261 | 263 | 88 | 96 | 148 | 166 | 205 | 211 | 220 | 226 |
| | | | wa76-01-Q3 | 102 | 102 | 232 | 232 | 289 | 329 | 186 | 186 | 291 | 291 | 261 | 263 | 88 | 96 | 148 | 166 | 205 | 211 | 220 | 226 |
| | | 18 | wa76-02-Q1 | 102 | 102 | 232 | 232 | 289 | 329 | 186 | 186 | 291 | 291 | 261 | 263 | 88 | 96 | 166 | 166 | 205 | 211 | 220 | 226 |
| | | | wa76-02-Q3 | 102 | 102 | 232 | 232 | 289 | 329 | 186 | 186 | 291 | 291 | 261 | 263 | | | 166 | 166 | 205 | 211 | 220 | 226 |
| | | 19 | wa76-01-Q1 | 102 | 102 | 232 | 232 | 289 | 329 | 186 | 186 | 291 | 291 | 261 | 263 | 90 | 96 | 148 | 166 | 205 | 211 | 220 | 226 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----|----|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P. Ocampo | 16 | 20 | wa77-01-Q1 | 102 | 102 | 232 | 232 | 289 | 329 | 186 | 186 | 291 | 291 | 263 | 263 | 88 | 96 | 162 | 164 | 205 | 211 | 221 | 227 | | |
| | | | wa77-01-Q2 | 102 | 102 | 232 | 232 | 289 | 329 | 186 | 186 | 291 | 291 | 263 | 263 | | | 162 | 164 | 205 | 211 | 221 | 227 | | |
| | | | wa77-01-Q3 | 102 | 102 | 232 | 232 | 289 | 329 | 186 | 186 | 291 | 291 | 263 | 263 | 88 | 96 | 162 | 164 | 205 | 211 | 221 | 227 | | |
| San Javier | 17 | 21 | wa29-15-G2 | 127 | 127 | 240 | 240 | 298 | 298 | 179 | 179 | 286 | 286 | 259 | 259 | 100 | 100 | 148 | 191 | 201 | 205 | 220 | 220 | | |
| | | | 22 | wa29-16-Q1 | 127 | 127 | 240 | 240 | 298 | 298 | 179 | 179 | 286 | 286 | 259 | 259 | 100 | 100 | 148 | 191 | 201 | 203 | 220 | 220 | |
| | | | 23 | wa29-16-Q2 | 121 | 121 | 240 | 240 | 294 | 298 | 179 | 179 | 286 | 286 | 259 | 259 | 100 | 100 | 148 | 191 | 201 | 203 | 220 | 220 | |
| Reconquista | 18 | 24 | wa29-15-G1 | 121 | 127 | 240 | 240 | 294 | 298 | 179 | 179 | 284 | 286 | | | 100 | 100 | 148 | 150 | 201 | 205 | 220 | 220 | | |
| | | | 19 | 25 | wa59-04-Q2 | 102 | 102 | 237 | 237 | 282 | 282 | 186 | 188 | 294 | 308 | 254 | 254 | 92 | 98 | 148 | 148 | 201 | 201 | 220 | 220 |
| | | | 20 | 26 | wa59-02-Q1 | 102 | 102 | 238 | 238 | 282 | 282 | 186 | 186 | 291 | 291 | 263 | 263 | 92 | 98 | 148 | 148 | 201 | 201 | 220 | 222 |
| G. Crespo | 21 | 27 | wa59-02-Q2 | 102 | 102 | 238 | 238 | 282 | 282 | 186 | 188 | 278 | 282 | | | 92 | 98 | 148 | 148 | 201 | 201 | 220 | 222 | | |
| | | | 28 | wa59-03-Q1 | 109 | 109 | 217 | 217 | 285 | 294 | 186 | 190 | 306 | 306 | 265 | 265 | 86 | 94 | 144 | 144 | 201 | 205 | 222 | 222 | |
| | | | 29 | wa59-05-G1 | 109 | 109 | 217 | 217 | 285 | 295 | 186 | 190 | 306 | 306 | 265 | 265 | 86 | 92 | 144 | 148 | 201 | 205 | 222 | 222 | |
| Paraná | 22 | 30 | wa59-06-Q1 | 109 | 109 | 217 | 217 | 285 | 294 | 186 | 190 | 306 | 306 | | | 86 | 86 | 144 | 144 | 201 | 205 | 222 | 222 | | |
| | | | 31 | wa57-01-Q2 | 103 | 103 | 227 | 227 | 285 | 293 | 186 | 190 | 284 | 302 | 257 | 257 | 98 | 98 | 148 | 150 | 201 | 207 | 220 | 222 | |
| | | | 32 | wa57-02-Q1 | 103 | 103 | 227 | 227 | 285 | 293 | 186 | 190 | 284 | 302 | 257 | 257 | 98 | 98 | 150 | 150 | 201 | 207 | 220 | 222 | |
| Colón | 23 | 33 | wa57-01-Q3 | 103 | 103 | 227 | 227 | 285 | 293 | 186 | 190 | 284 | 302 | 257 | 257 | 98 | 98 | 150 | 150 | 207 | 207 | 220 | 222 | | |
| | | | 34 | wa57-01-G1 | 103 | 103 | 227 | 227 | 285 | 293 | 186 | 190 | 284 | 302 | 257 | 257 | 98 | 98 | 150 | 150 | 207 | 207 | 220 | 222 | |
| | | | 34 | wa58-01-Q1 | 98 | 98 | 215 | 215 | 289 | 293 | 186 | 188 | 282 | 282 | 254 | 265 | 102 | 106 | 154 | 154 | 201 | 205 | 222 | 232 | |
| Colón | 24 | 35 | wa58-02-Q2 | 98 | 98 | 215 | 215 | 289 | 293 | 186 | 188 | 282 | 282 | 254 | 265 | 102 | 106 | 154 | 154 | 201 | 205 | 222 | 232 | | |
| | | | wa58-04-Q1 | 98 | 98 | 215 | 215 | 289 | 293 | 186 | 188 | 282 | 282 | 254 | 265 | 102 | 106 | 154 | 154 | 201 | 205 | 222 | 232 | | |
| | | | wa58-04-Q2 | 98 | 98 | 215 | 215 | 289 | 293 | 186 | 188 | 282 | 282 | 254 | 265 | 102 | 106 | 154 | 154 | 201 | 205 | 222 | 232 | | |
| Colón | 25 | 36 | wa55-01-Q1 | 121 | 121 | 227 | 227 | 287 | 293 | 186 | 192 | 282 | 282 | 257 | 257 | 88 | 98 | 144 | 144 | 201 | 209 | 220 | 222 | | |
| | | | wa55-02-Q1 | 121 | 121 | 227 | 227 | 287 | 293 | 186 | 192 | 282 | 282 | 257 | 257 | 88 | 98 | 144 | 144 | 201 | 209 | 220 | 222 | | |
| | | | wa55-03-Q1 | 121 | 121 | 227 | 227 | 287 | 293 | 186 | 192 | 282 | 282 | 257 | 257 | 88 | 98 | 144 | 144 | 201 | 209 | 220 | 222 | | |
| Colón | 25 | 37 | wa55-05-Q1 | 121 | 121 | 227 | 227 | 287 | 293 | 186 | 192 | 282 | 282 | 257 | 257 | 88 | 98 | 144 | 144 | 201 | 209 | 220 | 222 | | |
| | | | wa55-06-Q1 | 121 | 121 | 227 | 227 | 287 | 293 | 186 | 192 | 282 | 282 | 257 | 257 | 88 | 98 | 144 | 144 | 201 | 209 | 220 | 222 | | |
| | | | wa69-04-G3 | 103 | 103 | 232 | 232 | 309 | 313 | 177 | 189 | 275 | 287 | 250 | 254 | 88 | 88 | 152 | 152 | 203 | 203 | 220 | 224 | | |
| Colón | 25 | 37 | wa69-04-G4 | 103 | 103 | 232 | 232 | 309 | 313 | 177 | 189 | 275 | 287 | 250 | 254 | 88 | 88 | 152 | 152 | 203 | 203 | 220 | 224 | | |
| | | | wa69-02-G1 | 103 | 103 | 232 | 232 | 309 | 313 | 177 | 189 | 275 | 287 | 254 | 258 | 88 | 88 | 152 | 152 | 203 | 203 | 220 | 224 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|----|----|--|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | wa69-02-G2 | 103 | 103 | 232 | 232 | 309 | 313 | 177 | 189 | 275 | 287 | 254 | 258 | 88 | 88 | 152 | 152 | 203 | 203 | 220 | 224 |
| | | | | wa69-02-G3 | 103 | 103 | 232 | 232 | 309 | 313 | 177 | 189 | 275 | 287 | 254 | 258 | 88 | 88 | 152 | 152 | 203 | 203 | 220 | 224 |
| | | | | wa69-03-G1 | 103 | 103 | 232 | 232 | 309 | 313 | 177 | 189 | 275 | 287 | 254 | 258 | 88 | 88 | 152 | 152 | 203 | 203 | 220 | 224 |
| | | | | wa69-03-G2 | 103 | 103 | 232 | 232 | 309 | 313 | 177 | 189 | 275 | 287 | 254 | 258 | 88 | 88 | 152 | 152 | 203 | 203 | 220 | 224 |
| | | | | wa69-03-G3 | 103 | 103 | 232 | 232 | 309 | 313 | 177 | 189 | 275 | 287 | 254 | 258 | 88 | 88 | 152 | 152 | 203 | 203 | 220 | 224 |
| | | | | wa69-04-G1 | 103 | 103 | 232 | 232 | 309 | 313 | 177 | 189 | 275 | 287 | 254 | 258 | 88 | 88 | 152 | 152 | 203 | 203 | 220 | 224 |
| | | | | wa69-04-G2 | 103 | 103 | 232 | 232 | 309 | 313 | 177 | 189 | 275 | 287 | 254 | 258 | 88 | 88 | 152 | 152 | 203 | 203 | 220 | 224 |
| San Pedro | 26 | 38 | | wa52-04-Q2 | 97 | 102 | 217 | 217 | 287 | 308 | 190 | 208 | 282 | 309 | 267 | 267 | 94 | 99 | 150 | 150 | 203 | 203 | 220 | 220 |
| C. Las Tejas | 27 | 39 | | wa46-04-Q2 | 97 | 102 | 217 | 217 | 308 | 308 | 190 | 190 | 282 | 284 | 256 | 267 | 88 | 94 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 222 |
| CABA | 28 | 40 | | wa44-05-Q1 | 97 | 97 | 225 | 225 | 289 | 308 | 186 | 190 | 282 | 286 | 256 | 265 | 99 | 99 | 150 | 150 | 207 | 207 | 220 | 220 |
| Lozano | 29 | 41 | | wa148-01-Q2 | 97 | 125 | 217 | 217 | 295 | 315 | 172 | 182 | 282 | 311 | 257 | 257 | 88 | 100 | 152 | 152 | 203 | 203 | 221 | 223 |
| | | | | wa148-01-Q3 | 97 | 125 | 217 | 217 | 295 | 315 | 172 | 182 | 282 | 311 | 257 | 257 | 88 | 100 | 152 | 152 | 203 | 203 | 221 | 223 |
| | | | | wa148-01-Q4 | 97 | 125 | 217 | 217 | 295 | 315 | 172 | 182 | 282 | 311 | 257 | 257 | 88 | 100 | 152 | 152 | 203 | 203 | 221 | 223 |
| | | | | wa148-01-Q5 | 97 | 125 | 217 | 217 | 295 | 315 | 172 | 182 | 282 | 311 | 257 | 257 | 88 | 100 | 152 | 152 | 203 | 203 | 221 | 223 |
| | | | | wa148-01-Q6 | 97 | 125 | 217 | 217 | 295 | 315 | 172 | 182 | 282 | 311 | 257 | 257 | 88 | 100 | 152 | 152 | 203 | 203 | 221 | 223 |
| La Población | 30 | 42 | | wa138-01-Q1 | 98 | 102 | 238 | 238 | 295 | 304 | 186 | 188 | 279 | 279 | 257 | 265 | 100 | 110 | 150 | 150 | 201 | 201 | 220 | 220 |
| | 31 | 43 | | wa138-02-Q1 | 102 | 102 | 221 | 221 | 286 | 286 | 190 | 190 | 271 | 309 | 257 | 257 | 110 | 110 | 148 | 148 | 205 | 220 | 220 | 222 |
| Tolombón | | 44 | | wa140-01-Q1 | 98 | 102 | 238 | 238 | 295 | 304 | 186 | 188 | 279 | 279 | 238 | 238 | 100 | 110 | 150 | 150 | 201 | 201 | 220 | 220 |
| | | 45 | | wa140-01-Q2 | 98 | 102 | 238 | 238 | 295 | 304 | 186 | 186 | 279 | 279 | 238 | 238 | 100 | 110 | 150 | 150 | 201 | 201 | 220 | 220 |
| S.M.Tucumán | 32 | 46 | | wa142-01-Q1 | 98 | 102 | 240 | 240 | 304 | 308 | 192 | 192 | 282 | 318 | 257 | 263 | 94 | 98 | 154 | 154 | 211 | 211 | 220 | 220 |
| | | | | wa142-01-Q2 | 98 | 102 | 240 | 240 | 304 | 308 | 192 | 192 | 282 | 318 | 257 | 263 | 94 | 98 | 154 | 154 | 211 | 211 | 220 | 220 |
| | 33 | 47 | | wa142-02-Q1 | 102 | 102 | 234 | 240 | 286 | 286 | 172 | 184 | 294 | 302 | 263 | 267 | 98 | 102 | 152 | 172 | 207 | 207 | 220 | 220 |
| | | 48 | | wa142-02-Q2 | 102 | 102 | 234 | 240 | 286 | 286 | 172 | 184 | 294 | 302 | 263 | 263 | 98 | 102 | 152 | 152 | 207 | 207 | 220 | 220 |
| Loreto | 34 | 49 | | wa134-01-Q1 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | | | | wa134-01-Q2 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | | | | wa134-02-Q1 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | | | | wa134-02-Q2 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | | | | wa134-02-Q3 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |
| | | | | wa134-02-Q4 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----|----|-------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | wa134-03-Q1 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 | |
| | | | wa134-03-Q2 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 | |
| | | | wa134-03-Q3 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 | |
| | | | wa134-03-Q4 | 102 | 103 | 221 | 221 | 282 | 289 | 185 | 188 | 289 | 293 | 256 | 263 | 101 | 101 | 150 | 150 | 209 | 209 | 220 | 220 | |
| Anillaco | 35 | 50 | wa153-01-Q4 | 97 | 97 | 224 | 224 | 282 | 309 | 188 | 188 | 282 | 284 | 257 | 269 | 88 | 88 | 154 | 154 | 197 | 201 | 221 | 223 | |
| | | 51 | wa153-01-Q1 | 97 | 97 | 224 | 224 | 282 | 309 | 188 | 188 | 282 | 284 | 257 | 269 | 88 | 98 | 154 | 154 | 197 | 201 | 221 | 223 | |
| | | | wa153-01-Q2 | 97 | 97 | 224 | 224 | 282 | 309 | 188 | 188 | 282 | 284 | 257 | 269 | | | 154 | 154 | 197 | 201 | 221 | 223 | |
| | | | wa153-01-Q3 | 97 | 97 | 224 | 224 | 282 | 309 | 188 | 188 | 282 | 284 | 257 | 269 | 88 | 98 | 154 | 154 | 197 | 201 | 221 | 223 | |
| | | | wa153-01-Q5 | 97 | 97 | 224 | 224 | 282 | 309 | 188 | 188 | 282 | 284 | 257 | 269 | 88 | 98 | 154 | 154 | 197 | 201 | 221 | 223 | |
| | | | wa153-01-G1 | 97 | 97 | 224 | 224 | 282 | 309 | 188 | 188 | 282 | 284 | 257 | 269 | 88 | 98 | 154 | 154 | 197 | 201 | 221 | 223 | |
| Puerto Alegre | 36 | 52 | wa90-03-Q1 | 102 | 102 | 229 | 229 | 289 | 332 | 186 | 186 | 294 | 294 | 262 | 262 | 88 | 96 | 162 | 162 | 205 | 211 | 220 | 226 | |
| | | | wa90-03-Q2 | 102 | 102 | 229 | 229 | 289 | 332 | 186 | 186 | 294 | 294 | 262 | 262 | 88 | 96 | 162 | 162 | 205 | 211 | 220 | 226 | |
| | | | wa90-03-Q3 | 102 | 102 | 229 | 229 | 289 | 332 | 186 | 186 | 294 | 294 | 262 | 262 | 88 | 96 | 162 | 162 | 205 | 211 | 220 | 226 | |
| | | 37 | 53 | wa90-04-Q1 | 102 | 112 | 219 | 219 | 291 | 291 | 199 | 199 | 289 | 289 | 260 | 260 | 94 | 94 | 164 | 164 | 205 | 209 | 224 | 224 |
| | | | 54 | wa89-01-Q1 | 102 | 112 | 219 | 219 | 291 | 291 | 199 | 199 | 289 | 289 | 260 | 262 | 94 | 94 | 164 | 164 | 205 | 209 | 224 | 224 |
| | | | | wa89-01-Q2 | 102 | 112 | 219 | 219 | 291 | 291 | 199 | 199 | 289 | 289 | 260 | 262 | 94 | 94 | 164 | 164 | 205 | 209 | 224 | 224 |
| | | | | wa89-01-Q3 | 102 | 112 | 219 | 219 | 291 | 291 | 199 | 199 | 289 | 289 | 260 | 262 | 94 | 94 | 164 | 164 | 205 | 209 | 224 | 224 |
| Torres | | | | wa91-03-Q1 | 102 | 112 | 219 | 219 | 291 | 291 | 199 | 199 | 289 | 289 | 260 | 262 | 94 | 94 | 164 | 164 | 205 | 209 | 224 | 224 |
| | | | | wa91-04-Q1 | 102 | 112 | 219 | 219 | 291 | 291 | 199 | 199 | 289 | 289 | 260 | 262 | 94 | 94 | 164 | 164 | 205 | 209 | 224 | 224 |
| | | | | wa91-04-Q2 | 102 | 112 | 219 | 219 | 291 | 291 | 199 | 199 | 289 | 289 | 260 | 262 | 94 | 94 | 164 | 164 | 205 | 209 | 224 | 224 |
| | | | | wa91-04-Q3 | 102 | 112 | 219 | 219 | 291 | 291 | 199 | 199 | 289 | 289 | 260 | 262 | 94 | 94 | 164 | 164 | 205 | 209 | 224 | 224 |
| Paraty | 38 | 55 | wa107-01-Q2 | 99 | 99 | 230 | 230 | 296 | 306 | 190 | 190 | 288 | 292 | 258 | 262 | 98 | 100 | 166 | 166 | 201 | 201 | 226 | 226 | |
| | | | wa107-01-Q3 | 99 | 99 | 230 | 230 | 296 | 306 | 190 | 190 | 288 | 292 | 258 | 262 | 98 | 100 | 166 | 166 | 201 | 201 | 226 | 226 | |
| San Sebastián | | | | wa104-02-G1 | 99 | 99 | 230 | 230 | 296 | 306 | 190 | 190 | 288 | 292 | 262 | 262 | 98 | 100 | 166 | 166 | 201 | 201 | 226 | 226 |
| | | | | wa104-03-Q1 | 99 | 99 | 230 | 230 | 296 | 306 | 190 | 190 | 288 | 292 | 258 | 262 | 98 | 100 | 166 | 166 | 201 | 201 | 226 | 226 |
| | | 56 | | wa104-03-Q2 | 99 | 99 | 230 | 230 | 296 | 306 | 190 | 190 | 288 | 292 | 258 | 262 | 98 | 100 | 166 | 166 | 201 | 201 | 226 | 226 |
| | | | | wa104-01-M1 | 123 | NA | 230 | NA | 287 | NA | NA | 298 | NA | 262 | NA | 106 | NA | 152 | NA | 203 | NA | 230 | NA | |
| | | | | wa104-01-M2 | 123 | NA | 232 | NA | 287 | NA | NA | 298 | NA | 262 | NA | 106 | NA | 152 | NA | 203 | NA | 230 | NA | |
| | | | | wa104-01-M3 | 123 | NA | 232 | NA | 287 | NA | NA | 298 | NA | 262 | NA | 106 | NA | 152 | NA | 203 | NA | 230 | NA | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|----|----|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Paranagua | 39 | 57 | wa98-04-Q1 | 100 | 100 | 223 | 223 | 289 | 292 | 190 | 190 | 286 | 298 | 255 | 266 | 92 | 100 | 152 | 152 | | | 224 | 224 |
| | | | wa98-04-Q2 | 100 | 100 | 223 | 223 | 289 | 292 | 190 | 190 | 286 | 298 | 255 | 266 | 92 | 100 | 152 | 152 | 205 | 209 | 224 | 224 |
| Cuevas | 40 | 58 | wa146-04-Q1 | 103 | 103 | 232 | 232 | | | 192 | 194 | | | 260 | 269 | 86 | 100 | 160 | 160 | 193 | 205 | 220 | 220 |
| | | | wa146-04-Q2 | 103 | 103 | 232 | 232 | | | 192 | 194 | | | 260 | 269 | 86 | 100 | 160 | 160 | 193 | 205 | 220 | 220 |
| | | 59 | wa146-02-Q1 | 103 | 103 | 232 | 232 | | | 192 | 194 | 290 | 293 | 259 | 269 | 86 | 100 | 158 | 160 | 193 | 205 | 221 | 221 |

