

Respuestas fisiológicas al veneno de la hormiga invasora *Linepithema humile* (Hymenoptera: Formicidae), en tres especies de anfibios juveniles de su rango nativo (Amphibia: Anura)

Tesina para optar por el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas

Bach. Juan Pablo Llopart Manta

TUTOR

Dr. Raúl Maneyro

LABORATORIO DE SISTEMÁTICA E HISTORIA NATURAL DE VERTEBRADOS

CO-TUTOR

Dra. Paloma Álvarez Blanco

ESTACIÓN BIOLÓGICA DE DOÑANA – ESPAÑA

Resumen

Las invasiones biológicas tienen un gran impacto en los ecosistemas y constituyen una de las principales causas de la pérdida de biodiversidad. Entre los formícidos, la hormiga argentina (*Linepithema humile*), es uno de los principales invasores a nivel mundial. Su veneno puede ser letal en anfibios juveniles que habitan fuera de su rango natural de distribución. Sin embargo, no se conoce la relación de esta especie con los potenciales predadores que cohabitan en su área nativa, ni los efectos de su toxina en los mismos. Este trabajo buscó dilucidar algunas de estas incógnitas explorando el efecto de las toxinas de *L. humile* en juveniles de tres especies de anfibios con diferentes grados de mirmecofagia que habitan en su rango de distribución nativo: *Rhinella arenarum*, *Odontophrynus americanus* y *Boana pulchella*. Principalmente nos planteamos medir los efectos fisiológicos provocados por el veneno en los anfibios (como también evaluar el efecto inmediato), hacer un seguimiento del efecto en los mismos a corto y medio plazo. Finalmente comparar resultados de cada especie y extrapolar los mismos con antecedentes de los trabajos realizados en zonas invadidas. Se procedió exponiendo a los anfibios al contacto directo con las toxinas de la hormiga durante un breve espacio de tiempo, posteriormente se retiró la toxina. Tras la aplicación del tratamiento se evaluó el estado de los anfibios, clasificándolos en afectados (con efecto tóxico) o no afectados (sin efecto tóxico). Se estimó la dosis tóxica (DT) o el número de hormigas por gramo de anfibio necesarias para provocar un efecto tóxico en cada especie de anfibio. Las tres especies de anfibios se vieron afectadas al igual que en el rango invasor. Si bien *O. americanus* fue más sensible al veneno (DT= 108.39 ± 7.66), comparado con *B. Pulchella* (DT= 171.30 ± 26.11) y *R. arenarum* (DT= 225.39 ± 22.77), durante el seguimiento la supervivencia de *B. pulchella* fue la menor (*B. pulchella* = 20%, *R. arenarum* = 60%, *O. americanus* = 100%). Los anuros neotropicales muestran ser sensibles a la toxina de la hormiga invasora *L. humile* al igual que las especies europeas. Este trabajo constituye una innovación al ser el primero que estudia la relación de la hormiga *L. humile* con vertebrados dentro de su rango nativo, siendo crucial para entender su rol como invasor.

Introducción

Las invasiones biológicas tienen un gran impacto en los ecosistemas y constituyen una de las principales causas de la pérdida de biodiversidad (Blackburn et al. 2014). Sin embargo, existen varios elementos que pueden comprometer nuestra capacidad para predecir y prevenir el impacto de las invasiones sobre las especies residentes. Algunos efectos de las invasiones no son predecibles ni evidentes (Pysek et al. 2008; Simberloff et al. 2013; Kumschick et al. 2015; Bellard & Jeschke 2016; Seebens et al. 2018) y, a menudo, los efectos del invasor sobre la especie nativa suelen infravalorarse (Blackburn et al. 2014).