Tabla S.3.3. Genotipos multilocus (GML) obtenidos por O. Rey (CBGP), a partir de 12 marcadores microsatélites. NA: no aplica (segundo alelo, en el caso de los machos haploides).

| Localidad | Id. muestra | Locus | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-------------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | Wa4-18 | Wa7-30 | Wa3-176 | Wa1-gam | Wa2-75 | Wa7-16 | Wa2-25 | Wa2-164 | Wa1-166 | Wa6-80 | Wa5-21 | Wa5-66 | | | | | | | | | | | | |
| P. Ocampo | Wa029-15-G1 | 118 | 124 | 169 | 169 | 234 | 234 | 295 | 295 | 106 | 106 | 175 | 175 | 216 | 216 | 282 | 282 | 97 | 97 | 187 | 187 | 187 | 187 | 254 | 254 |
| | Wa029-15-Q1 | 124 | 124 | 169 | 169 | 234 | 234 | 295 | 295 | 106 | 106 | 175 | 175 | 216 | 216 | 282 | 282 | 97 | 97 | 187 | 202 | 187 | 203 | 254 | 254 |
| | Wa029-16-Q1 | 124 | 124 | 169 | 169 | 234 | 234 | 295 | 295 | 106 | 106 | 175 | 175 | 216 | 216 | 282 | 282 | 97 | 97 | 202 | 202 | 203 | 203 | 254 | 254 |
| | Wa029-16-G1 | 124 | 124 | 169 | 169 | 234 | 234 | 295 | 295 | 106 | 106 | 175 | 175 | 216 | 216 | 282 | 282 | 97 | 97 | 187 | 202 | 187 | 203 | 254 | 254 |
| | Wa029-18-Q1 | 97 | 97 | 171 | 171 | 224 | 224 | 285 | 285 | 111 | 111 | 178 | 178 | 216 | 221 | 286 | 286 | 93 | 107 | 156 | 156 | 203 | 207 | 258 | 258 |
| | Wa029-18-Q2 | 97 | 97 | 171 | 171 | 224 | 224 | 285 | 285 | 111 | 111 | 178 | 178 | 216 | 221 | 286 | 286 | 93 | 107 | 156 | 156 | 203 | 207 | 258 | 258 |
| I. del Cerrito | Wa035-01-Q1 | 97 | 97 | 191 | 191 | 224 | 224 | 285 | 326 | 102 | 102 | 182 | 184 | 216 | 221 | 289 | 289 | 85 | 93 | 160 | 160 | 201 | 207 | 256 | 256 |
| | Wa035-03-Q1 | 97 | 97 | 185 | 185 | 224 | 224 | 285 | 297 | 102 | 102 | 182 | 184 | 216 | 221 | 289 | 289 | 83 | 95 | 156 | 156 | 201 | 207 | 256 | 256 |
| | Wa035-03-Q2 | 97 | 97 | 185 | 185 | 224 | 224 | 285 | 297 | 102 | 102 | 182 | 184 | 216 | 221 | 289 | 289 | 83 | 95 | 156 | 156 | 201 | 207 | 256 | 256 |
| C. Machuca | Wa036-07-M1 | 101 | NA | 156 | NA | 230 | NA | 299 | NA | 100 | NA | 205 | NA | 219 | NA | NA | 80 | NA | 181 | NA | 209 | NA | 264 | NA | |
| | Wa036-07-M3 | 138 | NA | 177 | NA | 224 | NA | 316 | NA | 89 | NA | 179 | NA | 219 | NA | 303 | NA | 85 | NA | 164 | NA | 201 | NA | 264 | NA |
| | Wa036-07-M2 | 128 | NA | 185 | NA | 214 | NA | 299 | NA | 100 | NA | 205 | NA | 219 | NA | NA | 80 | NA | 181 | NA | 209 | NA | 264 | NA | |
| | Wa036-08-M1 | 105 | NA | 156 | NA | 232 | NA | 322 | NA | 102 | NA | NA | 216 | NA | 269 | NA | 91 | NA | 179 | NA | 207 | NA | 248 | NA | |
| | Wa036-08-M3 | 95 | NA | 156 | NA | 232 | NA | 282 | NA | 102 | NA | NA | 216 | NA | 289 | NA | 89 | NA | 179 | NA | 207 | NA | 248 | NA | |
| | Wa036-08-M2 | 105 | NA | 156 | NA | 232 | NA | 282 | NA | 102 | NA | NA | 216 | NA | 269 | NA | 89 | NA | 187 | NA | 207 | NA | 248 | NA | |
| Yuto | 011-03-Q1 | 93 | 99 | 149 | 149 | 211 | 222 | 282 | 305 | 100 | 100 | 170 | 196 | 216 | 216 | 292 | 299 | 85 | 95 | 134 | 134 | 205 | 219 | 252 | 262 |
| | 011-04-Q1 | 97 | 99 | 167 | 191 | 226 | 226 | 291 | 291 | 100 | 100 | 180 | 184 | 217 | 217 | 288 | 299 | 85 | 97 | 138 | 138 | 197 | 197 | 258 | 260 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|-----------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 011-05-Q1 | 97 | 99 | 167 | 191 | 226 | 226 | 291 | 291 | 100 | 100 | 180 | 184 | 217 | 217 | 288 | 299 | 85 | 97 | 138 | 138 | 197 | 197 | 258 | 260 |
| | 011-06-Q1 | 97 | 99 | 167 | 191 | 226 | 226 | 291 | 291 | 100 | 100 | 180 | 184 | 217 | 217 | 288 | 299 | 85 | 97 | 138 | 138 | 197 | 197 | 258 | 260 |
| | 011-07-Q1 | 97 | 99 | 167 | 191 | 226 | 226 | 291 | 291 | 100 | 100 | 180 | 184 | 217 | 217 | 288 | 299 | 85 | 97 | 138 | 138 | 197 | 197 | 258 | 260 |
| | 011-08-Q1 | 97 | 99 | 167 | 191 | 226 | 226 | 291 | 291 | 100 | 100 | 180 | 184 | 217 | 217 | 288 | 299 | 85 | 97 | 138 | 138 | 197 | 197 | 258 | 260 |
| | 011-09-Q1 | 97 | 99 | 167 | 191 | 226 | 226 | 291 | 291 | 100 | 100 | 180 | 184 | 217 | 217 | 288 | 299 | 85 | 97 | 138 | 138 | 197 | 197 | 258 | 260 |
| Ocloyas | 040-01-Q1 | 93 | 93 | 173 | 177 | 222 | 222 | 282 | 282 | 100 | 100 | 170 | 196 | 216 | 216 | 292 | 299 | 85 | 95 | 146 | 181 | 205 | 219 | 252 | 262 |
| | 040-03-G1 | 93 | 93 | 173 | 177 | 222 | 222 | 282 | 282 | 100 | 100 | 170 | 196 | 216 | 216 | 292 | 299 | 85 | 95 | 146 | 181 | 205 | 219 | 252 | 262 |
| | 040-02-G1 | 93 | 93 | 173 | 173 | 228 | 228 | 282 | 284 | 100 | 100 | 170 | 196 | 216 | 217 | 294 | 299 | 85 | 95 | 146 | 181 | 205 | 219 | 252 | 252 |
| | 040-06-G1 | 93 | 93 | 173 | 173 | 228 | 228 | 282 | 284 | 100 | 100 | 170 | 196 | 216 | 217 | 294 | 299 | 85 | 95 | 146 | 181 | 205 | 219 | 252 | 252 |
| | 040-05-Q1 | 93 | 93 | 173 | 173 | 228 | 228 | 282 | 284 | 100 | 100 | 170 | 196 | 216 | 217 | 294 | 299 | 95 | 95 | 146 | 146 | 205 | 219 | 252 | 252 |
| Tumbaya | 041-01-Q1 | 99 | 99 | 167 | 167 | 222 | 222 | 284 | 291 | 100 | 100 | 182 | 208 | 216 | 219 | 280 | 303 | 91 | 101 | 146 | 146 | 213 | 216 | 252 | 252 |
| | 041-02-Q1 | 99 | 99 | 167 | 167 | 222 | 222 | 284 | 291 | 100 | 100 | 182 | 208 | 216 | 219 | 280 | 303 | 91 | 101 | 146 | 146 | 213 | 216 | 252 | 252 |
| | 041-04-Q1 | 99 | 99 | 167 | 167 | 222 | 222 | 284 | 291 | 100 | 100 | 182 | 208 | 216 | 219 | 280 | 303 | 91 | 101 | 146 | 146 | 213 | 216 | 252 | 252 |
| | 041-05-Q1 | 99 | 99 | 167 | 167 | 222 | 222 | 284 | 291 | 100 | 100 | 182 | 208 | 216 | 219 | 280 | 303 | 91 | 101 | 146 | 146 | 213 | 216 | 252 | 252 |
| Hurlingham | 042-01-Q1 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 184 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 260 | 260 |
| | 042-02-Q1 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 042-02-Q2 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 184 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 042-03-Q1 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 184 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| CABA | 044-01-Q1 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 044-02-Q1 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 184 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 044-02-Q2 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 044-03-Q1 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 044-04-Q1 | 93 | 93 | | | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 044-05-Q1 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| Zárate | 049-03-Q1 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 049-03-Q2 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 049-04-Q1 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 049-04-Q2 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 050-01-Q1 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| | 050-01-Q2 | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| C. Las Tejas | 045-01-Q1 | 93 | 93 | 173 | 185 | 218 | 218 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 183 | 216 | 216 | 280 | 282 | 85 | 95 | 146 | 146 | 197 | 197 | 250 | 252 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-----------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 045-02-Q1 | 93 | 93 | 173 | 185 | 218 | 218 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 183 | 216 | 216 | 280 | 282 | 85 | 95 | 146 | 146 | 197 | 197 | 250 | 250 |
| | 045-07-Q1 | 93 | 93 | 173 | 185 | 218 | 218 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 183 | 216 | 216 | 280 | 282 | 85 | 95 | 146 | 146 | 197 | 197 | 250 | 252 |
| | 045-07-Q2 | 93 | 93 | 173 | 173 | 218 | 218 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 183 | 216 | 216 | 280 | 282 | 85 | 95 | 146 | 146 | 197 | 197 | 250 | 252 |
| | 047-01-Q1 | 93 | 93 | 173 | 185 | 218 | 218 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 183 | 216 | 216 | 280 | 282 | 85 | 95 | 146 | 146 | 197 | 197 | 250 | 252 |
| | 047-01-Q2 | 93 | 93 | 173 | 185 | 218 | 218 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 183 | 216 | 216 | 280 | 282 | 85 | 95 | 146 | 146 | 197 | 197 | 250 | 252 |
| | 047-02-Q1 | 93 | 93 | 173 | 185 | 218 | 218 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 183 | 216 | 216 | 280 | 282 | 85 | 95 | 146 | 146 | 197 | 197 | 250 | 252 |
| | 047-02-Q2 | 93 | 93 | 173 | 185 | 218 | 218 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 183 | 216 | 216 | 280 | 282 | 85 | 95 | 146 | 146 | 197 | 197 | 250 | 252 |
| | 046-02-Q1 | 93 | 97 | 167 | 173 | 212 | 212 | 305 | 305 | 113 | 113 | 186 | 186 | 216 | 217 | 278 | 280 | 85 | 91 | 146 | 146 | 205 | 205 | 250 | 262 |
| | 046-02-Q2 | 93 | 97 | 167 | 173 | 212 | 212 | 305 | 305 | 113 | 113 | 186 | 186 | 216 | 217 | 278 | 280 | 85 | 91 | 146 | 146 | 205 | 205 | 250 | 262 |
| | 046-03-Q1 | 93 | 97 | 167 | 173 | 212 | 212 | 305 | 305 | 113 | 113 | 186 | 186 | 216 | 217 | 278 | 280 | 85 | 91 | 146 | 146 | 205 | 205 | 250 | 262 |
| | 046-03-Q2 | 93 | 97 | 167 | 173 | 212 | 212 | 305 | 305 | 113 | 113 | 186 | 186 | 216 | 217 | 278 | 280 | 85 | 91 | 146 | 146 | 205 | 205 | 250 | 262 |
| | 046-04-Q1 | 93 | 97 | 167 | 173 | 212 | 212 | 305 | 305 | 113 | 113 | 186 | 186 | 216 | 217 | 278 | 280 | 85 | 91 | 146 | 146 | 205 | 205 | 250 | 262 |
| | 046-04-Q2 | 93 | 97 | 167 | 173 | 212 | 212 | 305 | 305 | 113 | 113 | 186 | 186 | 216 | 217 | 278 | 280 | 85 | 91 | 146 | 146 | 205 | 205 | 250 | 262 |
| | 046-05-Q1 | 93 | 97 | 167 | 173 | 212 | 212 | 305 | 305 | 113 | 113 | 186 | 186 | 216 | 217 | 278 | 280 | 85 | 91 | 146 | 146 | 205 | 205 | 250 | 262 |
| | 046-05-Q2 | 93 | 97 | 167 | 173 | 212 | 212 | 305 | 305 | 113 | 113 | 186 | 186 | 216 | 217 | 278 | 280 | 85 | 91 | 146 | 146 | 205 | 205 | 250 | 262 |
| | 051-02-Q1 | 93 | 97 | 167 | 195 | 212 | 234 | 284 | 301 | 123 | 123 | 188 | 204 | 216 | 216 | 278 | 315 | 91 | 95 | 146 | 146 | 199 | 207 | 252 | 252 |
| | 051-02-Q2 | 93 | 97 | 167 | 195 | 212 | 234 | 284 | 301 | 123 | 123 | 188 | 204 | 216 | 216 | 278 | 315 | 91 | 95 | 146 | 146 | 199 | 207 | 252 | 262 |
| | 051-02-Q3 | 93 | 97 | 167 | 195 | 212 | 234 | 284 | 301 | 123 | 123 | 188 | 204 | 216 | 216 | 278 | 315 | 91 | 95 | 150 | 150 | 199 | 207 | 252 | 262 |
| | 051-01-Q1 | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 284 | 305 | 116 | 116 | 186 | 204 | 216 | 216 | 278 | 305 | 91 | 95 | 146 | 146 | 199 | 199 | 262 | 262 |
| San Pedro | 052-02-Q1 | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 284 | 305 | 116 | 116 | 186 | 204 | 216 | 216 | 278 | 305 | 91 | 95 | 146 | 146 | 199 | 199 | 262 | 262 |
| | 052-03-Q1 | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 284 | 305 | 116 | 116 | 186 | 204 | 216 | 216 | 278 | 305 | 91 | 95 | 146 | 146 | 199 | 199 | 262 | 262 |
| | 052-04-Q1 | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 284 | 305 | 116 | 116 | 186 | 204 | 216 | 216 | 278 | 305 | 91 | 95 | 146 | 146 | 199 | 199 | 262 | 262 |
| | 052-04-Q2 | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 284 | 305 | 116 | 116 | 186 | 204 | 216 | 216 | 278 | 305 | 91 | 95 | 146 | 146 | 199 | 199 | 262 | 262 |
| San Nicolás | 053-01-Q1 | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 285 | 287 | 104 | 104 | 181 | 202 | 216 | 216 | 288 | 288 | 89 | 89 | 144 | 144 | | | 250 | 250 |
| | 053-01-Q2 | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 285 | 287 | 100 | 104 | 181 | 202 | 216 | 216 | 288 | 288 | 89 | 89 | 144 | 144 | | | 250 | 250 |
| | 053-02-Q1 | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 285 | 287 | 100 | 104 | 181 | 202 | 216 | 216 | 288 | 288 | 89 | 89 | 144 | 144 | | | 250 | 250 |
| | 053-02-Q2 | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 285 | 287 | 100 | 104 | 181 | 202 | 216 | 216 | 288 | 288 | 89 | 89 | 144 | 144 | | | 250 | 250 |
| Rosario | 054-01-Q1 | 93 | 97 | 167 | 195 | 234 | 234 | 301 | 305 | 117 | 123 | 186 | 188 | 216 | 216 | 278 | 315 | 91 | 95 | 150 | 150 | 207 | 207 | 252 | 258 |
| | 054-04-Q1 | 93 | 97 | 167 | 195 | 234 | 234 | 301 | 305 | 117 | 123 | 186 | 188 | 216 | 216 | 278 | 315 | 91 | 95 | 150 | 150 | 207 | 207 | 252 | 258 |
| | 054-04-Q2 | 93 | 97 | 167 | 195 | 234 | 234 | 301 | 305 | 117 | 123 | 186 | 188 | 216 | 216 | 278 | 315 | 91 | 95 | 150 | 150 | 207 | 207 | 252 | 258 |
| | 054-03-Q1 | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 284 | 305 | 116 | 116 | 186 | 204 | 216 | 216 | 278 | 305 | 91 | 95 | 146 | 146 | 199 | 199 | 262 | 262 |

Tabla S.3.4. Para cada localidad muestreada (las cuales representan poblaciones) se indica el sistema de reproducción inferido, los linajes encontrados y los genotipos multilocus (GML) identificados a partir de 112 hembras reproductoras de *Wasmannia auropunctata* (reinas o hembras aladas no fecundadas).

| Localidad/población | Sistema reproductivo | Linaje | GML | No. hembras |
|-----------------------|----------------------|--------|-----|-------------|
| Yabotí | sexual | 1 | 1 | 1 |
| | | 2 | 2 | 1 |
| | | 3 | 3 | 1 |
| El Soberbio | sexual | 4 | 4 | 1 |
| | | 5 | 5 | 1 |
| | | 6 | 6 | 1 |
| | | 7 | 7 | 1 |
| Alba Posse | sexual | 8 | 8 | 1 |
| | | 9 | 9 | 1 |
| | | 10 | 10 | 1 |
| | | 11 | 11 | 1 |
| Posadas | ? | 12 | 12 | 1 |
| Encarnación | clonal | 13 | 13 | 1 |
| | | 13 | 14 | 1 |
| Dourados | clonal | 14 | 15 | 3 |
| | | 14 | 16 | 1 |
| El Socorro (Iberá) | mixto | 15 | 17 | 2 |
| | | 15 | 18 | 2 |
| | | 15 | 19 | 1 |
| | | 16 | 20 | 3 |
| Puerto Ocampo | mixto | 17 | 21 | 1 |
| | | 17 | 22 | 1 |
| | | 17 | 23 | 1 |
| | | 18 | 24 | 1 |
| San Javier | mixto | 19 | 25 | 1 |
| | | 20 | 26 | 1 |
| | | 20 | 27 | 1 |
| | | 21 | 28 | 1 |
| | | 21 | 29 | 1 |
| Reconquista | clonal | 21 | 30 | 1 |
| | | 22 | 31 | 1 |
| | | 22 | 32 | 1 |
| Gobernador Crespo | clonal | 22 | 33 | 2 |
| | | 23 | 34 | 4 |
| | | 24 | 35 | 5 |
| Paraná | clonal | 24 | 35 | 5 |
| | | 25 | 36 | 2 |
| Colón | clonal | 25 | 36 | 2 |
| | | 25 | 37 | 8 |
| San Pedro | clonal | 26 | 38 | 1 |
| Camping Las Tejas | clonal | 27 | 39 | 1 |
| Ciud. de Buenos Aires | clonal | 28 | 40 | 1 |

| | | | | |
|------------------------|--------|----|----|-----|
| Lozano | clonal | 29 | 41 | 5 |
| La Población | mixto | 30 | 42 | 1 |
| | | 31 | 43 | 1 |
| Tolombón | clonal | 31 | 44 | 1 |
| | | 31 | 45 | 1 |
| San Miguel de Tucumán | mixto | 32 | 46 | 2 |
| | | 33 | 47 | 1 |
| | | 33 | 48 | 1 |
| Loreto - San Martín | clonal | 34 | 49 | 10 |
| Anillaco | clonal | 35 | 50 | 1 |
| | | 35 | 51 | 5 |
| Puerto Alegre | clonal | 36 | 52 | 3 |
| | | 37 | 53 | 1 |
| Puerto Alegre y Torres | clonal | 37 | 54 | 7 |
| Paraty y San Sebastián | clonal | 38 | 55 | 4 |
| | | 38 | 56 | 1 |
| Paranagua | clonal | 39 | 57 | 2 |
| Cuevas | clonal | 40 | 58 | 2 |
| | | 40 | 59 | 1 |
| <hr/> | | | | |
| Total | | 40 | 59 | 112 |

Inf. Sup. Capítulo 5

Tabla S.5.1. Lista de los especímenes de *Wasmannia auropunctata* secuenciados y los números de acceso (NA) de GenBank.

| ID muestra | Localidad | País | NA GenBank |
|-------------------|-----------------------|-------------|-------------------|
| WAS09_W1 | Calilegua | Argentina | KR106300 |
| WAS09_W2 | Calilegua | Argentina | KR106301 |
| WAS10_W1 | Calilegua | Argentina | KR106302 |
| WAS26_01_W1 | Loreto | Argentina | KR106303 |
| WAS26_02_W1 | Loreto | Argentina | KR106304 |
| WAS29_15_W1 | Puerto Ocampo | Argentina | KR106305 |
| WAS29_17_W1 | Puerto Ocampo | Argentina | KR106306 |
| WAS29_18_W1 | Puerto Ocampo | Argentina | KR106307 |
| WAS31_01_W1 | Parque Nacional Chaco | Argentina | KR106308 |
| WAS32_02_W1 | Herradura | Argentina | KR106309 |
| WAS35_03_W1 | Isla del Cerrito | Argentina | KR106310 |
| WAS36_02_W1 | Santa Ana | Argentina | KR106311 |
| WAS36_07_W1 | Santa Ana | Argentina | KR106312 |
| WAS41_W1 | Tumbaya | Argentina | KR106313 |
| WAS42_02_W1 | Hurlingham | Argentina | KR106314 |
| WAS45_W1 | Zárate (Las Tejas) | Argentina | KR106315 |
| WAS45_W2 | Zárate (Las Tejas) | Argentina | KR106316 |
| WAS46_08_W1 | Zárate (Las Tejas) | Argentina | KR106317 |
| WAS49_03_W1 | Zárate | Argentina | KR106318 |
| WAS53_01_W1 | San Nicolás | Argentina | KR106319 |
| WAS54_04_W1 | Rosario | Argentina | KR106320 |
| WAS56_02_W1 | Zárate | Argentina | KR106321 |
| WAS57_01_W1 | Reconquista | Argentina | KR106322 |
| WAS59_01_W1 | San Javier | Argentina | KR106323 |
| WAS59_02_W1 | San Javier | Argentina | KR106324 |
| WAS59_03_W1 | San Javier | Argentina | KR106325 |
| WAS60-01-W1 | San F. de Laishi | Argentina | KR106326 |
| WAS60_02_W1 | San F. de Laishi | Argentina | KR106327 |
| WAS64-01-W1 | El Soberbio | Argentina | KR106328 |
| WAS66_01_W1 | Yabotí | Argentina | KR106329 |
| WAS68_01_W1 | San Cayetano | Argentina | KR106330 |
| WAS69_01_W1 | Colón | Argentina | KR106331 |
| WAS69_02_W1 | Colón | Argentina | KR106332 |
| WAS69_03_W1 | Colón | Argentina | KR106333 |
| WAS76_01_W1 | Iberá | Argentina | KR106334 |
| WAS80_01_W1 | Carmen de Areco | Argentina | KR106335 |
| WAS84_01_W1 | Fray Bentos | Uruguay | KR106336 |
| WAS85_01_W1 | Nueva Palmira | Uruguay | KR106337 |

| | | | |
|--------------|----------------------------|-----------------|----------|
| WAS85_02_W1 | Nueva Palmira | Uruguay | KR106338 |
| WAS85_03_W1 | Nueva Palmira | Uruguay | KR106339 |
| WAS86_01_W1 | Carmelo | Uruguay | KR106340 |
| WAS86_02_W1 | Carmelo | Uruguay | KR106341 |
| WAS86_03_W1 | Carmelo | Uruguay | KR106342 |
| WAS87_01_W1 | Colonia del Sacramento | Uruguay | KR106343 |
| WAS88_01_W1 | Rio Grande | Brasil | KR106344 |
| WAS89_01_W1 | Puerto Alegre | Brasil | KR106345 |
| WAS90_01_W1 | Puerto Alegre | Brasil | KR106346 |
| WAS91_01_W1 | Torres | Brasil | KR106347 |
| WAS92_01_w1 | Garopaba | Brasil | KR106348 |
| WAS93_01_W1 | Florianopolis | Brasil | KR106349 |
| WAS94_01_W1 | Tijucas | Brasil | KR106350 |
| WAS96_01_W1 | San Francisco do Sul | Brasil | KR106351 |
| WAS97_01_W1 | Curitiba | Brasil | KR106352 |
| WAS98_01_W1 | Paranagua | Brasil | KR106353 |
| WAS99_01_W1 | Paranagua | Brasil | KR106354 |
| WAS100_01_W1 | Caioba | Brasil | KR106355 |
| WAS101_01_W1 | Rio do Sul | Brasil | KR106356 |
| WAS102_01_W1 | Santos | Brasil | KR106357 |
| WAS103_01_W1 | Guaruja | Brasil | KR106358 |
| WAS104_01_W1 | Sao Sebastiao | Brasil | KR106359 |
| WAS105_01_W1 | Caraguatatuba | Brasil | KR106360 |
| WAS106_01_W1 | Ubatuba | Brasil | KR106361 |
| WAS107_01_W1 | Paraty | Brasil | KR106362 |
| WAS108_01_W1 | Buzios | Brasil | KR106363 |
| WAS109_02_w1 | Buzios | Brasil | KR106364 |
| WAS111_01_W1 | Posadas | Argentina | KR106365 |
| WAS112_01_W1 | Encarnación | Paraguay | KR106366 |
| WAS113_01_W1 | San Miguel | Paraguay | KR106367 |
| WAS114_01_W1 | Piribebuy | Paraguay | KR106368 |
| WAS115_01_W1 | Itacurubí de la Cordillera | Paraguay | KR106369 |
| WAS116_01_W1 | Juan O'Leary | Paraguay | KR106370 |
| WAS117_01_W1 | Guaira | Brasil | KR106371 |
| WAS119_01_W2 | Ponta Porá | Brasil | KR106372 |
| WAS120_01_W2 | 25 de Diciembre | Paraguay | KR106373 |
| WAS128_01_W1 | Mercedes | Argentina | KR106374 |
| WAS131_01_W1 | Sulphur Springs | Dominica | KR106375 |
| WAS144_01_W1 | Tarija | Bolivia | KR106376 |
| WAS145_01_W1 | Pampa Grande | Bolivia | KR106377 |
| WAS146_01_W1 | Cuevas | Bolivia | KR106378 |
| WAS147_01_W1 | Iguazú | Argentina | KR106379 |
| WAS148_01_Q1 | Lozano | Argentina | KR106380 |
| M7-Q2 | Sinnamary/Kourou | Guyana Francesa | KR106381 |

| | | | |
|---------------------|----------------------|-----------------|----------|
| P2-1-Q1 | Sinnamary | Guyana Francesa | KR106382 |
| P2-2-Q1 | Sinnamary | Guyana Francesa | KR106383 |
| P3-W7 | Sinnamary | Guyana Francesa | KR106384 |
| Pi41-Q2 | Sinnamary | Guyana Francesa | KR106385 |
| Pi32-L2 | Sinnamary | Guyana Francesa | KR106386 |
| M6-6-1N1 | Sinnamary/Kourou | Guyana Francesa | KR106387 |
| M6-6-3N1 | Sinnamary/Kourou | Guyana Francesa | KR106388 |
| M6-6-Q6G1 | Sinnamary/Kourou | Guyana Francesa | KR106389 |
| M6epi-Q1 | Sinnamary/Kourou | Guyana Francesa | KR106390 |
| M6sol-Q1 | Sinnamary/Kourou | Guyana Francesa | KR106391 |
| M1epi-Q2 | Sinnamary/Kourou | Guyana Francesa | KR106392 |
| M1sol-Q1 | Sinnamary/Kourou | Guyana Francesa | KR106393 |
| M11-Q2 | Sinnamary/Kourou | Guyana Francesa | KR106394 |
| M11-W1 | Sinnamary/Kourou | Guyana Francesa | KR106395 |
| Bresil-OUNA1-Q1 | Una | Brasil | KR106396 |
| Bresil-OCR3-Q1 | Itabuna | Brasil | KR106397 |
| Bresil-OCR3-Q2 | Itabuna | Brasil | KR106398 |
| Bresil-OCPI-Q1 | Itabuna | Brasil | KR106399 |
| Bresil-OIT2-Q1 | Itajuípe | Brasil | KR106400 |
| Argentine-011-04-Q1 | Yuto | Argentina | KR106401 |
| Argentine-029-01-W3 | Puerto Ocampo | Argentina | KR106402 |
| Argentine-036-01-W2 | Santa Ana | Argentina | KR106403 |
| Argentine-040-01-Q1 | Ocloyas | Argentina | KR106404 |
| Argentine-041-01-W2 | Tumbaya | Argentina | KR106405 |
| Argentine-042-01-Q1 | Hurlingham | Argentina | KR106406 |
| Argentine-043-02-W5 | Iberá | Argentina | KR106407 |
| Argentine-044-02-Q1 | Buenos Aires | Argentina | KR106408 |
| Argentine-044-01-W2 | Buenos Aires | Argentina | KR106409 |
| Argentine-046-03-Q1 | Zárate (Las Tejas) | Argentina | KR106410 |
| Argentine-048-03-W1 | San Antonio de Areco | Argentina | KR106411 |
| Argentine-049-03-Q1 | Zárate | Argentina | KR106412 |
| Argentine-054-01-Q1 | Rosario | Argentina | KR106413 |
| Argentine-050-01-Q2 | Zárate | Argentina | KR106414 |
| Argentine-045-02-Q1 | Zárate (Las Tejas) | Argentina | KR106415 |
| Argentine-045-01-Q1 | Zárate (Las Tejas) | Argentina | KR106416 |
| Argentine-047-02-Q1 | Zárate (Las Tejas) | Argentina | KR106417 |
| Argentine-051-01-Q1 | Zárate (Las Tejas) | Argentina | KR106418 |
| Argentine-051-02-Q1 | Zárate (Las Tejas) | Argentina | KR106419 |
| Argentine-052-02-Q1 | San Pedro | Argentina | KR106420 |
| Argentine-052-03-Q1 | San Pedro | Argentina | KR106421 |
| Argentine-053-01-Q1 | San Nicolás | Argentina | KR106422 |
| WAS137_01_W1 | Chicoana | Argentina | KR106423 |
| WAS126_01_W2 | Manaquiri | Brasil | KR106424 |
| WAS82_01_W1 | Buenos Aires | Argentina | KR106425 |

| | | | |
|--------------|-------------------|-----------|----------|
| WAS122_01_W2 | Fazenda | Brasil | KR106426 |
| WAS124_01_W2 | Virúa | Brasil | KR106427 |
| WAS125_01_W2 | Ducke | Brasil | KR106428 |
| WAS123_01_W2 | Maracá | Brasil | KR106429 |
| WAS138_01_Q1 | La Población | Argentina | KR106430 |
| WAS121_01_W2 | Asunción | Paraguay | KR106431 |
| WAS118_01_W2 | Dourados | Brasil | KR106432 |
| WAS142_01_Q1 | Tucumán | Argentina | KR106433 |
| WAS134_01_W1 | Loreto-San Martín | Argentina | KR106434 |
| WAS141_01_W1 | Simoca | Argentina | KR106435 |
| WAS139_01_W1 | Cafayate | Argentina | KR106436 |
| WAS133_01_W1 | Ojo de Agua | Argentina | KR106437 |
| WAS150_01_Q1 | Buenos Aires | Argentina | KR106438 |
| WAS140_01_Q1 | Tolombón | Argentina | KR106439 |
| WAS127_01_W2 | Río Pinto | Argentina | KR106440 |
| WAS149_01_Q1 | Buenos Aires | Argentina | KR106441 |
| WAS136_01_W1 | Yuto | Argentina | KR106442 |
| WAS143_01_W2 | Bermejo | Bolivia | KR106443 |
| WAS147_01_W1 | Iguazú | Argentina | KR106444 |
| WAS110-01-W2 | Rio de Janeiro | Brasil | KR106445 |
| WAS138-02-Q1 | La Población | Argentina | KR106446 |
| WAS127_01_W3 | Río Pinto | Argentina | KR106447 |
| WAS_55_01_W1 | Paraná | Argentina | KR106448 |
| WAS_74_W1 | El Carmen | Argentina | KR106449 |
| WAS_81_01_W1 | Suipacha | Argentina | KR106450 |
| WAS_79_01_W1 | San Nicolás | Argentina | KR106451 |
| WAS_58_01_W1 | Gobernador Crespo | Argentina | KR106452 |
| WAS_61_01_W1 | El Bagual | Argentina | KR106453 |

Tabla S.5.2. Primers y condiciones de amplificación de los genes nucleares *Wingless* y Factor de Elongación 1 α (EF-1 α).

| Gen | Primers | Cita | Condiciones de PCR |
|-----------------|----------|------------------------|---|
| <i>Wingless</i> | Wg578F | Ward & Downie (2005) | 95°C por 2 min. |
| | Wg1032R | Abouheif & Wray (2002) | 37 ciclos de: 95°C por 30 seg., 50°C por 30 seg. Y 72°C por 1 min. Extensión final: 72°C por 3 min. |
| EF-1 α | F1-1424F | Brady et al. (2006) | 95°C por 2 min. |
| | F1-1829R | Brady et al. (2006) | 37 ciclos de: 95°C por 30 seg., 48°C por 30 seg. y 72°C por 45 seg. Extensión final: 72°C por 3 min. |

Tabla S.5.3. Matriz de 12 loci microsátelites, provista por Olivier Rey, utilizada para el análisis de STRUCTURE. Se indica el sistema de reproducción de cada localidad, C: clonal, M: mixto, S: sexual.