Entre los artrópodos, varias especies son potencialmente invasoras. En particular, dentro de la familia de los formícidos existen cinco especies que se encuentran entre las especies invasoras más exitosas: la hormiga de fuego, *Solenopsis invicta* (Buren, 1972), la pequeña hormiga de fuego, *Wasmannia auropunctata* (Roger, 1863), la hormiga loca o zancona, *Anoplolepis gracilipes* (Smith, 1857), la hormiga leona, *Pheidole megacephala* (Fabricius, 1793), y la hormiga argentina *Linepithema humile* Mayr, 1868 (Lowe et al. 2000; Invasive Species Specialist Group, 2021). Las especies de formícidos invasores presentan características comunes que las hacen únicas para conquistar nuevos ambientes como la omnivoría, el comportamiento cooperativo entre hormigas obreras de diferentes nidos

conocido como unicolonialidad (Suarez et al. 2008), la poliginia, por la que presentan un gran número de reinas por colonia, y un comportamiento altamente agresivo interespecífico (Hölldobler & Wilson 1990; Passera 1994; Holway et al. 2002). Esta última característica ha sido clave en el éxito de las introducciones de hormigas, utilizando diferentes mecanismos de ataque y defensa según la especie. Tres de las cinco especies de hormigas invasoras mencionadas son conocidas por utilizar defensas químicas: *S. invicta* y *W. auropunctata* (Myrmicinae) inyectan sus venenos mediante un aguijón y *A. gracilipes* (Formicinae) libera ácido fórmico en forma de spray. A pesar de que *L. humile* (Dolichoderinae) no cuenta con un aguijón ni ácido fórmico, recientemente se ha demostrado que posee un potente veneno que utiliza, de manera efectiva, contra otras hormigas y también contra predadores en las zonas en que invade (Welzel et al. 2018; Alvarez-Blanco et al. 2021).

Si bien el control y prevención de las invasiones por formícidos es fundamental para la preservación de los ecosistemas, es necesario considerar que las colonias de formícidos, en sus zonas nativas, cumplen roles ecológicos fundamentales (Hölldobler & Wilson 1990). Existen muchas especies animales que se alimentan especialmente de hormigas, cumpliendo un rol de gran importancia en las cadenas tróficas; como es el caso de reptiles (Pianka & Parker 1975), mamíferos (Naples 1999), aves (Wiebe & Gow 2013), anfibios (Berazategui et al. 2007) y algunos invertebrados (Gotelli 1996). Los anfibios anuros posmetamorfos son animales cuyas dietas son principalmente carnívoras, particularmente se alimentan de artrópodos (Wells 2010). Algunas especies presentan dietas especializadas y en esos casos la especialización es hacia la formicivoría (Caldwell 1996). Esta selección de dieta es favorecida en algunos grupos de anfibios al secuestrar los alcaloides presentes en los formícidos adquiriendo características únicas como la secreción de alcaloides a través de la piel, siendo tóxicos en función de los formícidos consumidos en la dieta (por ejemplo en *Melanophryniscus*, *Dendrobates*, *Phylllobates*, *Epipedobates*) (Caldwell 1996; Santos et al. 2003; Mebs et al. 2010; Hantak et al. 2013). Este mecanismo funciona como una táctica antipredadora que pudo haber marcado una presión selectiva en estos grupos (Caldwell 1996). Sin embargo, cuando una especie invasora ocupa un nuevo ecosistema, los predadores nativos no han tenido el tiempo de coevolución necesario, por lo que no presentan mecanismos que les permitan lidiar con las toxinas que usan estas nuevas presas (Keane & Crawley 2002; Colautti et al. 2004; Sih et al. 2010). A nivel mundial, el impacto que las hormigas invasoras ocasionan en la comunidad autóctona de hormigas genera cambios en niveles tróficos superiores, alterando las dietas de sus predadores (Suarez et al. 2000; Holway et al. 2002; Suárez & Case 2002; Alvarez-Blanco et al. 2017). Los efectos negativos ocasionados por la hormiga argentina en predadores nativos ya se han estudiado en diferentes países como es el caso de España, Estados Unidos y Japón (Suarez & Case 2002, Touyama et al. 2008, Alvarez-Blanco et al. 2017). Existen muchos reportes de ataques en vertebrados para otros invasores formícidos como es el caso de *S. invicta*, pero hay pocos estudios que sugieran esta posibilidad para *L. humile*. Siendo un invasor a nivel mundial, esta especie puede preda en nidos de muchas especies de aves, sin embargo no se la ha considerado una gran amenaza (Suarez et al. 2005). Muchos de estos trabajos se basan en observaciones de casos puntuales, pero no comparan los efectos en zonas invadidas con los de zonas no invadidas (Lemm 1997; Delibes 2005; Boieiro et al. 2018; Rankin et al. 2018; Varela et al. 2018).

Existen muchas hipótesis que son de gran utilidad para explicar el éxito e impacto de las invasiones biológicas, pero una de las más plausibles para este escenario es la hipótesis del “arma novedosa” en la cual se postula que el éxito de algunas invasiones se debe a que el invasor presenta un arma, química generalmente, que le permite enfrentar a las especies residentes (tanto competidores, como predadores) y éstas no pueden lidiar contra estas armas (Callaway et al. 2004). Esta hipótesis es

factible para explicar el éxito de las invasiones de *L. humile*, ya que su veneno puede ser letal en anfibios juveniles en las zonas donde ha invadido. De hecho, el primer estudio que sugiere esta posibilidad para *L. humile* acaba de ser publicado (Alvarez-Blanco et al. 2021). Sin embargo, no se conoce la relación de esta especie con sus potenciales predadores, que habitan dentro de su área natural de distribución, ni los efectos de su toxina en los mismos. Como es el caso de *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867), *Odontophrynus americanus* (Duméril & Bibron, 1841) y *Boana pulchella* (Duméril & Bibron, 1841) las cuales tienen la ventaja de presentar diferentes grados de mirmecofagia, por lo que podrían correlacionarse en su grado de adaptación y co-evolución con sus presas (Caldwell 1996), siendo *R. arenarum* la que presenta un mayor número de hormigas en su dieta en estado juvenil (Quiroga et al. 2009; Moreira 2021) y *B. pulchella* la que presenta el menor número en su dieta (Maneyro & Rosa 2004). Mientras que *O. americanus* presenta un grado intermedio ya que su dieta abarca una gran variedad de artrópodos (Isacch & Barg 2002). Por otro lado, estas especies pueden compararse con especies de similaridad ecológica que se han estudiado en zonas invadidas y son afectadas negativamente por *Linepithema* (Alvarez-Blanco et al. 2017; Alvarez-Blanco et al. 2021), entre ellas se encuentran las especies europeas: *Epidalea calamita* (Laurenti, 1768), *Pelobates cultripipes* (Cuvier, 1829) y *Hyla meridionalis* (Boettger 1874). Acorde a la literatura mostrada, esta tesina se propone dilucidar algunas de las incógnitas claves para explicar la invasión de *L. humile* a partir de los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL: Evaluar la respuesta por exposición al veneno de la hormiga *Linepithema humile*, en juveniles de tres especies de anfibios con diferentes grados de mirmecofagia que habitan en su rango de distribución nativo (*Rhinella arenarum*, *Odontophrynus americanus* y *Boana pulchella*).

Específicos:

1. Medir los efectos fisiológicos provocados por el veneno en los anfibios y evaluar su efecto inmediato
2. Hacer un seguimiento del efecto en los anfibios a corto y medio plazo.
3. Comparar los resultados de cada especie de anfibio con los antecedentes de trabajos realizados en zonas invadidas.

Hipótesis: Dado que las especies de anfibios sobre las que se medirá el efecto de las toxinas de *L. humile* han coevolucionado con esta hormiga, los efectos de estas toxinas sobre los anfibios serán más leves que los constatados en especies de Europa, en su rango invasor. Esto demostraría que se cumple la hipótesis del arma novedosa (explicando los impactos de la hormiga invasora sobre los predadores en el rango invasor) y se confirmaría la coevolución de *L. humile* y los anfibios (la ausencia de efecto en los predadores del rango nativo).