| Id. Muestras | Localidad | Sist. Rep. | Locus | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|------------|------------|---------------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | <i>Wa-418</i> | <i>Wa-730</i> | <i>Wa-3176</i> | <i>Wa-1gam</i> | <i>Wa-275</i> | <i>Wa-716</i> | <i>Wa-225</i> | <i>Wa-2164</i> | <i>Wa-1166</i> | <i>Wa-680</i> | <i>Wa-521</i> | <i>Wa-566</i> | | | | | | | | | | | | |
| Wa011_04_W1 | Bananal | C | 97 | 126 | 167 | 169 | 226 | 228 | 287 | 291 | 100 | 100 | 180 | 186 | 217 | 219 | 286 | 299 | 91 | 97 | 138 | 150 | 197 | 215 | 256 | 260 |
| Wa011_04_W2 | Bananal | C | 97 | 126 | 167 | 169 | 226 | 228 | 287 | 291 | 100 | 100 | 184 | 186 | 217 | 219 | 286 | 299 | 85 | 91 | 138 | 150 | 197 | 215 | 256 | 260 |
| Wa011_05_W2 | Bananal | C | 97 | 126 | 169 | 191 | 226 | 228 | 287 | 291 | 100 | 100 | 180 | 186 | 217 | 219 | 286 | 288 | 85 | 91 | 138 | 150 | 197 | 215 | 256 | 258 |
| Wa011_05_W1 | Bananal | C | 95 | 99 | 171 | 191 | 226 | 226 | 282 | 291 | 100 | 100 | 180 | 180 | 217 | 219 | 294 | 299 | 97 | 113 | 138 | 150 | 197 | 199 | 258 | 260 |
| Wa011_03_Q1 | Bananal | C | 93 | 99 | 149 | 149 | 211 | 222 | 282 | 305 | 100 | 100 | 170 | 196 | 216 | 216 | 292 | 299 | 85 | 95 | 134 | 134 | 205 | 219 | 252 | 262 |
| Wa029_02_W4 | P. Ocampo | M | 97 | 97 | 171 | 189 | 226 | 226 | 285 | 305 | 130 | 130 | 179 | 179 | 217 | 221 | 286 | 286 | 93 | 99 | 156 | 195 | 207 | 219 | 248 | 258 |
| Wa029_13_W1 | P. Ocampo | M | 97 | 97 | 181 | 189 | 226 | 226 | 285 | 305 | 130 | 130 | 183 | 213 | 217 | 221 | 280 | 280 | 87 | 99 | 154 | 154 | 201 | 219 | 248 | 256 |
| Wa029_14_W1 | P. Ocampo | M | 97 | 97 | 171 | 189 | 226 | 226 | 285 | 305 | 130 | 130 | 184 | 213 | 217 | 221 | 280 | 280 | 99 | 107 | 156 | 156 | 203 | 219 | 248 | 258 |
| Wa029_04_W1 | P. Ocampo | M | 97 | 97 | 171 | 189 | 218 | 226 | 285 | 305 | 113 | 130 | 179 | 179 | 216 | 217 | 278 | 280 | 99 | 107 | 150 | 156 | 203 | 219 | 248 | 258 |
| Wa029_06_W1 | P. Ocampo | M | 97 | 120 | 171 | 185 | 214 | 224 | 285 | 318 | 115 | 115 | 184 | 184 | 219 | 221 | 326 | 326 | 105 | 107 | 156 | 156 | 197 | 203 | 258 | 270 |
| Wa036_01_W1 | C. Machuca | S | 124 | 128 | 171 | 191 | 224 | 226 | 285 | 287 | 108 | 113 | 188 | 196 | 216 | 217 | 288 | 288 | 91 | 93 | 162 | 177 | 207 | 210 | 262 | 276 |
| Wa036_01_W2 | C. Machuca | S | 124 | 128 | 171 | 191 | 224 | 226 | 287 | 297 | 100 | 108 | 188 | 188 | 216 | 217 | 288 | 288 | 79 | 93 | 171 | 177 | 207 | 210 | 248 | 276 |
| Wa036_02_W2 | C. Machuca | S | 95 | 95 | 156 | 173 | 226 | 234 | 284 | 284 | 100 | 121 | 179 | 202 | 216 | 216 | 0 | 0 | 85 | 89 | 156 | 160 | 187 | 213 | 270 | 276 |
| Wa036_02_W1 | C. Machuca | S | 95 | 148 | 185 | 187 | 224 | 230 | 282 | 307 | 100 | 119 | 174 | 176 | 216 | 219 | 269 | 288 | 89 | 95 | 156 | 164 | 187 | 203 | 262 | 276 |
| Wa040_04_W1 | Ocloyas | C | 93 | 93 | 158 | 177 | 218 | 222 | 282 | 282 | 100 | 100 | 170 | 198 | 216 | 216 | 292 | 294 | 93 | 95 | 146 | 173 | 205 | 213 | 252 | 276 |
| Wa040_04_W2 | Ocloyas | C | 93 | 93 | 167 | 177 | 222 | 226 | 282 | 282 | 100 | 100 | 0 | 0 | 216 | 216 | 0 | 0 | 93 | 95 | 146 | 164 | 193 | 205 | 258 | 262 |
| Wa040_05_W1 | Ocloyas | C | 93 | 93 | 173 | 179 | 222 | 230 | 279 | 284 | 100 | 113 | 170 | 196 | 216 | 216 | 294 | 294 | 85 | 95 | 146 | 148 | 216 | 219 | 252 | 262 |
| Wa040_05_W2 | Ocloyas | C | 93 | 93 | 177 | 177 | 214 | 222 | 282 | 285 | 100 | 100 | 170 | 180 | 216 | 216 | 299 | 305 | 85 | 101 | 146 | 181 | 215 | 219 | 252 | 252 |
| Wa040_01_Q1 | Ocloyas | C | 93 | 93 | 173 | 177 | 222 | 222 | 282 | 282 | 100 | 100 | 170 | 196 | 216 | 216 | 292 | 299 | 85 | 95 | 146 | 181 | 205 | 219 | 252 | 262 |
| Wa041_01_W1 | Tumbaya | C | 99 | 140 | 167 | 187 | 211 | 222 | 284 | 315 | 100 | 100 | 188 | 208 | 216 | 216 | 275 | 280 | 91 | 115 | 146 | 177 | 199 | 213 | 248 | 252 |
| Wa041_01_W2 | Tumbaya | C | 99 | 140 | 167 | 187 | 211 | 222 | 284 | 315 | 98 | 98 | 188 | 208 | 216 | 219 | 275 | 280 | 101 | 115 | 146 | 177 | 199 | 216 | 248 | 252 |
| Wa041_02_W1 | Tumbaya | C | 99 | 140 | 167 | 187 | 211 | 222 | 291 | 315 | 100 | 100 | 182 | 188 | 216 | 216 | 275 | 280 | 91 | 115 | 146 | 177 | 199 | 216 | 248 | 252 |
| Wa041_02_W2 | Tumbaya | C | 99 | 140 | 167 | 187 | 211 | 222 | 284 | 315 | 100 | 100 | 188 | 208 | 216 | 216 | 275 | 280 | 101 | 115 | 146 | 177 | 199 | 213 | 248 | 252 |
| Wa041_01_Q1 | Tumbaya | C | 99 | 99 | 167 | 167 | 222 | 222 | 284 | 291 | 100 | 100 | 182 | 208 | 216 | 219 | 280 | 303 | 91 | 101 | 146 | 146 | 213 | 216 | 252 | 252 |
| Wa042_01_W2 | Hurlingham | C | 93 | 105 | 185 | 185 | 220 | 220 | 297 | 305 | 100 | 100 | 184 | 188 | 216 | 219 | 278 | 278 | 83 | 95 | 146 | 160 | 0 | 0 | 260 | 260 |
| Wa042_01_W3 | Hurlingham | C | 93 | 105 | 183 | 185 | 220 | 220 | 285 | 297 | 113 | 113 | 183 | 188 | 216 | 219 | 278 | 278 | 83 | 95 | 146 | 160 | 203 | 203 | 250 | 260 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|--------------|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Wa042_05_W1 | Hurlingham | C | 93 | 105 | 185 | 185 | 220 | 220 | 285 | 297 | 100 | 100 | 183 | 188 | 216 | 219 | 278 | 278 | 83 | 95 | 146 | 160 | 203 | 203 | 260 | 260 |
| Wa042_05_W4 | Hurlingham | C | 93 | 124 | 171 | 185 | 220 | 228 | 285 | 287 | 125 | 125 | 183 | 188 | 216 | 219 | 275 | 282 | 95 | 101 | 146 | 171 | 203 | 203 | 250 | 272 |
| Wa042_01_Q1 | Hurlingham | C | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 184 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 260 | 260 |
| Wa043_02_W1 | Iberá | ? | 93 | 105 | 185 | 185 | 220 | 220 | 285 | 297 | 113 | 113 | 183 | 188 | 216 | 221 | 278 | 278 | 93 | 103 | 158 | 162 | 205 | 205 | 260 | 260 |
| Wa043_09_W2 | Iberá | ? | 93 | 99 | 0 | 0 | 218 | 218 | 0 | 0 | 100 | 111 | 184 | 184 | 216 | 216 | 278 | 280 | 85 | 95 | 150 | 150 | 193 | 193 | 0 | 0 |
| Wa043_01_W1 | Iberá | ? | 93 | 124 | 171 | 185 | 220 | 228 | 285 | 287 | 113 | 113 | 183 | 188 | 216 | 221 | 275 | 278 | 85 | 103 | 158 | 162 | 199 | 205 | 260 | 272 |
| Wa043_10_W1 | Iberá | ? | 97 | 97 | 179 | 185 | 224 | 226 | 285 | 291 | 102 | 113 | 174 | 183 | 216 | 216 | 0 | 0 | 85 | 103 | 158 | 162 | 199 | 205 | 256 | 258 |
| Wa044_01_W2 | CABA | C | 93 | 105 | 185 | 185 | 220 | 220 | 297 | 305 | 100 | 100 | 186 | 188 | 216 | 219 | 278 | 282 | 83 | 95 | 146 | 160 | 203 | 203 | 260 | 260 |
| Wa044_01_W4 | CABA | C | 93 | 105 | 185 | 185 | 220 | 220 | 285 | 297 | 100 | 100 | 183 | 188 | 216 | 219 | 278 | 282 | 83 | 95 | 146 | 160 | 203 | 203 | 260 | 260 |
| Wa044_03_W1 | CABA | C | 93 | 105 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 297 | 100 | 100 | 183 | 188 | 216 | 219 | 278 | 278 | 83 | 95 | 146 | 160 | 203 | 203 | 260 | 260 |
| Wa044_03_W2 | CABA | C | 93 | 105 | 185 | 185 | 220 | 220 | 297 | 305 | 98 | 100 | 186 | 188 | 216 | 219 | 278 | 278 | 83 | 95 | 146 | 160 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| Wa044_01_Q1 | CABA | C | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| Wa045_02_W1 | C. Las Tejas | C | 93 | 108 | 173 | 193 | 218 | 220 | 297 | 305 | 0 | 0 | 188 | 188 | 216 | 219 | 278 | 280 | 83 | 85 | 142 | 146 | 0 | 0 | 250 | 260 |
| Wa045_04_W1 | C. Las Tejas | C | 93 | 103 | 0 | 0 | 218 | 228 | 285 | 303 | 100 | 113 | 0 | 0 | 216 | 219 | 278 | 280 | 85 | 99 | 150 | 175 | 193 | 195 | 252 | 260 |
| Wa045_08_W2 | C. Las Tejas | C | 93 | 103 | 185 | 195 | 218 | 228 | 284 | 305 | 98 | 100 | 0 | 0 | 216 | 219 | 278 | 282 | 95 | 99 | 146 | 175 | 197 | 197 | 250 | 260 |
| Wa045_10_W1 | C. Las Tejas | C | 93 | 108 | 185 | 193 | 218 | 220 | 285 | 297 | 100 | 100 | 183 | 188 | 216 | 219 | 278 | 280 | 83 | 95 | 142 | 146 | 193 | 197 | 252 | 260 |
| Wa045_01_Q1 | C. Las Tejas | C | 93 | 93 | 173 | 185 | 218 | 218 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 183 | 216 | 216 | 280 | 282 | 85 | 95 | 146 | 146 | 197 | 197 | 250 | 252 |
| Wa046_02_W1 | C. Las Tejas | C | 93 | 99 | 173 | 189 | 212 | 224 | 284 | 305 | 100 | 113 | 182 | 186 | 216 | 216 | 275 | 280 | 91 | 105 | 146 | 169 | 0 | 0 | 258 | 262 |
| Wa046_03_W1 | C. Las Tejas | C | 93 | 99 | 173 | 187 | 212 | 224 | 284 | 305 | 113 | 113 | 182 | 186 | 216 | 217 | 275 | 280 | 85 | 105 | 146 | 169 | 205 | 205 | 250 | 258 |
| Wa046_08_W1 | C. Las Tejas | C | 93 | 99 | 173 | 187 | 212 | 224 | 284 | 305 | 113 | 113 | 182 | 186 | 216 | 217 | 275 | 280 | 85 | 105 | 146 | 169 | 0 | 0 | 250 | 258 |
| Wa046_09_W1 | C. Las Tejas | C | 97 | 99 | 167 | 189 | 212 | 224 | 284 | 305 | 113 | 113 | 182 | 186 | 216 | 217 | 275 | 280 | 91 | 105 | 146 | 169 | 205 | 205 | 250 | 258 |
| Wa046_02_Q1 | C. Las Tejas | C | 93 | 97 | 167 | 173 | 212 | 212 | 305 | 305 | 113 | 113 | 186 | 186 | 216 | 217 | 278 | 280 | 85 | 91 | 146 | 146 | 205 | 205 | 250 | 262 |
| Wa047_01_W1 | C. Las Tejas | C | 93 | 108 | 185 | 189 | 218 | 220 | 285 | 297 | 98 | 100 | 183 | 186 | 216 | 219 | 280 | 280 | 83 | 85 | 146 | 162 | 197 | 197 | 250 | 260 |
| Wa047_01_W2 | C. Las Tejas | C | 93 | 108 | 185 | 189 | 218 | 220 | 285 | 297 | 98 | 100 | 183 | 186 | 216 | 219 | 280 | 282 | 83 | 85 | 146 | 167 | 0 | 0 | 250 | 260 |
| Wa047_02_W1 | C. Las Tejas | C | 93 | 108 | 185 | 189 | 218 | 220 | 297 | 305 | 98 | 100 | 186 | 186 | 216 | 219 | 280 | 282 | 83 | 95 | 146 | 162 | 197 | 197 | 250 | 260 |
| Wa047_02_W2 | C. Las Tejas | C | 93 | 108 | 173 | 189 | 218 | 220 | 297 | 305 | 100 | 100 | 186 | 186 | 216 | 219 | 280 | 282 | 83 | 95 | 146 | 162 | 0 | 0 | 252 | 260 |
| Wa047_01_Q1 | C. Las Tejas | C | 93 | 93 | 173 | 185 | 218 | 218 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 183 | 216 | 216 | 280 | 282 | 85 | 95 | 146 | 146 | 197 | 197 | 250 | 252 |
| Wa048_03_W1 | S.A Areco | ? | 93 | 105 | 185 | 189 | 220 | 220 | 297 | 305 | 100 | 100 | 186 | 188 | 216 | 219 | 278 | 282 | 83 | 95 | 146 | 160 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| Wa048_03_W10 | S.A Areco | ? | 93 | 105 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 297 | 100 | 100 | 183 | 188 | 216 | 219 | 278 | 278 | 83 | 95 | 146 | 160 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| Wa049_03_W1 | Zárate | C | 93 | 108 | 189 | 191 | 220 | 220 | 285 | 297 | 0 | 0 | 183 | 186 | 216 | 219 | 278 | 280 | 83 | 95 | 146 | 162 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| Wa049_03_W2 | Zárate | C | 93 | 108 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 297 | 98 | 100 | 183 | 186 | 216 | 219 | 278 | 280 | 83 | 95 | 146 | 162 | 0 | 0 | 250 | 260 |
| Wa049_04_W1 | Zárate | C | 93 | 108 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 297 | 0 | 0 | 183 | 186 | 216 | 219 | 280 | 282 | 83 | 95 | 146 | 162 | 203 | 203 | 250 | 260 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|--------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Wa049_03_Q1 | Zárate | C | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| Wa050_01_Q1 | Zárate | C | 93 | 93 | 185 | 189 | 220 | 220 | 285 | 305 | 100 | 100 | 183 | 186 | 216 | 216 | 278 | 282 | 95 | 95 | 146 | 146 | 203 | 203 | 250 | 260 |
| Wa051_01_W2 | C. Las Tejas | C | 97 | 99 | 167 | 191 | 212 | 224 | 284 | 284 | 116 | 116 | 182 | 204 | 216 | 216 | 275 | 305 | 95 | 105 | 146 | 167 | 199 | 199 | 258 | 262 |
| Wa051_02_W1 | C. Las Tejas | C | 97 | 99 | 167 | 191 | 212 | 224 | 284 | 284 | 123 | 123 | 182 | 204 | 216 | 216 | 275 | 278 | 95 | 105 | 150 | 167 | 207 | 207 | 252 | 258 |
| Wa051_02_W2 | C. Las Tejas | C | 93 | 99 | 191 | 195 | 212 | 224 | 284 | 284 | 100 | 100 | 182 | 204 | 216 | 216 | 275 | 278 | 95 | 105 | 150 | 167 | 207 | 207 | 258 | 262 |
| Wa051_01_W1 | C. Las Tejas | C | 93 | 108 | 189 | 189 | 212 | 220 | 284 | 297 | 0 | 0 | 186 | 204 | 216 | 219 | 280 | 280 | 83 | 95 | 146 | 162 | 0 | 0 | 260 | 262 |
| Wa051_01_Q1 | C. Las Tejas | C | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 284 | 305 | 116 | 116 | 186 | 204 | 216 | 216 | 278 | 305 | 91 | 95 | 146 | 146 | 199 | 199 | 262 | 262 |
| Wa052_01_W2 | San Pedro | C | 93 | 108 | 167 | 193 | 212 | 220 | 297 | 305 | 0 | 0 | 188 | 188 | 216 | 219 | 278 | 278 | 0 | 0 | 142 | 146 | 199 | 199 | 260 | 262 |
| Wa052_02_W1 | San Pedro | C | 93 | 108 | 156 | 193 | 212 | 220 | 284 | 297 | 0 | 0 | 188 | 204 | 216 | 219 | 278 | 305 | 83 | 91 | 142 | 146 | 199 | 199 | 260 | 262 |
| Wa052_03_W2 | San Pedro | C | 93 | 108 | 167 | 193 | 212 | 220 | 297 | 305 | 116 | 116 | 188 | 188 | 216 | 219 | 278 | 305 | 0 | 0 | 142 | 146 | 0 | 0 | 260 | 262 |
| Wa052_04_W2 | San Pedro | C | 97 | 108 | 167 | 193 | 212 | 220 | 297 | 305 | 116 | 116 | 188 | 188 | 216 | 219 | 278 | 278 | 83 | 91 | 142 | 146 | 0 | 0 | 260 | 262 |
| Wa052_02_Q1 | San Pedro | C | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 284 | 305 | 116 | 116 | 186 | 204 | 216 | 216 | 278 | 305 | 91 | 95 | 146 | 146 | 199 | 199 | 262 | 262 |
| Wa053_01_W1 | San Nicolás | C | 97 | 99 | 156 | 187 | 212 | 224 | 284 | 285 | 100 | 100 | 182 | 182 | 216 | 216 | 275 | 275 | 89 | 105 | 144 | 169 | 0 | 0 | 250 | 258 |
| Wa053_01_W2 | San Nicolás | C | 97 | 99 | 167 | 187 | 212 | 224 | 284 | 287 | 104 | 104 | 182 | 202 | 216 | 216 | 275 | 275 | 0 | 0 | 144 | 169 | 0 | 0 | 250 | 258 |
| Wa053_02_W2 | San Nicolás | C | 93 | 93 | 0 | 0 | 211 | 212 | 0 | 0 | 104 | 104 | 0 | 0 | 216 | 216 | 0 | 0 | 89 | 113 | 144 | 179 | 199 | 199 | 0 | 0 |
| Wa053_01_Q1 | San Nicolás | C | 93 | 97 | 156 | 167 | 212 | 212 | 285 | 287 | 104 | 104 | 181 | 202 | 216 | 216 | 288 | 288 | 89 | 89 | 144 | 144 | 0 | 0 | 250 | 250 |
| Wa054_01_W1 | Rosario | C | 97 | 108 | 167 | 189 | 220 | 234 | 297 | 301 | 123 | 123 | 182 | 188 | 216 | 219 | 278 | 278 | 0 | 0 | 150 | 162 | 0 | 0 | 252 | 260 |
| Wa054_02_W2 | Rosario | C | 93 | 126 | 167 | 171 | 212 | 226 | 287 | 305 | 116 | 116 | 186 | 186 | 216 | 219 | 275 | 278 | 85 | 95 | 146 | 175 | 0 | 0 | 262 | 276 |
| Wa054_03_W2 | Rosario | C | 93 | 99 | 167 | 187 | 212 | 224 | 284 | 305 | 100 | 100 | 182 | 186 | 216 | 216 | 275 | 305 | 95 | 105 | 146 | 169 | 199 | 199 | 258 | 262 |
| Wa054_04_W1 | Rosario | C | 95 | 97 | 171 | 195 | 226 | 234 | 282 | 301 | 123 | 123 | 188 | 188 | 216 | 219 | 278 | 294 | 95 | 113 | 150 | 150 | 199 | 207 | 252 | 258 |
| Wa054_01_Q1 | Rosario | C | 93 | 97 | 167 | 195 | 234 | 234 | 301 | 305 | 117 | 123 | 186 | 188 | 216 | 216 | 278 | 315 | 91 | 95 | 150 | 150 | 207 | 207 | 252 | 258 |
| OCR3_W01 | Itabuna | S | 99 | 99 | 169 | 169 | 226 | 230 | 279 | 279 | 108 | 115 | 182 | 186 | 217 | 217 | 301 | 307 | 91 | 95 | 146 | 164 | 201 | 201 | 244 | 264 |
| OCR3_W04 | Itabuna | S | 99 | 99 | 169 | 169 | 226 | 228 | 279 | 279 | 115 | 117 | 184 | 188 | 217 | 217 | 278 | 278 | 85 | 97 | 146 | 164 | 201 | 201 | 244 | 264 |
| OCR3_S_Q01 | Itabuna | S | 99 | 102 | 168 | 169 | 230 | 232 | 279 | 279 | 108 | 113 | 184 | 184 | 217 | 217 | 307 | 309 | 95 | 95 | 138 | 169 | 201 | 203 | 244 | 264 |
| OCR3_S_Q02 | Itabuna | S | 99 | 102 | 169 | 171 | 226 | 230 | 278 | 279 | 108 | 113 | 182 | 188 | 217 | 217 | 276 | 309 | 89 | 89 | 138 | 146 | 203 | 203 | 244 | 260 |
| OCR1_W02 | Itabuna | S | 99 | 102 | 169 | 176 | 228 | 230 | 279 | 279 | 111 | 111 | 180 | 184 | 217 | 217 | 276 | 309 | 91 | 97 | 146 | 146 | 199 | 201 | 260 | 264 |
| OCR1_W07 | Itabuna | S | 99 | 102 | 169 | 169 | 226 | 230 | 279 | 279 | 108 | 111 | 184 | 186 | 217 | 217 | 276 | 276 | 91 | 91 | 138 | 158 | 201 | 203 | 244 | 264 |
| OCR1_S_Q01 | Itabuna | S | 99 | 99 | 171 | 171 | 228 | 230 | 279 | 279 | 108 | 115 | 180 | 184 | 217 | 217 | 295 | 307 | 91 | 95 | 138 | 146 | 203 | 203 | 244 | 260 |
| OCR1_S_Q02 | Itabuna | S | 99 | 99 | 169 | 169 | 226 | 230 | 279 | 279 | 111 | 111 | 180 | 180 | 217 | 217 | 276 | 309 | 93 | 95 | 146 | 146 | 201 | 203 | 244 | 244 |
| OIT2_W01 | Itajuípe | C | 103 | 120 | 156 | 181 | 220 | 230 | 284 | 284 | 102 | 115 | 182 | 186 | 221 | 225 | 297 | 303 | 87 | 99 | 156 | 165 | 0 | 0 | 256 | 262 |
| OIT2_W04 | Itajuípe | C | 120 | 138 | 156 | 181 | 220 | 230 | 284 | 284 | 102 | 115 | 182 | 202 | 221 | 225 | 297 | 303 | 87 | 99 | 156 | 165 | 209 | 209 | 256 | 262 |
| OIT2_C_Q01 | Itajuípe | C | 103 | 138 | 181 | 181 | 220 | 220 | 284 | 284 | 115 | 115 | 186 | 202 | 217 | 221 | 294 | 303 | 93 | 99 | 156 | 156 | 209 | 209 | 262 | 262 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|-----------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| OITA2_W01 | Itajuipe | C | 103 | 103 | 181 | 187 | 220 | 228 | 284 | 285 | 115 | 115 | 192 | 202 | 221 | 221 | 301 | 303 | 91 | 99 | 156 | 183 | 209 | 209 | 260 | 262 |
| OITA2_W08 | Itajuipe | C | 103 | 103 | 181 | 187 | 220 | 228 | 284 | 285 | 117 | 117 | 186 | 192 | 217 | 221 | 301 | 303 | 91 | 93 | 156 | 183 | 209 | 209 | 260 | 262 |
| OITA_C_Q01 | Itajuipe | C | 103 | 138 | 181 | 181 | 220 | 220 | 284 | 284 | 115 | 115 | 186 | 202 | 217 | 221 | 294 | 303 | 93 | 99 | 156 | 156 | 209 | 209 | 262 | 262 |
| OUNA1_W01 | Una | C | 105 | 126 | 173 | 183 | 226 | 230 | 285 | 297 | 125 | 136 | 184 | 195 | 219 | 219 | 297 | 315 | 95 | 95 | 150 | 185 | 207 | 207 | 256 | 274 |
| OUNA1_W04 | Una | C | 105 | 118 | 173 | 185 | 226 | 237 | 285 | 299 | 106 | 130 | 184 | 195 | 219 | 219 | 288 | 315 | 99 | 107 | 181 | 185 | 199 | 207 | 264 | 258 |
| OUNA1_Q01 | Una | C | 118 | 126 | 171 | 183 | 218 | 230 | 285 | 285 | 106 | 136 | 184 | 195 | 219 | 219 | 303 | 315 | 95 | 99 | 150 | 189 | 205 | 207 | 260 | 264 |
| OCP1_W01 | Itabuna | C | 99 | 118 | 156 | 173 | 228 | 232 | 278 | 284 | 111 | 119 | 198 | 200 | 217 | 221 | 297 | 313 | 95 | 97 | 160 | 169 | 210 | 210 | 262 | 270 |
| OCP1_W05 | Itabuna | C | 99 | 118 | 156 | 173 | 228 | 232 | 278 | 284 | 111 | 119 | 198 | 200 | 217 | 221 | 282 | 313 | 95 | 97 | 160 | 169 | 210 | 210 | 262 | 270 |
| OCP1_Q01 | Itabuna | C | 99 | 103 | 156 | 177 | 232 | 232 | 284 | 310 | 111 | 113 | 200 | 200 | 219 | 221 | 282 | 297 | 87 | 97 | 160 | 160 | 213 | 213 | 262 | 262 |
| M3 W1 | Guyana Francesa | S | 126 | 126 | 162 | 181 | 230 | 240 | 290 | 290 | 113 | 122 | 184 | 184 | 227 | 231 | 305 | 305 | 93 | 93 | 159 | 167 | 213 | 213 | 255 | 267 |
| M3 W16 | Guyana Francesa | S | 104 | 126 | 162 | 183 | 228 | 238 | 296 | 305 | 132 | 136 | 184 | 184 | 225 | 231 | 297 | 314 | 93 | 95 | 159 | 159 | 213 | 213 | 255 | 265 |
| M3_S_Q1 | Guyana Francesa | S | 91 | 103 | 294 | 296 | 290 | 297 | 225 | 229 | 113 | 130 | 228 | 238 | 148 | 148 | 190 | 213 | 255 | 267 | 173 | 177 | 184 | 184 | 175 | 183 |
| M3_S_Q2 | Guyana Francesa | S | 81 | 103 | 290 | 298 | 276 | 301 | 225 | 231 | 130 | 134 | 230 | 232 | 126 | 126 | 190 | 213 | 273 | 273 | 157 | 173 | 184 | 184 | 175 | 183 |
| M3C W1 | Guyana Francesa | C | 102 | 120 | 183 | 189 | 232 | 236 | 286 | 296 | 107 | 113 | 192 | 194 | 225 | 227 | 282 | 298 | 95 | 99 | 157 | 181 | 209 | 213 | 267 | 277 |
| M3C W6 | Guyana Francesa | C | 102 | 120 | 183 | 191 | 232 | 236 | 286 | 298 | 107 | 113 | 192 | 198 | 225 | 227 | 282 | 298 | 95 | 99 | 157 | 181 | 209 | 213 | 267 | 277 |
| M3_C Q1 | Guyana Francesa | C | 97 | 99 | 296 | 298 | 298 | 298 | 227 | 227 | 113 | 113 | 232 | 232 | 102 | 116 | 0 | 0 | 277 | 277 | 181 | 181 | 194 | 198 | 189 | 191 |
| M7 W1 | Guyana Francesa | S | 106 | 144 | 189 | 197 | 222 | 242 | 0 | 0 | 128 | 130 | 195 | 195 | 225 | 225 | 284 | 294 | 95 | 109 | 175 | 179 | 215 | 219 | 265 | 265 |
| M7 W7 | Guyana Francesa | S | 100 | 114 | 187 | 187 | 224 | 232 | 284 | 327 | 126 | 128 | 182 | 195 | 225 | 229 | 292 | 292 | 95 | 108 | 171 | 171 | 205 | 215 | 271 | 277 |
| M7_S_Q2 | Guyana Francesa | S | 99 | 109 | 286 | 315 | 290 | 294 | 223 | 225 | 128 | 128 | 232 | 232 | 100 | 106 | 0 | 0 | 267 | 269 | 163 | 173 | 182 | 192 | 189 | 189 |
| M7_S_Q3 | Guyana Francesa | S | 90 | 117 | 0 | 0 | 288 | 288 | 225 | 225 | 115 | 128 | 234 | 234 | 100 | 106 | 205 | 219 | 265 | 275 | 179 | 197 | 182 | 202 | 187 | 189 |
| M11 W1 | Guyana Francesa | S | 100 | 140 | 164 | 197 | 224 | 230 | 280 | 286 | 107 | 126 | 0 | 0 | 225 | 225 | 288 | 300 | 99 | 101 | 173 | 181 | 201 | 209 | 267 | 273 |
| M11 W6 | Guyana Francesa | S | 104 | 130 | 183 | 208 | 230 | 236 | 298 | 300 | 126 | 130 | 184 | 184 | 225 | 229 | 301 | 305 | 91 | 101 | 167 | 175 | 207 | 207 | 255 | 275 |
| M11_S_Q1 | Guyana Francesa | S | 94 | 103 | 294 | 319 | 301 | 301 | 225 | 227 | 130 | 136 | 234 | 238 | 104 | 136 | 207 | 213 | 273 | 275 | 167 | 177 | 184 | 184 | 181 | 183 |
| M11_S_Q2 | Guyana Francesa | S | 101 | 105 | 290 | 290 | 307 | 307 | 225 | 231 | 130 | 136 | 220 | 230 | 104 | 142 | 201 | 207 | 255 | 273 | 177 | 179 | 184 | 188 | 177 | 191 |
| Ker W1 | Guyana Francesa | C | 112 | 116 | 157 | 213 | 230 | 242 | 282 | 292 | 105 | 107 | 192 | 198 | 223 | 279 | 309 | 317 | 95 | 97 | 155 | 185 | 205 | 209 | 265 | 287 |
| Ker W8 | Guyana Francesa | C | 112 | 116 | 157 | 213 | 230 | 242 | 282 | 288 | 105 | 107 | 184 | 192 | 223 | 279 | 309 | 317 | 94 | 95 | 155 | 185 | 205 | 209 | 265 | 287 |
| Ker_C_Q1 | Guyana Francesa | C | 94 | 97 | 288 | 292 | 307 | 309 | 223 | 223 | 105 | 117 | 230 | 230 | 100 | 112 | 205 | 205 | 287 | 287 | 155 | 155 | 184 | 198 | 157 | 175 |
| Pi41 W1 | Guyana Francesa | C | 100 | 118 | 160 | 209 | 230 | 242 | 282 | 298 | 105 | 107 | 192 | 198 | 223 | 271 | 298 | 321 | 95 | 95 | 171 | 187 | 209 | 209 | 263 | 265 |
| Pi41 W9 | Guyana Francesa | C | 100 | 118 | 157 | 209 | 230 | 242 | 282 | 298 | 107 | 113 | 192 | 198 | 225 | 271 | 298 | 321 | 95 | 97 | 173 | 187 | 209 | 209 | 263 | 265 |
| Pi41_C_Q2 | Guyana Francesa | C | 94 | 97 | 288 | 298 | 298 | 305 | 223 | 225 | 105 | 113 | 230 | 230 | 100 | 112 | 215 | 215 | 263 | 263 | 171 | 173 | 184 | 198 | 157 | 160 |
| P2_1 W2 | Guyana Francesa | C | 100 | 118 | 160 | 213 | 230 | 244 | 282 | 288 | 105 | 107 | 184 | 192 | 223 | 269 | 305 | 321 | 95 | 97 | 171 | 187 | 209 | 209 | 263 | 265 |
| P2_1_C_Q1 | Guyana Francesa | C | 94 | 97 | 288 | 298 | 298 | 305 | 223 | 225 | 105 | 115 | 230 | 230 | 100 | 112 | 213 | 213 | 263 | 263 | 171 | 171 | 184 | 198 | 157 | 160 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| P2_1 W5 | Guyana Francesa | C | 112 | 118 | 157 | 213 | 230 | 244 | 282 | 288 | 107 | 115 | 184 | 192 | 225 | 269 | 305 | 321 | 95 | 97 | 171 | 187 | 209 | 213 | 263 | 265 |
| P2_2 W2 | Guyana Francesa | C | 100 | 102 | 175 | 175 | 228 | 230 | 286 | 294 | 117 | 128 | 198 | 202 | 223 | 225 | 307 | 311 | 95 | 97 | 155 | 161 | 205 | 223 | 263 | 275 |
| P2_2 W4 | Guyana Francesa | C | 102 | 116 | 175 | 175 | 228 | 230 | 286 | 288 | 117 | 128 | 184 | 202 | 223 | 225 | 311 | 311 | 95 | 97 | 155 | 161 | 223 | 223 | 263 | 275 |
| P2_2_C_Q1 | Guyana Francesa | C | 94 | 97 | 288 | 294 | 307 | 311 | 223 | 223 | 105 | 117 | 230 | 230 | 100 | 116 | 205 | 205 | 263 | 263 | 155 | 155 | 184 | 198 | 157 | 175 |
| Cay W2 | Guyana Francesa | C | 100 | 112 | 160 | 197 | 222 | 232 | 286 | 288 | 105 | 120 | 184 | 210 | 223 | 225 | 290 | 305 | 87 | 97 | 173 | 177 | 215 | 221 | 263 | 269 |
| Cay W9 | Guyana Francesa | C | 100 | 112 | 160 | 197 | 222 | 232 | 286 | 288 | 105 | 120 | 184 | 210 | 223 | 225 | 290 | 305 | 87 | 94 | 173 | 185 | 221 | 221 | 263 | 269 |
| Cay_C_Q1 | Guyana Francesa | C | 97 | 99 | 288 | 296 | 286 | 305 | 223 | 223 | 105 | 115 | 222 | 222 | 100 | 112 | 215 | 215 | 263 | 263 | 173 | 173 | 184 | 198 | 157 | 160 |
| CR1 W1 | Costa Rica | ? | 104 | 104 | 183 | 193 | 228 | 228 | 301 | 305 | 122 | 136 | 184 | 188 | 229 | 231 | 273 | 294 | 102 | 102 | 167 | 173 | 209 | 223 | 253 | 267 |
| CR1 W6 | Costa Rica | ? | 104 | 104 | 177 | 179 | 222 | 226 | 301 | 305 | 111 | 122 | 188 | 190 | 229 | 235 | 273 | 294 | 102 | 116 | 165 | 173 | 223 | 229 | 267 | 269 |
| CR2 W4 | Costa Rica | ? | 106 | 106 | 175 | 175 | 226 | 238 | 301 | 321 | 111 | 132 | 186 | 186 | 229 | 229 | 275 | 285 | 108 | 108 | 171 | 171 | 205 | 205 | 253 | 259 |
| CR2 W7 | Costa Rica | ? | 106 | 106 | 173 | 175 | 226 | 238 | 301 | 321 | 111 | 132 | 186 | 186 | 229 | 229 | 275 | 285 | 108 | 108 | 171 | 171 | 205 | 205 | 253 | 259 |
| CR2 Q1 | Costa Rica | ? | 104 | 122 | 173 | 201 | 226 | 238 | 301 | 301 | 111 | 111 | 188 | 188 | 229 | 229 | 277 | 285 | 108 | 110 | 165 | 171 | 205 | 205 | 259 | 269 |
| CR3 W2 | Costa Rica | ? | 106 | 124 | 187 | 189 | 234 | 236 | 301 | 315 | 111 | 136 | 188 | 190 | 231 | 231 | 277 | 303 | 102 | 112 | 169 | 169 | 223 | 223 | 261 | 269 |
| CR3 W6 | Costa Rica | ? | 106 | 106 | 177 | 187 | 234 | 236 | 301 | 315 | 111 | 136 | 188 | 190 | 231 | 231 | 277 | 303 | 102 | 104 | 167 | 169 | 223 | 223 | 261 | 269 |
| CR3 G1 | Costa Rica | ? | 106 | 124 | 177 | 187 | 234 | 236 | 301 | 315 | 111 | 136 | 188 | 190 | 231 | 231 | 273 | 303 | 102 | 104 | 169 | 169 | 223 | 223 | 261 | 269 |
| CR4 W2 | Costa Rica | ? | 106 | 106 | 177 | 187 | 234 | 236 | 301 | 315 | 111 | 136 | 188 | 190 | 231 | 231 | 277 | 303 | 102 | 112 | 167 | 169 | 213 | 223 | 261 | 269 |
| CR4 W6 | Costa Rica | ? | 106 | 124 | 187 | 189 | 234 | 236 | 301 | 315 | 115 | 136 | 188 | 190 | 231 | 231 | 277 | 303 | 102 | 112 | 167 | 169 | 223 | 223 | 261 | 261 |
| CR5 W1 | Costa Rica | C | 106 | 106 | 177 | 187 | 234 | 236 | 301 | 315 | 111 | 136 | 188 | 190 | 231 | 231 | 277 | 303 | 102 | 112 | 167 | 169 | 223 | 223 | 261 | 269 |
| CR5 W4 | Costa Rica | C | 106 | 106 | 177 | 187 | 234 | 236 | 301 | 315 | 111 | 136 | 188 | 190 | 231 | 231 | 277 | 303 | 102 | 112 | 167 | 169 | 223 | 223 | 261 | 269 |
| CR5_C_G1 | Costa Rica | C | 106 | 124 | 177 | 187 | 234 | 236 | 301 | 315 | 111 | 136 | 188 | 190 | 231 | 231 | 277 | 303 | 102 | 104 | 169 | 169 | 223 | 223 | 261 | 269 |
| CR6 W2 | Costa Rica | ? | 106 | 106 | 177 | 187 | 234 | 236 | 301 | 315 | 111 | 136 | 188 | 190 | 231 | 231 | 273 | 303 | 102 | 112 | 167 | 169 | 223 | 223 | 261 | 269 |
| CR6 W7 | Costa Rica | ? | 106 | 106 | 187 | 189 | 234 | 236 | 301 | 315 | 115 | 136 | 188 | 190 | 231 | 231 | 273 | 303 | 102 | 112 | 167 | 169 | 223 | 223 | 261 | 261 |
| CR6 G1 | Costa Rica | ? | 106 | 124 | 187 | 189 | 234 | 236 | 301 | 315 | 111 | 136 | 188 | 190 | 231 | 231 | 273 | 303 | 102 | 104 | 167 | 169 | 223 | 223 | 261 | 269 |
| CR7 W3 | Costa Rica | ? | 106 | 132 | 179 | 185 | 226 | 226 | 311 | 311 | 109 | 153 | 188 | 194 | 221 | 231 | 0 | 0 | 104 | 108 | 163 | 165 | 205 | 229 | 263 | 263 |
| CR7 W6 | Costa Rica | ? | 122 | 128 | 191 | 198 | 226 | 238 | 311 | 311 | 113 | 152 | 192 | 194 | 221 | 221 | 273 | 298 | 100 | 104 | 165 | 175 | 217 | 221 | 261 | 263 |
| CR8 W1 | Costa Rica | S | 106 | 106 | 179 | 189 | 226 | 226 | 305 | 321 | 111 | 124 | 180 | 182 | 231 | 231 | 273 | 305 | 89 | 99 | 161 | 175 | 207 | 207 | 261 | 275 |
| CR8 W3 | Costa Rica | S | 106 | 124 | 169 | 196 | 226 | 236 | 298 | 322 | 111 | 115 | 180 | 180 | 229 | 229 | 273 | 296 | 99 | 99 | 169 | 169 | 207 | 215 | 261 | 263 |
| CR8_S_G1 | Costa Rica | S | 106 | 124 | 169 | 179 | 226 | 236 | 298 | 322 | 111 | 115 | 180 | 180 | 229 | 231 | 273 | 296 | 99 | 104 | 169 | 169 | 215 | 225 | 261 | 263 |
| CR8_S_G2 | Costa Rica | S | 106 | 106 | 179 | 189 | 226 | 226 | 305 | 321 | 111 | 124 | 180 | 182 | 231 | 231 | 273 | 305 | 89 | 99 | 161 | 175 | 207 | 207 | 269 | 275 |