Materiales y Métodos

Colecta de ejemplares

En octubre de 2017 se colectaron ejemplares de tres especies de anfibios: *Rhinella arenarum*, *Odontophrynus americanus*, y *Boana pulchella*. Los ejemplares de *R. arenarum* se colectaron en la localidad de Shangrilá (34°52'S, 56°0'W), los de *O. americanus* en el Pinar (34°48'S, 55°54'W); ambos en el departamento de Canelones; y los de *B. pulchella* en los alrededores de Melilla, departamento de Montevideo (34°26'S, 56°23'W). Fueron colectados en estado larvario y criados en laboratorio hasta completar la metamorfosis, momento en que se los colocó en recipientes individuales. A los juveniles de *Odontophrynus americanus* y *Rhinella arenarum* se les puso arena con un refugio y se los alimentó con termitas obreras (*Cortaritermes fulviceps*) para evitar un sesgo con los efectos del veneno presente en las termitas soldado. A los juveniles de *B. pulchella* se les acondicionó con tierra húmeda y unas ramas como enriquecimiento ambiental, y fueron alimentados con moscas *Drosophila melanogaster* por las preferencias en su dieta (Maneyro & Rosa 2004).

Las hormigas de *L. humile* fueron colectadas de un nido en el Parque Rodó de Montevideo (34°55'S, 56°10'W) y en un nido presente en el departamento de Canelones, próximo a su capital (34°31'S, 56°16'W). Se mantuvieron en laboratorio en un recipiente con reposición de agua azucarada e insectos (*ad libitum*).

Experimentos

Los anfibios fueron pesados antes de los experimentos y luego se colocaron en condiciones de luz controlada. Se preparó un triturado de hormigas dejando una gota de agua en el mortero donde se depositaron las hormigas y se molieron. La toxina a ser testada es la iridomirmecina, que representa un 2% de la masa corporal de estos individuos y es una sustancia muy volátil (Pavan 1952), por lo que debe procederse con cuidado para asegurarse de suministrar a los anfibios la dosis correcta.

Se llevó a cabo el experimento con 20 individuos de cada especie de anfibio (5 controles y 15 destinados a los tratamientos). El tratamiento consistió en depositar una cantidad determinada de hormigas trituradas sobre la piel de cada anfibio durante 10 minutos, mientras que a los controles se les pasó agua y se los manipuló de la misma forma, pasando por el mismo procedimiento. Cada triturado de hormigas representa una dosis diferente de veneno, las cuales se asignaron a los anfibios de forma aleatoria. Cada dosis se estimó en una relación de número de hormigas/ masa del anfibio (g), de la misma forma que en Alvarez-Blanco et al. (2021). Cuando el triturado estuvo preparado se colocó dorsalmente en el cuerpo del individuo, sin llegar a la cabeza, y se dejó en oscuridad para minimizar el estrés de manejo. Pasados 10 minutos se retiró el triturado con agua.

Para evaluar la respuesta inmediata de cada individuo ante el tratamiento, se realizó un estudio clínico antes y después del tratamiento que sirvió para evaluar al individuo como afectado o no afectado tomando en cuenta diferentes respuestas fisiológicas (Kahn 2005):

a - Reflejo pupilar: mediante un estímulo de luz se evalúa la contracción o relajación de la pupila.

b - Reflejo flexor: se provoca estirando una de las extremidades posteriores esperando ver una rápida contracción en caso de no verse afectado.

c - Respuesta nociceptiva superficial (dolor): se valora presionando levemente con una pinza una de las extremidades del individuo provocando una contracción muscular.

d - Respuesta locomotora: se evalúa tocándolo cerca del urostilo levemente para ver una secuencia de saltos consecutivos.

e - Reflejo palpebral: se estimulan los músculos del párpado presionando en el canto lateral (izquierdo y derecho) del mismo.

También se evaluó el efecto del veneno a corto (de 1 - 24 horas) y medio plazo (14 días) tras la aplicación del tratamiento. De los 20 individuos se seleccionaron 10 individuos (los 5 controles y 5 tratamientos diferentes en los que los individuos hubieran resultado afectados) para hacerles un seguimiento diario durante 14 días, al séptimo día se les hizo la misma evaluación. Todos los individuos colectados fueron eutanasiados terminados los experimentos.