Tabla S.5.4. Lista de las variables ambientales descargadas de WorldClim.

| Variable | Descripción |
|----------|---|
| Bio 1 | Temperatura Media Anual |
| Bio 2 | Promedio mensual del rango diurno (temp. máx. – temp. mín.) |
| Bio 3 | Isotermalidad (Bio2/Bio7) |
| Bio 4 | Estacionalidad de temperatura (desvío estándar de la temp. media anual*100) |
| Bio 5 | Temperatura máxima del mes más cálido |
| Bio 6 | Temperatura mínima del mes más frío |
| Bio 7 | Rango anual de temperatura (Bio 5 – Bio 6) |
| Bio 8 | Temperatura media del trimestre más húmedo |
| Bio 9 | Temperatura media del trimestre más seco |
| Bio 10 | Temperatura media del trimestre más cálido |
| Bio 11 | Temperatura media del trimestre más frío |
| Bio 12 | Precipitación anual |
| Bio 13 | Precipitación del mes más húmedo |
| Bio 14 | Precipitación del mes más seco |
| Bio 15 | Estacionalidad de precipitación (coeficiente de variación) |
| Bio 16 | Precipitación del trimestre más húmedo |
| Bio 17 | Precipitación del trimestre más seco |
| Bio 18 | Precipitación del trimestre más cálido |
| Bio 19 | Precipitación del trimestre más frío |

Tabla S.5.5. Sitios de muestreo, con sus coordenadas geográficas, número de individuos analizados por sitio (N) y haplotipos encontrados con su respectiva frecuencia entre paréntesis (n).

| País | Coordenadas | | N | Haplotipos (n) |
|----------------------------------|--------------------|-----------------|----------|-----------------------|
| Provincia/Estado/Distrito | Latitud | Longitud | | |
| Localidad | | | | |
| ARGENTINA | | | | |
| Buenos Aires | | | | |
| Ciudad de Buenos Aires | -34,58402 | -58,39642 | 5 | H1 |
| Hurlingham | -34,59336 | -58,64267 | 2 | H1 |
| San Antonio de Areco | -34,24716 | -59,47065 | 1 | H1 |
| Zárate | -34,09178 | -59,02576 | 4 | H1 |
| Las Tejas camping | -34,5841 | -58,39646 | 9 | H7(4), H8(1), H9(4) |
| San Pedro | -33,65787 | -59,71406 | 2 | H9 |
| San Nicolás | -33,28973 | -60,25682 | 3 | H9(1), H10(2) |
| Carmen de Areco | -34,3666 | -59,81666 | 1 | H14 |
| Mercedes | -34,683 | -59,433 | 1 | H1 |
| Lozano | -34,833 | -59,033 | 1 | H1 |
| Suipacha | -34,7691 | -59,68577 | 1 | H1 |
| Entre Ríos | | | | |
| Paraná | -31,71737 | -60,53961 | 1 | H52 |
| Colón | -32,22734 | -58,13002 | 3 | H1 |
| Santa Fe | | | | |
| Rosario | -32,89407 | -60,69099 | 2 | H1 |
| Gobernador Crespo | -30,36272 | -60,40085 | 1 | H12 |
| Reconquista | -29,1331 | -59,65323 | 1 | H11 |
| Puerto Ocampo | -28,53348 | -59,13384 | 4 | H4 |
| San Javier | -30,58201 | -59,92881 | 3 | H12 (2), H13(1) |
| Chaco | | | | |
| Isla del Cerrito | -27,29651 | -58,68102 | 1 | H5 |
| Parque Nacional Chaco | -26,80862 | -59,60497 | 1 | H3 |
| Formosa | | | | |
| Herradura | -26,48607 | -58,27816 | 1 | H3 |
| San Francisco de Laishi | -26,23989 | -58,62719 | 2 | H3 |
| El Bagual | -26,30448 | -58,81716 | 1 | H3 |
| Corrientes | | | | |
| Santa Ana (Machuca) | -27,37015 | -58,68437 | 3 | H3(1), H6(1), H44(1) |
| Iberá | -28,65500 | -57,43050 | 2 | H5, H46 |
| San Cayetano | -27,55263 | -58,67965 | 1 | H3 |
| Misiones | | | | |
| Loreto | -27,33023 | -55,52594 | 2 | H3 |
| El Soberbio | -27,26178 | -54,22457 | 1 | H3 |
| Yabotí | -27,21375 | -54,04319 | 1 | H3 |
| Posadas | -27,4069 | -55,89638 | 1 | H5 |

| | | | | |
|----------------------------|-----------|-------------|---|--------------|
| Parque Nacional Iguazú | -25,5166 | -54,1348 | 2 | H22 |
| Jujuy | | | | |
| Yuto | -23,57325 | -64,5104 | 1 | H1 |
| Tumbaya | -23,85578 | -65,46526 | 2 | H1 |
| Ocloyas | -23,97574 | -65,29283 | 1 | H45 |
| El Carmen | -24,42824 | -65,29743 | 1 | H53 |
| Parque Nacional Calilegua | -23,73579 | -64,85074 | 3 | H1(2), H2(1) |
| Yuto | -23,61707 | -64,5284 | 1 | H1 |
| Salta | | | | |
| La Población | -25,08084 | -65,52079 | 2 | H1, H12 |
| Chicoana | -25,09082 | -65,5668 | 1 | H9 |
| Cafayate | -26,09949 | -65,97082 | 1 | H12 |
| Tolombón | -26,18316 | -65,93982 | 1 | H12 |
| Tucumán | | | | |
| San Miguel de Tucumán | -26,8028 | -65,2048333 | 1 | H1 |
| Simoca | -27,47663 | -65,26491 | 1 | H51 |
| Santiago del Estero | | | | |
| Loreto-San Martín | -28,32257 | -64,13437 | 1 | H50 |
| Ojo de Agua | -29,51461 | -63,70392 | 1 | H10 |
| Córdoba | | | | |
| Río Pinto | -30,9333 | -64,6 | 2 | H5 |
| URUGUAY | | | | |
| Río Negro | | | | |
| Fray Bentos | -33,11365 | -58,31688 | 1 | H15 |
| Colonia | | | | |
| Nueva Palmira | -33,8647 | -58,41431 | 3 | H1 |
| Carmelo | -34,00163 | -58,28672 | 3 | H1 |
| Colonia del Sacramento | -34,47019 | -57,85239 | 1 | H1 |
| BRASIL | | | | |
| Río Grande do Sul | | | | |
| Río Grande | -32,03088 | -52,09647 | 1 | H16 |
| Porto Alegre | -30,032 | -51,22318 | 2 | H17 |
| Santa Catarina | | | | |
| Torres | -29,3445 | -49,72967 | 1 | H17 |
| Garopaba | -28,0206 | -48,61071 | 1 | H9 |
| Florianópolis | -27,66383 | -48,54037 | 1 | H18 |
| Tijucas | -27,2408 | -48,62134 | 1 | H9 |
| Río do Sul | -27,20288 | -49,63201 | 1 | H23 |
| San Francisco do Sul | -26,24771 | -48,62126 | 1 | H19 |
| Paraná | | | | |
| Curitiba | -25,42663 | -49,31737 | 1 | H20 |
| Paranagua | -25,51548 | -48,50794 | 2 | H21 |

| | | | | |
|----------------------------|------------|-------------|---|---------------|
| Guaira | -24,08042 | -54,25017 | 1 | H29 |
| Caiobá | -25,83123 | -48,54089 | 1 | H22 |
| Sao Paulo | | | | |
| Santos | -23,96476 | -46,38042 | 1 | H21 |
| Guaruja | -24,00747 | -46,2719 | 1 | H24 |
| Sao Sebastiao | -23,76248 | -45,41093 | 1 | H21 |
| Caraguatatuba | -23,61834 | -45,39801 | 1 | H25 |
| Ubatuba | -23,48772 | -45,10455 | 1 | H21 |
| Río de Janeiro | | | | |
| Paraty | -23,21534 | -44,71165 | 1 | H26 |
| Buzios | -22,74627 | -41,88018 | 2 | H26, H27 |
| Rio de Janeiro | -22,9794 | -43,21531 | 1 | H21 |
| Mato Grosso do Sul | | | | |
| Dourados | -22,21 | -54,8115 | 1 | H1 |
| Ponta Porá | -22,538 | -55,7251 | 1 | H24 |
| Amazonas | | | | |
| Virus | 1,487 | -61,007 | 1 | H1 |
| Maracá | 3,405 | -61,446 | 1 | H1 |
| Ducke | -2,945 | -59,962 | 1 | H1 |
| Fazenda | -2,641 | -60,096 | 1 | H48 |
| Manaquiri | -2,661 | -60,33 | 1 | H47 |
| Bahía | | | | |
| Una | -15,2707 | -39,0708 | 1 | H39 |
| Itabuna | -14,7856 | -39,2803 | 3 | H40, H41, H42 |
| Itajuípe | -14,687 | -39,366 | 1 | H43 |
| PARAGUAY | | | | |
| Itapua | | | | |
| Encarnación | -27,32259 | -55,86834 | 1 | H5 |
| Misiones | | | | |
| San Miguel | -26,53215 | -57,03888 | 1 | H10 |
| De la Cordillera | | | | |
| Piribebuy | -25,55456 | -57,03678 | 1 | H9 |
| Itacurubí de la Cordillera | -25,46149 | -56,85185 | 1 | H28 |
| Alto Paraná | | | | |
| Juan O'Leary | -25,41461 | -55,42276 | 1 | H10 |
| San Pedro | | | | |
| 25 de diciembre | -24,816 | -56,725 | 1 | H30 |
| Asunción | -25,248 | -57,5713 | 1 | H49 |
| BOLIVIA | | | | |
| Tarija | | | | |
| Bermejo | -22,7281 | -64,3533667 | 1 | H1 |
| Tarija | -21,528883 | -64,7408833 | 1 | H1 |

| | | | | | |
|--------------------------------|------------|-------------|-----|--|---|
| Santa Cruz de la Sierra | | | | | |
| Cuevas | -18,175917 | -63,7219333 | 1 | | H32 |
| Pampa Grande | -18,052167 | -64,1217667 | 1 | | H25 |
| DOMINICA | | | | | |
| Sulphur Springs | 15,24 | -61,3478 | 1 | | H31 |
| GUYANA FRANCESA | | | | | |
| Sinnamary | 5,2933 | -52,92583 | 5 | | H31(4), H34(1) |
| Kourou | 5,15917 | -52,975 | 10 | | H33(1), H35(5), H36(2), H37(1), H38(1) |
| <hr/> | | | | | |
| Total | | | 154 | | |

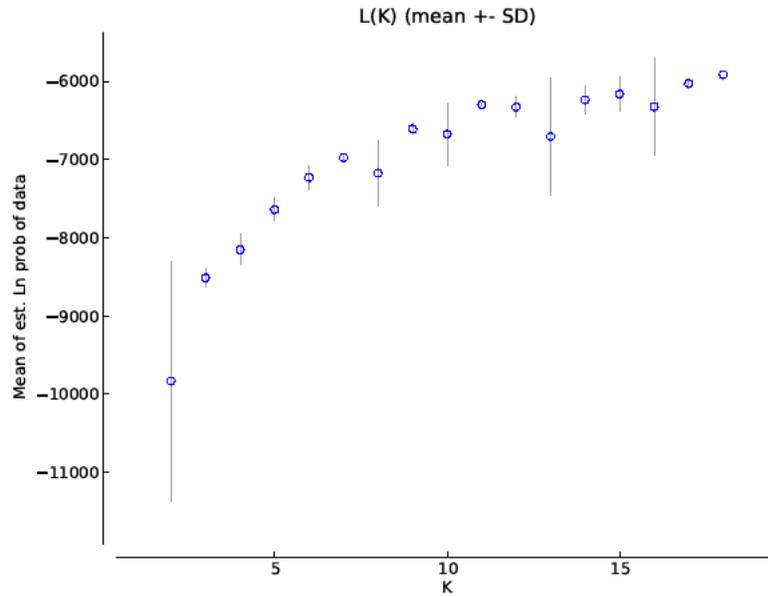


Figura S.5.1. Probabilidad media (*mean likelihood*) $L(K)$ y desvío estándar para cada valor de K (2-18) obtenido en el análisis de STRUCTURE, a partir de 151 individuos genotipados con 12 loci microsatelites. Cada valor de K fue evaluado por medio de 3 corridas de 3 millones de generaciones y un *burn-in* de 50.000 iteraciones.

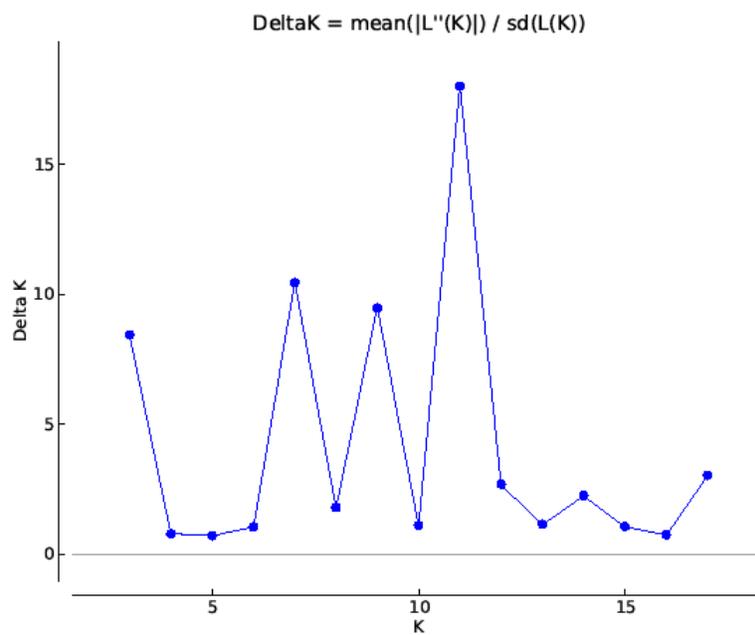


Figura S.5.2. Gráfico de ΔK para detectar el número de K grupos que mejor se ajustan a la matriz de microsatelites de *Wasmannia auropunctata*.

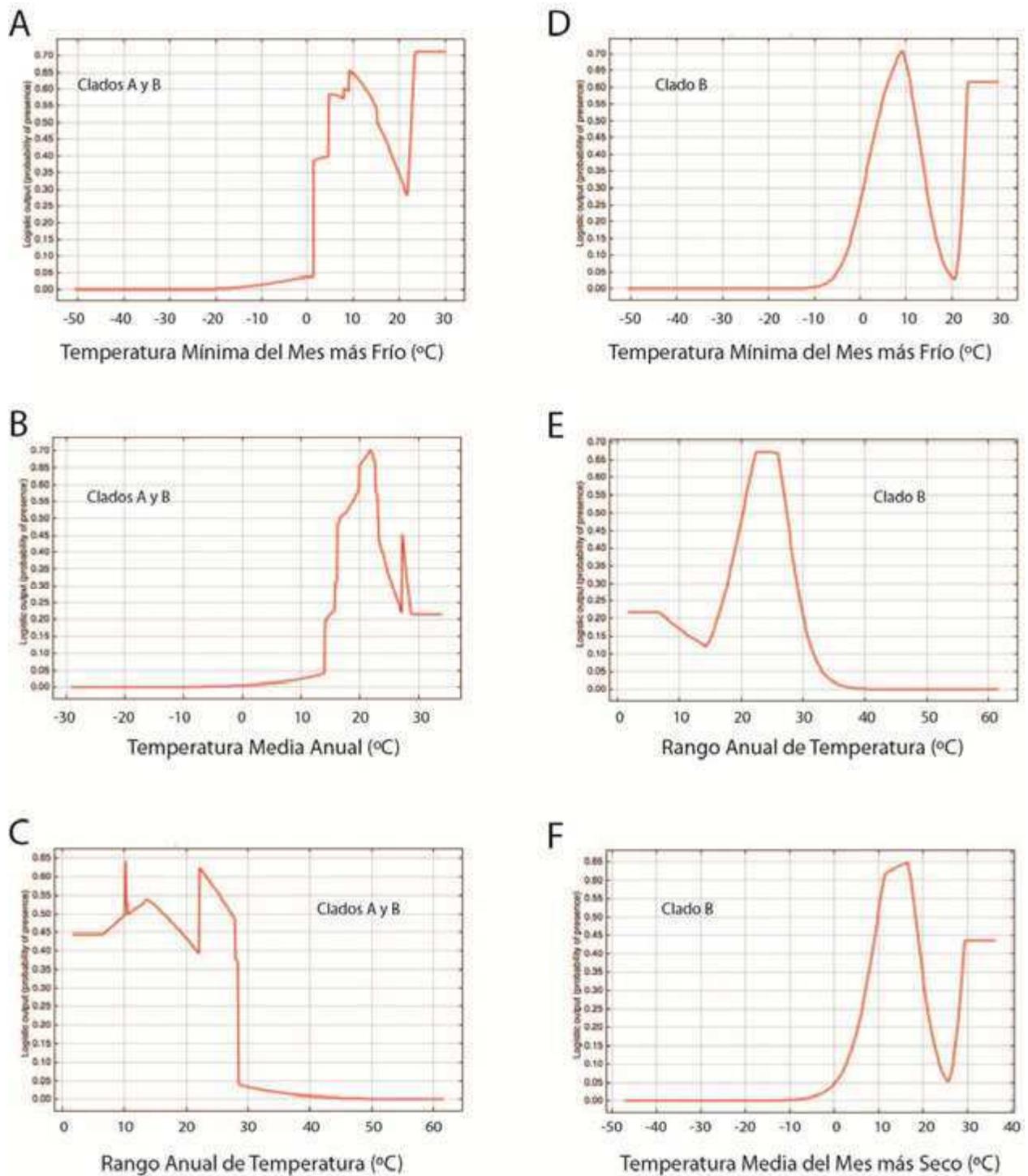


Figura S.5.3. Curvas de respuesta de las tres variables ambientales más importantes que determinan la distribución de *Wasmannia auropunctata*. Figuras A-C: clados A y B juntos. Figuras D-F: clado B. Los valores máximos de las curvas de respuesta corresponden al valor más óptimo de la variable para la prevalencia de *W. auropunctata* en el ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Achury, R., Chacón de Ulloa, P. & Arcila, A.M. 2008. Composición de hormigas e interacciones competitivas con *Wasmannia auropunctata* en fragmentos de bosque seco tropical. *Revista Colombiana de Entomología*, 34: 209-216.
- Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. Pp 267–281 in *Second International Symposium on Information Theory*. Akademiai Kiado, Budapest.
- Albrecht M., & Gotelli, N.J. 2001. Spatial and temporal niche partitioning in grassland ants. *Oecologia*, 126: 134-141.
- Alvarez-Presas, M., Sánchez-Gracia, A., Carbayo, F., Rozas, J. & Riutort, M. 2014. Insights into the origin and distribution of biodiversity in the Brazilian Atlantic forest hot spot: a statistical phylogeographic study using a low-dispersal organism. *Heredity* 112: 656-665.
- Andersen, A.N. 1997. Functional groups and patterns of organization in North American ant communities: a comparison with Australia. *J. Biogeogr.* 24: 433-460.
- Armbrecht, I. & Ulloa-Chacón, P. 2003. The little fire ant *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) as a diversity indicator of ants in Tropical Dry Forest fragments of Colombia. *Env. Entom.* 32: 542-547.
- Antonelli, A., Nylanderb, J.A.A., Perssona, C. & Sanmartín, I. 2009. Tracing the impact of the Andean uplift on neotropical plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 9749-9754.
- Antonelli, A., Quijada-Masareñas, A., Crawford, A.J., Bates, A.J., Velazco, J.M. & Wüster, W. 2010. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. In: *Amazonia, Landscape and Species Evolution*, 1st edn. (C. Hoorn & F.P. Wesselingh, eds.), pp. 386-404. Blackwell Publishing.
- Araújo, M.B. & Peterson, A.T. 2012. Uses and misuses of bioclimatic envelope modelling. *Ecology* 93:1527-1539.
- Arnaud-Haond, S., Belkhir, K. 2007. GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Mol Ecol Notes*. 7:15–17.
- Arnaud-Haond, S., Duarte, C.M., Alberto, F. & Serrão, E.A. 2007. Standardizing methods to address clonality in population studies. *Mol. Ecol* 16: 5115-5139.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- Avise, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeog.* 36: 3-15.
- Ayre, G.L. 1977. Exotic ants in Winnipeg. *Manitoba Entomol.* 11:41-44

- Bascom-Slack, C. A., & Dawson, D. S. 1997. The yeast motor protein, Kar3p, is essential for meiosis I. *J cell biol.*, 139: 459-467.
- Beheregaray, L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol. Ecol.* 17: 3754– 3774.
- Bennett, K.D. 1990. Milankovitch cycles and their effects on species in ecological and evolutionary time. *Paleobiology* 16: 11-21.
- Berman, M., Andersen, A.N., Hély, C. & Gaucherel, C. 2013. Overview of the Distribution, Habitat Association and Impact of Exotic Ants on Native Ant Communities in New Caledonia. *PLoS ONE* 8: e67245.
- Berndt, K.P. & Kremer, G. 1982. Heat Shock - Induced Gynandromorphism in the Pharaoh's Ant *Monomorium pharaonis* (L.). *Experientia* 38:798–799.
- Bertelsmeier, C., Avril, A., Blight, O., Confais, A., Diez, L., Jourdan, et al. 2015. Different behavioural strategies among seven highly invasive ant species. *Biol. Inv.* 17: 2491-2503.
- Bestelmeyer, B.T. 2000. The trade-off between thermal tolerance and behavioural dominance in a subtropical South American ant community. *J. Anim. Ecol.* 69: 998-1009.
- Bonavita-Cougourdan, A., Clément, J. L. & Lange C. 1987 Nestmate recognition: the role of cuticular hydrocarbons in the ant *Camponotus vagus* Scop. *J. ent. Sci.* 22: 1-10.
- Borgmeier, T. 1928. Nota previa sobre alguns phorideos que parasitam formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. *Bol. Biol.* 14: 119-126.
- Bossdorf, O., Auge, H., Lafuma, L. Rogers, W.E., Siemann, E. & Prati, D. 2005. Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* 144: 1-11.
- Bossdorf, O., Lipowsky, A. & Prati, D. 2008. Selection of preadapted populations allowed *Senecio inaequidens* to invade Central Europe. *Divers.Distrib.* 14: 676-685.
- Bourke, A.F.G. & Franks, N.R. 1995. Social evolution in ants. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Brandão, C.R.F. 1991. Adendos ao catálogo abreviado das formigas da região neotropical (Hymenoptera: Formicidae). *Rev. Brasil. Entomol.* 35: 319- 412.
- Brandão, C.R.F. & Paiva, R.V.S. 1994. The Galapagos ant fauna and the attributes of colonizing ant species. pp. 1-10 In: D.F. Williams (ed.) Exotic ants. biology, impact, and control of introduced species. Westview Press, Boulder, CO.
- Bruno, J.F., Fridley, J.D., Bromberg, K.D. & Bertness, M.D. 2005. Insights into biotic interactions from studies of species invasions. Species Invasions: Insights Into Ecology, Evolution and Biogeography (eds D.F.Sax, J.J.Stachowicz & S.D.Gaines), pp. 9–40.
- Cabanne, G.S., Santos, F.R. & Miyaki, C.Y. 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolaptidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biol. J. Linn. Soc.* 91: 73-84.

- Cabanne, G.S., d'Horta, F.M., Sari, E.H.R., Santos, F.R. & Miyaki, C.Y. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Mol. Phyl. Evol.* 49: 760-773.
- Calcaterra, L.A., Livore, J.P., Delgado, A. & Briano, J.A. 2008. Ecological dominance of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, in its native range. *Oecologia* 156: 411-421.
- Calcaterra, L.A., Briano, J.A., Cuezco, F., Ramírez, L. & Follet, P.A. 2009. Occurrence of *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae) in forests of northern Argentina. XIX Simpósio de Mirmecologia e I Simpósio Franco-Brasileiro de Mirmecologia, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. Nov 17-21.
- Calcaterra, L.A. 2010. Distribución y abundancia de la hormiga colorada *Solenopsis invicta* en Argentina: sus interacciones con hormigas competidoras y moscas parasitoides (*Pseudacteon* spp.). Tesis doctoral presentada en la FCEN-UBA, Argentina. www.digital.bl.fcen.uba.ar.
- Calcaterra, L.A., Cabrera, S. & Briano, J. 2016. Local co-occurrence of several highly invasive ants in their native range: are they all ecologically dominant species? *Ins. Soc.* (en prensa).
- Campbell, K.E. Jr, Frailey, C.D. & Romero-Pittman, L. 2006. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon river system. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 239: 166-219.
- Campos-Ramos, R., Maeda-Martínez, A. M., Obregón-Barboza, H., Murugan, G. & Guerrero-Tortolero, D. A. 2006. First report of gynandromorphy in parthenogenetic *Artemia* (Branchiopoda: Anostraca). *J. Crust. Biol.* 26: 107-112.
- Cardoso, D.C., Cristiano, M.P., Tavares, M.G., Schubart, C.D. & Heinze, J. 2015. Phylogeography of the sand dune ant *Mycetophylax simplex* along the Brazilian Atlantic Forest coast: remarkably low mtDNA diversity and shallow population structure. *BMC Evol. Biol.* 15: 1.
- Carnaval, A.C. & Moritz, C.M. 2008. Historical climate change predicts current biodiversity patterns in the Brazilian Atlantic rainforest. *J. Biogeogr.* 35: 1187-1201.
- Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T. & Moritz, C. 2009. Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323: 785-789.
- Cerdá, X., Retana, J., Manzaneda, A. 1998a. The role of competition by dominants and temperature in the foraging of subordinate species in Mediterranean ant communities. *Oecologia* 117: 404-412.
- Cerdá, X., Retana, J., Cros, S. 1998b. Critical thermal limits in Mediterranean ant species: trade-off between mortality risk and foraging performance. *Func. Ecol.* 12: 45-55.
- Cerdá, X., Arnan, X., & Retana, J. 2013. Is competition a significant hallmark of ant (Hymenoptera: Formicidae) ecology. *Myrmecol. News* 18 : 131-147.
- Chen, J.S., & Nonacs, P. 2000. Nestmate recognition and intraspecific aggression based on environmental cues in Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *An.Entomol. Soc. Am.* 93: 1333-1337.

- Chifflet, L., Rodriguero, M.S., Calcaterra, L.A., Rey, O., Dinghi, P.A., Baccaro, F.B., Souza J.L.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. *J. Evol. Biol.* DOI:10.1111/jeb.12827.
- Chistiakov, D.A. Hellemans, B. & Volckaert, F.A. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1-29.
- Clark, D.B., Guayasamin, C., Pazmino, O., Donoso, C., & de Villacis, Y.P. 1982. The tramp ant *Wasmannia auropunctata*: autecology and effects on ant diversity and distribution on Santa Cruz Island, Galapagos. *Biotropica* 14: 196-207.
- Clavero, M. & García-Berthou, E. 2005. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends Ecol. Evol.* 20: 110.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657-1660.
- Coffroth, M. A., & Lasker, H. R. 1998. Population structure of a clonal gorgonian coral: the interplay between clonal reproduction and disturbance. *Evolution* 52: 379-393.
- Colautti, R.I. & MacIsaac H.J. 2004. A neutral terminology to define 'invasive' species. *Divers. Distrib.* 10: 135-141.
- Cole, F.R., Mederios, A.C., Loope, L.L. & Zuehlke, W.W. 1992. Effects of the Argentine ant on Arthropod fauna of Hawaiian high-elevation shrubland. *Ecology* 73: 1313-1322.
- Cook, J.M. 1993. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity* 71: 421-421.
- Coulin, C. 2013. Tolerancia térmica de la hormiga invasora *Wasmannia auropunctata* y sus posibilidades de expansión en la región del Mediterráneo. Tesis de Licenciatura presentada en FCEN - UBA- Argentina.
- Cuezzo, F., Calcaterra, L.A., Chifflet, L. & Follet, P. 2015. *Wasmannia* Forel (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) in Argentina: Systematics and Distribution. *Sociobiology* 62: 246-265.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9: 772.
- Davidson, D.W., 1998. Resource discovery versus resource domination in ants: a functional mechanism for breaking the trade-off. *Ecol. Entomol.* 23: 484-490.
- Debout, G., Schatz, B., Elias, M., & Mckey, D. 2007. Polydomy in ants: what we know, what we think we know, and what remains to be done. *Biol. J. Linn. Soc.* 90: 319-348.
- De Fina, A.L. 1992. Aptitud Agroclimática de la República Argentina. *Acad. Nac. Agron. y Vet.*, pp 402.
- Delabie, J.H.C. 1989. Ocorrência de *Wasmannia auropunctata* (Roger 1863) (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) em cacauais na Bahia, Brasil. *Rev. Theob.* 18: 29-37.

- Delsinne, T., H. Jourdan & J. Chazeau 2001. Premières données sur la monopolisation de ressources par l'envahisseur *Wasmannia auropunctata* (Roger) au sein d'une myrmécophage de forêt sèche Neocaledonienne. *Actes Coll. Insec. Soc.* 14:1-5.
- Delsinne, T. Roisin, Y. & Leponce, M. 2007. Spatial and temporal foraging overlaps in a Chacoan ground-foraging ant assemblages. *J. Arid Environ.* 71: 29-44.
- de Miré B.P. 1969. Une fourmi utilisée au Cameroun dans la lutte contre les mirides du cacaoyer *Wasmannia auropunctata* Roger. *Café Cacao Thé* 13: 209-212.
- de Souza, A.L.B., Delabie, J.H.C. & Fowler, H.G. 1998. *Wasmannia* spp. (Hym., Formicidae) and insect damages to cocoa in Brazilian farms. *J. Appl. Entomol.* 122: 339-341.
- de Zolessi, L.C., de Abenante Y.P. & Phillippi M.E.. 1989. Catálogo sistemático de las especies de Formicidos del Uruguay (Hymenoptera: Formicidae). ORCYT UNESCO. Montevideo. 40pp.
- Deyrup, M., Davis L. & Cover S. 2000. Exotic ants in Florida. *Trans. Amer. Entomol. Soc.* 126: 293-326.
- Disney, R.H.L. 1994. Scuttle flies: the *Phoridae*, Chapman and Hall, London. 467 pp.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O.G. 2005. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1185-1192.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7: 214.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol.* 29: 1969-1973.
- Earl, D.A. & vonHoldt, B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation. Genet. Resour.* 4: 359-361.
- Ekroos, J., Heliölä, J. & Kuussaari, M. 2010. Homogenization of lepidopteran communities in intensively cultivated agricultural landscapes. *J. App. Ecol.* 47: 459-467.
- Elith, J. et al. 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29: 129-151.
- Ehrlich, P. R. 1989. Attributes of invaders and the invading processes: Vertebrates. Pp. 315-328 in J. A. Drake, H. A. Mooney, F. di Castri, et al., eds. *Biological Invasions: A Global Perspective*. John Wiley & Sons Ltd.
- Elton, C.S. 1958. *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. Methuen, London.
- Engelstädter, J., & Hurst, G. D. 2009. The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40: 127-149.
- Entsminger, GL. 2014. EcoSim Professional: Null modeling software for ecologists, Version 1. Acquired Intelligence Inc., Kesey-Bear, & Pinyon Publishing. Montrose, CO 81403. <http://www.garyentsminger.com/ecosim/index.htm>.

- Ernst, K.A., & Brooks, J.R. 2003. Prolonged flooding decreased stem density, tree size and shifted composition towards clonal species in a central Florida hardwood swamp. *Forest Ecol. Man.*, 173 : 261-279.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- Facon, B., Genton, B.J., Shykoff, J., Jarne, P., Estoup, A., & David, P. 2006. A general eco-evolutionary framework for understanding bio - invasions. *Trends Ecol. Evol.* 21: 130-135.
- Falk-Petersen, J., Bohn T. & Sandlund, O.T. 2006. On the numerous concepts in invasion biology. *Biol. Inv.* 8:1409-1424.
- Falush, D., Stephens. M. & Pritchard, J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Feener, D.H Jr, Jacobs, L.F. & Schmidt, J. O. 1996. Specialized parasitoid attracted to a pheromone of ants. *Anim. Behav.* 51: 61-66.
- Feener, D.H. Jr, Orr M.R., Wackford K.M., Longo J.M., Gilbert L.E. & Benson W.W. 2008. Geographic variation in resource dominance-discovery in Brazilian ant communities. *Ecology* 89:1824-1836.
- Fellers, J.H. 1987. Interference and exploitation in a guild of woodland ants. *Ecology* 68:1466–1478
- Ferreira, A.G.A. & Amos, W. 2006. Inbreeding depression and multiple regions showing heterozygote advantage in *Drosophila melanogaster* exposed to stress. *Mol. Ecol.* 15: 3885–3893.
- Fitzpatrick, M.C., Weltzin, J.F., Sanders, N.J. & Dunn, R.R. 2007. The biogeography of prediction error: why does the introduced range of the fire ant over-predict its native range? *Glob. Ecol. Biogeog.* 16: 24-33.
- Folgarait, P.J. 1998. Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. *Biodiv. Cons.* 7: 1221-1244.
- Folgarait, P.J. & Gilbert, L.E. 1999. Phorid parasitoids affect foraging activity of *Solenopsis richteri* under different availability of food in Argentina. *Ecol. Entomol.* 24: 163-173.
- Folgarait, P.J., D'adamo, P. & Gilbert, L.E. 2004. A grassland ant community in Argentina: The case of *Solenopsis richteri* and *Camponotus punctulatus* (Hymenoptera: Formicidae) attaining high densities in their native ranges. *Annu. Entomol. Soc. Am.* 97: 450-457.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3:294-299.
- Foucaud, J., Jourdan, H., Le Breton, J., Loiseau, A., Konghouleux, D. & Estoup A. 2006. Rare sexual reproduction events in the clonal reproduction system of introduced populations of the little fire ant. *Evolution* 60: 1646-1657.
- Foucaud, J., Fournier, D., Orivel, J., Delabie, J., Loiseau, A., Le Breton, J. et al, A. 2007. Sex and Clonality in the Little Fire Ant. *Mol. Biol. Evol.* 24: 2465-2473.

- Foucaud, J., Orivel, J., Fournier, D., Delabie, J.H., Loiseau, A., Le Breton, J. et al. 2009. Reproductive system, social organization, human disturbance and ecological dominance in native populations of the little fire ant, *Wasmannia auropunctata*. *Mol. Ecol.* 18: 5059-73.
- Foucaud, J., Orivel, J., Loiseau, A., Delabie, J.H.C., Jourdan, H., Konghouleux, D. et al. 2010a. Worldwide invasion by the little fire ant: routes of introduction and eco-evolutionary pathways. *Evol. Appl.* 3: 363-374.
- Foucaud J., Estoup A., Loiseau A., Rey O., Orivel J. 2010b. Thelytokous parthenogenesis, male clonality and genetic caste determination in the little fire ant: new evidence and insights from the lab. *Heredity* 105: 205-212.
- Foucaud, J., Rey, O., Robert, S., Crespin, L., Orivel, J., Facon, B. et al. 2013. Thermotolerance adaptation to human-modified habitats occurs in the native range of the invasive ant *Wasmannia auropunctata* before long-distance dispersal. *Evol. Appl.* 6: 721-734.
- Fournier, D., Estoup, A., Orivel, J., Foucaud, J., Jourdan, H., Le Breton, J. et al. 2005a. Clonal reproduction by males and females in the little fire ant. *Nature* 435: 1230-1235.
- Fournier, D., Foucaud, J., Loiseau, A., Cros-Arteil, S., Jourdan, H., Orivel, J. et al. 2005b. Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci for the invasive ant *Wasmannia auropunctata*. *Mol. Ecol. Notes* 5: 239-242.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Giraud, T., J. S. Pedersen & L. Keller. 2002. Evolution of supercolonies: the Argentine ants of southern Europe. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99: 6075–6079.
- Goloboff, P.A., Farris, J.S. & Nixon, K.C. 2008. TNT (Tree analysis using new technology) (BETA) ver. 1.1. Published by the authors, Tucumán, Argentina.
- Grangier, J., Le Breton, J., Dejean, A., & Orivel, J. 2007. Coexistence between *Cyphomyrmex* ants and dominant populations of *Wasmannia auropunctata*. *Behav. Proc.* 74: 93-96.
- Grazziotin, F.G., Monzel, M., Echeverrigaray, S. & Bonatto, S.L. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Mol. Ecol.* 15: 3969-3982.
- Guzmán, N.V., Lanteri, A.A. & Confalonieri, V.A. 2012. Colonization ability of two invasive weevils with different reproductive modes. *Evol. Ecol.* 26: 1371-1390.
- Haffer, J. 1969. Speciation in amazonian forest birds. *Science* 165: 131-137.
- Haffer, J. 1982. General aspects of the refuge theory. In: *Biological diversification in the tropics* (Prance, G.T. ed.), pp. 6-24. New York: Columbia University.
- Haffer, J. 1993. Time's cycle and time's arrow in the history of Amazonia. *Biogeographica* 69: 15-45.
- Haffer, J. 2008. Hypotheses to explain the origin of species in Amazonia. *Braz. J. Biol.* 68: 917-947.

- Halkett, F., Simon, J-C. & Balloux, F. 2005. Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends Ecol. Evol.* 20: 194-201.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., & Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeont. Elec.* 4: 9.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T.A. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160-174.
- Heinze, J. & Hölldobler B., 1995. Thelytokous parthenogenesis and dominance hierarchies in the ponerine ant, *Platythyrea punctata* (F. Smith). *Naturwissenschaften* 82: 40–41.
- Heinze, J., Foitzik, S., Hippert, A. & Hölldobler, B. 1996. Apparent dearenemy phenomenon and environment-based recognition cues in the ant *Leptothorax nylanderi*. *Ethology* 102: 510–522.
- Heinze, J., Cremer, S., Eckl, N. & Schrempf, A. 2006. Stealthy invaders: the biology of *Cardiocondyla tramp* ants. *Ins. Soc.* 53: 1-7.
- Heled, J. & Drummond, A.J. 2008. Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evol. Biol.* 8: 289.
- Heled, J. & Drummond, A.J. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol. Biol. Evol.* 27: 570-80.
- Henderson, G., Andersen, J. F., Phillips, J. K. & Jeanne, R. L. 1990. Internest aggression and identification of possible nestmate discrimination pheromones in polygynous ant *Formica montana*. *J. Chem. Ecol.* 16: 2217-2228.
- Heraty, J.M. 1994. Biology and importance of two eucharitid parasites of *Wasmannia* and *Solenopsis*. In: *Exotic Ants: Biology, Impact and Control of Introduced Species* (Williams, D. ed.), pp 104-120. Westview Press, Boulder, CO.
- Hewitt, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. Royal Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.* 359:183.
- Hijmans, R.J., Guarino, L., Bussink, C., Mathur, P., Cruz, M., Barrentes, I. et al. 2004. DIVA-GIS Vsn. 7.1.7.A geographic information system for the analysis of species distribution data. Manual available at: <http://www.diva-gis.org>.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. & Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25: 1965-1978.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1990. The ants. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA, USA.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. 1977. The number of queens: an important trait in ant evolution. *Naturwissenschaften* 64: 8–15.

- Holway, D.A. 1998. Effect of Argentine ant invasions on ground-dwelling arthropods in northern California riparian woodlands. *Oecologia* 116: 252-258.
- Holway, D.A., Suarez, A.V. & Case, T.J. 1998. Loss of intraspecific aggression in the success of a widespread invasive social insect. *Science* 282: 949-952.
- Holway, D.A. 1999. Competitive mechanisms underlying the displacement of native ants by the invasive Argentine ant. *Ecology* 80: 238-251.
- Holway, D.A. & Suarez A.V. 1999. Animal behavior: An essential component of invasion biology. *Trends Ecol. Evol.* 14: 328-330.
- Holway, D.A., Lach, L., Suarez, A.V., Tsutsui, N.D. & Case T.J. 2002. The causes and consequences of ant invasions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33: 181-233.
- Holway, D.A. & Suarez, A.V. 2004. Colony-structure variation and interspecific competitive ability in the invasive Argentine ant. *Oecologia* 138: 216-222.
- Horn, C., Wesselingh F.P., ter Steege H., Bermudez M.A., Mora A., Sevink, J., et al. 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330: 927-931.
- Hudson, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. In: *Oxford surveys in evolutionary biology*, vol 7 (Futuyma, D. & Antonovics, J. eds), pp 1-44. Oxford University Press, New York.
- Hufbauer, R.A., Facon, B., Ravigné, V., Turgeon, J., Foucaud, J., Lee, C. et al. 2012. Anthropogenically-Induced Adaptation to Invade (AIAI): contemporary adaptation to human-altered habitats within the native range can promote invasions. *Evol. Appl.* 5: 89-101.
- Human, K.G., & Gordon, D.M. 1996. Exploitation and interference competition between the invasive Argentine ant, *Linepithema humile*, and native ant species. *Oecologia* 105: 405-412.
- 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. *Proc. R. Soc. Lon. B* 272: 1525-1534.
- Jackson, J.B., & Hughes, T.P. 1985. Adaptive Strategies of Coral-Reef Invertebrates: Coral-reef environments that are regularly disturbed by storms and by predation often favor the very organisms most susceptible to damage by these processes. *Am. Scient.* 73: 265-274.
- Jones, S.R. & Phillips, Jr.S.A. 1985. Gynandromorphism in the ant *Pheidole dentata* Mayr (Hymenoptera, Formicidae). *Proc. Entomol. Soc. Washington* 87: 583-586.
- Jourdan, H., Sadlier, R.A. & Bauer, A.M. 2001. Little fire ant invasion (*Wasmannia auropunctata*) as a threat to New Caledonian lizards: evidence from a Sclerophyll Forest (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 38: 283-301.
- Kamping, A., Katju, V., Beukeboom, L.W. & Werren, J.H. 2007. Inheritance of gynandromorphism in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Genetics* 175: 1321-1333.

- Keane, R.M., & Crawley, M.J. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends Ecol. Evol.* 17: 164-170.
- Keller, L. 1995. Social life: the paradox of multiple queen colonies. *Trends Ecol. Evol.* 10: 355–360.
- Kempf, W.W. 1972. Catálogo abreviado das formigas da Região Neotropical. *Stud. Entom.* 15: 3-344.
- King, J.R. & Porter, S.D. 2005. Evaluation of sampling methods and species richness estimator for ants in upland ecosystems in Florida. *Environ. Entomol.* 34: 1566- 1578.
- King, J.R., & Tschinkel, W.R. 2006. Experimental evidence that the introduced fire ant, *Solenopsis invicta*, does not competitively suppress co-occurring ants in a disturbed habitat. *J. Anim. Ecol.* 75: 1370-1378.
- King, J.R., & Tschinkel, W.R. 2008. Experimental evidence that human impacts drive fire ant invasions and ecological change. *PNAS* 105: 20339-20343.
- Kupferberg, S.J. 1997. Bullfrog (*Rana catesbeiana*) invasion of a California river: the role of larval competition. *Ecology* 78: 1736-1751.
- Kusnezov, N. 1951 (1952). El género *Wasmannia* en la Argentina (Hymenoptera, Formicidae). *Acta Zool. Lilloana* 10: 173-182.
- Kusnezov, N. 1978. Hormigas argentinas; clave para su identificación. Ed. por R. Golbach. Miscelanea-Fundacion Miguel Lillo (Argentina). no. 61.
- Lach, L. & Hooper-Bui, L.M. 2010. Consequences of ant invasions. *Ant ecology*. Oxford University Press, Oxford, 261-286.
- Landis, M.J. & Bedford, T. 2014. PhyloWood: interactive web-based animations of biogeographic and phylogeographic histories. *Bioinformatics* 30: 123-124.
- Le Breton, J., Chazeau, J. & Jourdan, H. 2003. Immediate impacts of invasion by *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae) on native litter ant fauna in a New Caledonian rainforest. *Austral Ecol.* 28: 204-209.
- Le Breton, J., Delabie, J. H., Chazeau, J., Dejean, A. & Jourdan, H. 2004. Experimental evidence of large-scale unicoloniality in the tramp ant *Wasmannia auropunctata* (Roger). *J. Insect Behav.* 17: 263-271.
- Le Breton, J., Jourdan, H., Chazeau, J., Orivel, J. & Dejean, A. 2005. Niche opportunity and ant invasion: the case of *Wasmannia auropunctata* in a New Caledonian rain forest. *J. Tropical Ecol.* 21: 93-98.
- LeBrun, E.G., & Feener, D.H. 2002. Linked indirect effects in ant-phorid interactions: impacts on ant assemblage structure. *Oecologia* 133: 599-607.
- LeBrun, E.G. 2005. Who is the top dog in ant communities? Resources, parasitoids, and multiple competitive hierarchies. *Oecologia* 142: 643-652.
- LeBrun, E.G., & Feener, D.H. 2007. When trade-offs interact: balance of terror enforces dominance discovery trade-off in a local ant assemblage. *J. Anim. Ecol.* 76: 58-64.

- LeBrun, E.G., Tillberg, C.V., Suarez, A.V., Folgarait, P.J., Smith, C.R. & Holway, D.A. 2007. An experimental study of competition between red imported fire ants and Argentine ants in their native range. *Ecology* 88: 63-75
- Lee, C.E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends Ecol. Evol.* 17: 386-391.
- Lee, C.E. & Gelembiuk, G.W. 2008. Evolutionary origins of invasive populations. *Evol. Appl.* 1: 427-448.
- Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J.J. & Suchard, M.A. 2010. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Mol. Biol. Evol.* 27: 1877-1885.
- Leprieur, F., Beauchard, O., Blanchet, S., Oberdorff, T. & Brosse, S. 2008. Fish invasions in the world's river systems: when natural processes are blurred by human activities. *PLoS Biol.* 6: e28.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Lobo, J.M., Jiménez-Valverde, A. & Real, R. 2007. AUC: a misleading measure of the performance of predictive distribution models. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 17: 145-151.
- Lockwood, J.L., Cassey, P. & Blackburn, T. 2005. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends Ecol. Evol.* 20: 223-228.
- Lockwood, J.L., Hoopes, M.F. & Marchetti, M.P. 2007. *Invasion Ecology*. Blackwell, Oxford.
- Lodge, D.M. 1993. Biological invasions: lessons for ecology. *Trends Ecol. Evol.* 8: 133-137.
- Longino, J. T. & Fernandez, F. 2007. Taxonomic review of the genus *Wasmannia*. En: *Advances in ant systematics (Hymenoptera: Formicidae): homage to E. O. Wilson – 50 years of contributions*, Memoires of the American Entomological Institute, vol. 80 (R. R. Snelling, B. L. Fisher & P. S. Ward eds), pp. 271-289. Gainesville, Florida, USA.
- Loope, L.L. & Krushelnycky, P.D. 2007. Current and Potential Ant Impacts in the Pacific Region. *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.* 39: 69-73.
- Lowe, S., Browne M. & Boudjelas, S. 2000. 100 of the world's worst invasive alien species. *Aliens* 12: 1-12.
- Lubin, Y.D. 1984. Changes in the native fauna of the Galápagos Islands following invasion by the little red fire ant, *Wasmannia auropunctata*. *Biol. J. Linn. Soc.* 21:229-242.
- Lynch, J.F., Balinsky, E.C., Vail, S.G. 1980. Foraging patterns in 3 sympatric forest ant species, *Prenolepis imparis*, *Paratrechina melanderi* and *Aphaenogaster rudis* (Hymenoptera, Formicidae). *Ecol Entomol.* 5: 353-371
- Majer, J.D. & Camer-Pesci, P. 1991. Ant species in tropical Australian tree crops and native ecosystems is there a mosaic?. *Biotropica* 23:173-181.
- Majer, J.D. & Delabie, J.H.C. 1999. Impact of tree isolation on arboreal and ground ant communities in cleared pasture in the Atlantic rain forest region of Bahia, Brazil. *Insect Soc.* 46: 281-90
- Maynard Smith, J. 1978. *The Evolution of sex*. Cambridge University Press, Cambridge.

- McGlynn, T.P. 1999. The worldwide transfer of ants: geographical distribution and ecological invasions. *J. Biogeog.* 26: 535-548.
- McKone, M.J. & Halpern, S.L. 2003. The evolution of androgenesis. *Am. Nat.* 161: 641-656.
- Meer, R.K.V., Jaffe, K. & Cedeno, A. 1990. Applied myrmecology: a world perspective. Westview Press Inc.
- Mergeay, J., Verschuren, D. & De Meester, L. 2006. Invasion of an asexual American water flea clone throughout Africa and rapid displacement of native sibling species. *Proc. R. Soc. B.* 273: 2839-2844.
- Michez, D., Rasmont, P., Terzo, M. & Vereecken, N. J. 2009. A synthesis of gynandromorphy among wild bees (Hymenoptera: Apoidea), with an annotated description of several new cases. *Annu. Soc. Entomol. France* 45: 365-375.
- Mikheyev, A.S. & Mueller, U.G. 2007. Genetic relationships between native and introduced populations of the little fire ant *Wasmannia auropunctata*. *Divers.Distrib.* 13: 573-579.
- Mikheyev, A.S., Bresson, S. & Conant, P. 2009. Single-queen introductions characterize regional and local invasions by the facultatively clonal little fire ant *Wasmannia auropunctata*. *Mol. Ecol.* 18: 2937-2944.
- Miller, M.P. 2005. Alleles In Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of Interindividual Spatial and Genetic Information. *J. Hered.* 96: 722-724.
- Miller, M.J., Bermingham, E., Klicka, J., Escalante, P., do Amaral, F.S., Weir, J.T. et al. 2008. Out of Amazonia again and again: episodic crossing of the Andes promotes diversification in a lowland forest flycatcher. *Proc Biol Sci.* 275:1133-42.
- Moffett, M.W. 2012. Supercolonies of billions in an invasive ant: What is a society?. *Behav. Ecol.* 23: 925-933.
- Mooney H.A. & Hobbs R.J. 2000. Invasive Species in a Changing World Island Press, Washington D.C.
- Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49: 718-726.
- Moritz, C., Patton, J.L., Schneider, C.J. & Smith, T.B. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31: 533-563.
- Mörner, N.A. 1971. The Position of the Ocean Level during the Interstadial at about 30 000 BP-A Discussion from a Climatic-Glaciologic Point of View. *Can. J. Earth Sci.* 8: 132-143.
- Morrison, L.W. 2000. Mechanisms of interspecific competition among an invasive and two native fire ants. *Oikos* 90: 238-252.
- Müller, P. 1973: The Dispersal Centres of Terrestrial Vertebrates in the Neotropical Realm. *Biogeographica* Vol. 2.
- Ndoutoume-Ndong, A. & Mikissa, B. 2007. Influence de la presence de la fourmi *Wasmannia auropunctata* (Roger 1863) (Hymenoptera: Formicidae) sur les autres especes de fourmis dans la reserve de la Lope (centre du Gabon). *Annu. Soc. Entomol. France* 43: 155-158.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.

- Normark, B.B. 2003. The evolution of alternative genetic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 397-423.
- Nowbahari, E., Lenoir, A., Clément, J.L., Lange, C., Bagnères, A.G. & Joulie C. 1990. Individual, geographical and experimental variation of cuticular hydrocarbons of the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera: Formicidae): their use in nest and subspecies recognition. *Biochem. syst. Ecol.* 18: 63-73.
- O'Dowd, D.J., Green, P.T. & Lake, P.S. 2003. Invasional 'meltdown' on an oceanic island. *Ecol. Lett.* 6: 812-817.
- Olden, J.D., Poff, N.L., Douglas, M.R., Douglas, M.E. & Fausch, K.D. 2004. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends Ecol. Evol.* 19: 18-24.
- Oliveira, F.F de, & Andrade, M.A.P de. 2006. Ginandromorfia em *Melipona mondury* Smith (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Sitientibus* 6: 272-276.
- Oliveira-Filho, A.T. & Fontes, M.A.L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brasil and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.
- Orivel, J., Grangier, J., Foucaud, J., Le Breton, J., Andrés, F.X., Jourdan, H. et al. 2009. Ecologically heterogeneous populations of the invasive ant *Wasmannia auropunctata* within its native and introduced ranges. *Ecol. Entomol.* 34: 504-512.
- Otto-Bliesner, B.L., Marshall, S.H., Overpeck, J.T., Miller, G.H. & Hu, A. 2006. Simulating Arctic Climate Warmth and Icefield Retreat in the Last Interglaciation. *Science* 311: 1751-1753.
- Paivinen, J., Ahlroth, P. & Kaitala, V. 2002. Ant-associated beetles of Fennoscandia and Denmark. *Entom. Fen.* 13: 20-40.
- Papadopoulou, A., Anastasiou, I. & Vogler, A.P. 2010. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. *Mol Biol Evol.* 27: 1659-1672.
- Passera, L. 1994. Characteristics of tramp species. *Exotic ants: biology, impact, and control of introduced species*, 23-43.
- Patel, S., Weckstein, J.D., Patane, J.S.L., Bates, J.M. & Aleixo, A. 2011. Temporal and spatial diversification of *Pteroglossus arcaçaris* (AVES: Ramphastidae) in the Neotropics: constant rate of diversification does not support an increase in radiation during the Pleistocene. *Mol. Phyl. Evol.* 58: 105-115.
- Pearcy, M., Aron, S., Doums, C. & Keller, L. 2004. Conditional use of sex and parthenogenesis for worker and queen production in ants. *Science* 306: 1780-1783.
- Pedersen, J.S., Krieger, M.J.B., Vogel, V., Giraud, T. & Keller, L. 2006. Native supercolonies of unrelated individuals in the invasive argentine ant. *Evolution* 60: 782-791.
- Perry, A. L., P. J. Low, J. R. Ellis & J. D. Reynolds. 2005. Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science* 380: 1912– 1915.
- Phillips, S., Anderson, R.P. & Schapire, R.E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Model.* 190: 231-259.

- Phillips, S.J., & Dudík, M. 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31: 161-175.
- Pimentel, D., Lach, L., Zuniga, R. & Morrison, D. 2000. Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. *Bioscience* 50: 53–64.
- Pimentel, D. 2011. *Biological invasions: economic and environmental costs of alien plant, animal, and microbe species*. CRC Press.
- Porter, S.D. & Savignano D.A. 1990. Invasion of polygyne fire ants decimates native ants and disrupts arthropod community. *Ecology* 71: 2095-2106.
- Posada, L., De Polania, I.Z., De Arevalo, I.S., Saldarriaga, A., Garcia, F. & Cardenas, R. 1976. Lista de insectos dañinos y otras plagas en Colombia. Inst. Col. Agrop. Programa de Enomología, Publicación Miscelanea No. 17.
- Prado, D.E. & Gibbs, P.E. 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Ann. Miss. Bot. Gar.* 80: 902-927.
- Pritchard, J.K., Stephens, P., & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pschorn-Walcher, H. 1977. Biological control of forest insects. *Annu. Rev. Entomol.* 22: 1-22.
- Queller, D. 2005. Evolutionary biology: males from Mars. *Nature* 435: 1167-1168.
- Reitz, S.R. & Trumble, J.T. 2002. Competitive displacement among insects and arachnids. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 435–465
- Rey O. 2011. Systèmes de reproduction et scénarios d'invasion chez la petite fourmi de feu, *Wasmannia auropunctata*. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de Montpellier Supagro. Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 2011.
- Rey, O., Loiseau, A., Facon, B., Foucaud, J., Orivel, J., Cornuet, J.M., et al. 2011. Meiotic recombination dramatically decreased in thelytokous queens of the little fire ant and their sexually produced workers. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2591-2601.
- Rey, O., Estoup, A. Vonshak, M., Loiseau, A., Blanchet, S., Calcaterra, L., Chifflet, L. et al. 2012. Where do adaptive shifts occur during invasion? A multidisciplinary approach to unraveling cold adaptation in a tropical ant species invading the Mediterranean area. *Ecol. Lett.* 15: 1266-1275.
- Rey, O., Facon, B., Foucaud, J., Loiseau, A. & Estoup, A. 2013a. Androgenesis is a maternal trait in the invasive ant *Wasmannia auropunctata*. *Proc. R. Soc. B.* 280: 20131181.
- Rey, O., Estoup, A., Facon, B., Loiseau, A., Aebi, A., Duron, O. et al. 2013b. Distribution of Endosymbiotic Reproductive Manipulators Reflects Invasion Process and Not Reproductive System Polymorphism in the Little Fire Ant *Wasmannia auropunctata*. *PlosOne* 8: e58467.

- Ribas, C.C., Miyaki, C.Y. & Cracraft, J., 2009. Phylogenetic relationships, diversification and biogeography in Neotropical Brotogetris parakeets. *J. Biogeogr.* 36: 1712-1729.
- Ribas, C. C., Aleixo, A., Nogueira, A. C., Miyaki, C. Y. & Cracraft, J. 2011. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proc. R. Soc. B.* rspb20111120.
- Ricciardi, A. 2007. Are modern biological invasions an unprecedented form of global change?. *Cons. Biol.* 21: 329-336.
- Richardson, D.M., Pysek P., Rejmanek M., Barbour M.G., Panetta F.D. & West C.J. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Divers. Distrib.* 6: 93-107.
- Richardson, D.M. & Pysek, P. 2006. Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. *Prog. Phys. Geog.* 30: 409–431.
- Rigaud, T. & Juchault, P. 1993. Conflict between Feminizing Sex Ratio Distorters and an Autosomal Masculinizing Gene in the Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *Genetics* 133: 247-252.
- Rodriguero, M.S. 2013. *Wolbachia*, una pandemia con posibilidades. *Rev. Soc. Entomol. Arg.* 72: 117-137.
- Roger, J. 1863. Die neu aufgeführten Gattungen und Arten meines Formiciden-Verzeichnisses nebst Ergänzung einiger früher gegebenen Beschreibungen. *Berl. Entomol. Zeit.* 7: 131-214.
- Roque-Albelo, L. & Causton, C. 1999. El Niño and introduced insects in the Galapagos Islands: different dispersal strategies, similar effects. *Notic. Galap.* 60: 30–36.
- Roura-Pascual, N., Hui, C., Ikeda, T., Ledayd, G., Richardson, D.M., Carpintero S. et al. 2011. Relative roles of climatic suitability and anthropogenic influence in determining the pattern of spread in a global invader. *PNAS.* 108: 220-225.
- Rozenfeld, A.F., Arnaud-Haond, S., Hernández-García, E., Eguíluz, V.M., Matías, M.A., et al. 2007. Spectrum of genetic diversity and networks of clonal organisms. *J. R. Soc. Interface* 4:1093-1102.
- Rull, V. 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary – Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Mol. Ecol.* 17: 2722-2729.
- Rull, 2011. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Tree* 26: 508–513.
- Saitou, N. & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.
- Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S. Lodge, D.M., Molofsky J., With, K.A., et al. 2001. The population biology of invasive species. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 32: 305-332.
- Salguero, B., Armbrrecht, I. & Hurtado, H. 2011. *Wasmannia auropunctata* (Hymenoptera: Formicidae): ¿Unicolonial o multicolonial?: in the valley Cauca river. *Rev. Colomb. Entomol.* 37: 279-288.
- Santos, J.C., Coloma, L.A., Summers, K., Caldwell, J.P., Ree, R. & Cannatella D.C. 2009. Amazonian Amphibian Diversity Is Primarily Derived from Late Miocene Andean Lineages. *PLoS Biol.* 7: e1000056.

- Santschi, F. 1914. Formicidas de l'Afrique occidentale et australe du voyage de M. le Professeur F. Silvestri. *Boll. Labo. Zool. Gen. Agrar.* 8:309-385.
- Savolainen, R. & Vepsäläinen, K. 1988. A competition hierarchy among boreal ants: impact on resource partitioning and community structure. *Oikos* 51: 135-155.
- Savolainen, R. & K. Vepsäläinen. 1989. Ant assemblages in the taiga biome: testing the role of territorial wood ants. *Oecologia* 81: 481-486.
- Sax, D.F., Stachowicz, J.J. & Gaines, S.D. 2005. *Species invasions: insights into ecology, evolution and biogeography*. Sinauer Associates Incorporated.
- Sax, D.F. & Gaines, S.D. 2008. Species invasions and extinction: The future of native biodiversity on islands. *PNAS USA* 105: 111490-11497.
- Simberloff, D. 1997. The biology of invasions. Pp. 3-17. En: *Strangers in paradise: impact and management of non indigenous species 127 in Florida*. (Simberloff, D. D. C. Schmitz & T.C. Brown eds.) Island Press. Whashington D. C. 467 pp.
- Simon, J. C., Delmotte, F., Rispe, C. & Crease, T. 2003. Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biol. J. Linn. Soc.* 79: 151-163.
- Slatkin, M. & Hudson, R.R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.
- Smith, M.R. 1942. The relationship of ants and other organisms to certain scale insects on coffee in Puerto Rico. *J. Agric. Univ. Puerto Rico* 26: 21-27
- Solomon, S., Bacci, M., Martins, J., Vinha, G. & Mueller, U. 2008. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. *PLoS ONE* 3: e2738.
- Soto, J., Ortiz J., Murray E., Morris B., Varone L. & Heraty J.M. 2010. Taxonomy and life history of *Orasema minutissima* (Hymenoptera: Eucharitidae) attacking the little red fire ant in the Caribbean. Entomological Society American Annual Meeting.
- StatSoft, Inc. 2004. STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.
- Stone, L. & Roberts A. 1990. The checkerboard score and species distributions. *Oecologia* 85: 74-79.
- Suarez, A. V., Tsutsui, N. D., Holway, D. A. & Case, T. J. 1999. Behavioral and genetic differentiation between native and introduced populations of the Argentine ant. *Biol. Inv.* 1: 43-53.
- Suarez, A. V., Holway, D. A., Liang, D., Tsutsui, N. D. & Case, T. J. 2002. Spatiotemporal patterns of intraspecific aggression in the invasive Argentine ant. *Anim. Behav.* 64: 697-708.
- Suárez, A.V., Holway D.A. & Ward P.S. 2005. The role of opportunity in the unintentional introduction of invasive ants. *PNAS USA* 102: 17032-17035.

- Suarez, A. V., Holway, D. A. & Tsutsui, N. D. 2008. Genetics and behavior of a colonizing species: The invasive Argentine ant. *The Am. Naturalist* 172: S72-S84.
- Suarez, A.V., McGlynn, T.P. & Tsutsui, N.D. 2010. Biogeographic and taxonomic patterns of introduced ants. En: *Ant ecology* (Lach, L., Parr, C.L., & Abbott K.L. eds.) Oxford University Press. pp. 233-244.
- Swets, J.A. 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240: 1285-1293.
- Szabad, J. & Fajsz, C. 1982. Control of female reproduction in *Drosophila*: genetic dissection using gynandromorphs. *Genetics* 100: 61-78.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura, K. & Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Tennant, L.E. 1994. The ecology of *Wasmannia auropunctata* in primary tropical rainforest in Costa Rica and Panama. En: *Exotic ants: biology, impact, and control of introduced species*, pp. 80-90.
- Thomas, C.D. & Lennon J.J. 1999. Birds extend their ranges northwards. *Nature* 399: 213.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids res.* 22: 4673.
- Tschinkel, W.R. 2006. The fire ants. Harvard University Press.
- Tsuji, K. & Yamauchi, K. 1995. Production of females by parthenogenesis in the ant, *Cerapachys biroi*. *Ins. Soc.* 42: 333-336.
- Tsutsui, N.D., Suarez A.V., Holway D.A. & Case T.J. 2000. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *PNAS USA* 97: 5948–5953.
- Tsutsui, N.D., Suarez, A.V. & Grosberg, R.K. 2003. Genetic diversity, asymmetrical aggression, and cooperation in a widespread invasive species. *PNAS USA* 100: 1078–1083.
- Turelli, M., & Hoffmann, A.A. 1991. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature* 353: 440-442.
- Tyre, A.J., Tenhumberg, B., Field, S.A., Niejalke, D., Parris, K., & Possingham, H.P. 2003. Improving precision and reducing bias in biological surveys: estimating false-negative error rates. *Ecol. Applic.* 13: 1790-1801.
- Ulloa Chacón, D. & Cherix, D. 1990. The little fire ant *Wasmannia auropunctata* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae). En *Applied Myrmecology: A World Perspective* (Vander Meer, R. K., Jaffe, K. & Cedeno, A. eds.), Westview Press, Boulder, pp. 281-289.

- Valéry, L., Fritz, H., Lefeuvre, J.C. & Simberloff, D. 2009. Invasive species can also be native. *Trends Ecol. Evol.* 24: 585-585.
- Vanzolini, P.E. 1992. Paleoclimas e especiacao em animais da América do Sul tropical. *Estud. Av.* 6: 41-65.
- Vermeij, G.J. 1991. Whem Biotas Meet: Understanding Biotic Interchange. *Science* 253: 1099.
- Vitousek, P.M., Dantonio C.M., Loope L.L. & Westbrooks R. 1996. Biological invasions as global environmental change. *Am. Sci.* 84:468-478.
- Vitousek, P.M., D'Antonio, C.M., Loope, L.L., Rejmanek, M. & Westbrooks R. 1997. Introduced species: a significant component of human-caused global change. *New Zeal. J. Ecol.* 21: 1-16.
- Vonshak, M., Dayan, T., Foucaud, J., Estoup, A. & Hefetz, A. 2009. The interplay between genetic and environmental effects on colony insularity in the clonal invasive little fire ant *Wasmannia auropunctata*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63: 1667-1677.
- Vonshak, M., Dayan, T., Ionescu-Hirsh, A., Freidberg, A. & Hefetz, A. 2010. The little fire ant *Wasmannia auropunctata*: a new invasive species in the Middle East and its impact on the local arthropod fauna. *Biol. Inv.* 12: 1825-1837.
- Vonshak, M., Dayan, T. & Hefetz, A. 2012. Interspecific displacement mechanisms by the invasive little fire ant *Wasmannia auropunctata*. *Biol. Inv.* 14: 851-861.
- Vorburger, C., Lancaster, M. & Sunnucks, P. 2003. Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two “superclones” in Victoria, Australia. *Mol. Ecol.* 12: 3493–3504.
- Walker, K.L. 2006. Impact of the little fire ant, *Wasmannia auropunctata*, on native forest ants in Gabon. *Biotropica* 38: 666-673.
- Walsh, P.D., Henschel, P. & Abernathy, K.A. 2004. Logging speeds little red fire ant invasion of Africa. *Biotropica* 36: 637-641.
- Walters, A. 2010. The invasion of exotic ants: implications for native flora and fauna, with specific reference to the Northern Territory. En Jambrecina M (ed) 2010. Kakadu National Park Landscape Symposia Series 2007–2009. Symposium 5: Feral animal management, 3–4 December 2008, Jabiru Community Centre, Kakadu National Park. Internal Report 568, October, Supervising Scientist, Darwin.
- Ward, P. S. 1987. Distribution of the introduced Argentine ant (*Iridomyrmex humilis*) in natural habitats of the lower Sacramento Valley and its effects on the indigenous ant fauna. University of California. Vol. 55.
- Way, M.J., & Bolton, B. 1997. Competition between ants for coconut palm nesting sites. *J. Nat. Hist.* 31: 439-455.
- Werneck, F.P., Costa, G.C., Colli, G.R., Prado, D. & Sites Jr, J.W. 2011. Revisiting the historical distribution of Seasonally Dry Tropical Forests: new insights based on palaeodistribution modelling and palynological evidence. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 20: 272-288.

- Werneck, F.P., Gamble, T., Colli, G.R., Rodrigues, M.T. & Sites Jr, J.W. 2012. Deep diversification and long-term persistence in the South American 'dry diagonal': Integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution* 66: 3014-3034.
- Wetterer, J.K., Walsh, P.D. & White, L.J.T. 1999. *Wasmannia auropunctata*, a highly destructive tramp ant, in wildlife refuges of Gabon, West Africa. *Afr. Entomol.* 7: 292-294.
- Wetterer, J.K. & Porter, S.D. 2003. The little fire ant *Wasmannia auropunctata*: distribution, impact and control. *Sociobiology* 42: 1-41.
- Williams, D.F. (ed.) 1994. Exotic Ants. Biology, Impact, and Control of Introduced Species. Westview Press, Boulder, CO.
- Williams, S.L. & Smith, J.E. 2007. A Global Review of the Distribution, Taxonomy, and Impacts of Introduced Seaweeds. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38: 327-359.
- Williamson, M. H. & Fitter, A. 1996. The characters of successful invaders. *Biol. Cons.* 78: 163-170.
- Wilson, E.O. 1971. The insect societies. – Harvard Univ. Press.
- Winkler, G., Dodson, J.J. & Lee, C.E. 2008. Heterogeneity within the native range: population genetic analyses of sympatric invasive and noninvasive clades of the freshwater invading copepod *Eurytemora affinis*. *Mol. Ecol.* 17:415-430.
- Woodcock, B.A. 2005. Pitfall trapping in ecological studies. En: *Insect sampling in forest ecosystems*, pp. 37-57.
- Zink, R.M. & Barrowclough, G.F. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol. Ecol.* 17: 2107-2121.