Todos estos procedimientos se realizaron de acuerdo al Protocolo Experimental # 391 aprobado por la CEUA de la Facultad de Ciencias. Los ejemplares fueron colectados junto con el tutor quien tiene Permiso de Colecta expedido por División Fauna de la Dirección Nacional de Medio Ambiente (Resolución N° DF152/16; vigencia: diciembre de 2018).

Análisis de datos

A partir de los datos colectados, se procedió a su análisis para determinar la dosis de veneno a la cual cada especie se vió afectada. Para esto se analizaron los resultados utilizando modelos lineales generalizados con una distribución binomial y la función de enlace *logit* (función *glm* en el paquete básico *stats* del programa estadístico R, R Core Team 2019). La variable dependiente es la respuesta de cada individuo (afectado, no afectado). La dosis aplicada (número de hormigas por masa de anfibio) y la especie de anfibio fue la variable independiente del modelo. La dosis tóxica (DT), representada por el número de hormigas por masa de anfibio que se espera que ocasione un efecto tóxico en los anfibios, fue estimada a partir de las curvas de dosis-respuesta de cada especie de anfibio, utilizando para ello la función *dose.p* en el paquete *MASS* (Venables & Ripley 2002). Para visualizar los datos del efecto inmediato y su efecto a corto plazo se realizó un diagrama Sankey a través de la función *sankeyNetwork*, del paquete *NetworkD3* (Allaire 2017).

Para evaluar la evolución del efecto del veneno a medio plazo se analizó el estado de los individuos seleccionados durante los 14 días de seguimiento. En las especies en que algún individuo no sobrevivía durante el período de seguimiento se realizó un análisis de supervivencia estimando la probabilidad de mortalidad en función del tiempo (paquete *survival* en R de Terry, Therneau & Grambsch 2000). Se estimó la función de supervivencia de cada grupo de anfibios por el método de

Kaplan-Meier (función *survfit*) y se comparó la supervivencia entre los dos grupos, los que han recibido dosis tóxicas y los controles, mediante el test de Mantel (función *survdif*). En caso de que todos los individuos de una especie de anfibio sobrevivan al periodo de seguimiento, se estudió su crecimiento calculando la diferencia entre el peso inicial (al comienzo del experimento) y el peso final (día 14) de cada individuo. Con estos datos se calculó la media (\pm SE) y su porcentaje de crecimiento.

Resultados

Las tres especies de anfibios se vieron afectadas de forma negativa tras la exposición al veneno de la hormiga *L. humile*. Evaluando el efecto inmediato de *O. americanus* a su exposición al veneno, fue la especie más sensible con una dosis tóxica (DT)= 108.4 ± 7.7 hormigas/g de anfibio, seguido por *B. pulchella* (DT= 171.3 ± 26.1 hormigas/g de anfibio) y *R. arenarum* (DT= 225.4 ± 22.8 hormigas/g de anfibio) (Figura 1).

En el diagrama de flujo se puede ver el efecto inmediato y a corto plazo, donde los individuos que estuvieron en tratamiento de las tres especies se fueron recuperando en el correr del tiempo, disminuyendo la cantidad de afectados ($n = 31$) a la mitad en la primera hora ($n = 16$) y luego casi a la quinta parte después de las 24 horas ($n = 3$) (Figura 2). Como se ve en las Figuras 2 y 3, un individuo de *R. arenarum* y uno de *B. pulchella* mueren a las 24 horas.

Durante el seguimiento a medio plazo, la supervivencia de *B. pulchella* fue la menor y decae consecutivamente durante los primeros 4 días hasta un 20% (4 individuos fallecen), mientras que *R. arenarum* decae en los primeros 2 días consecutivos al 60% (2 individuos fallecen), en *O. americanus* se mantiene al 100% los 14 días, todos los individuos utilizados como control sobrevivieron (Figura 3), presentando diferencias significativas en *B. pulchella* ($X^2= 6.1$, $p = 0.01$, $n = 5$) pero no en *R. arenarum* ($X^2=2.2$, $p = 0.1$, $n = 5$) y *O. americanus* en el cual todos los individuos sobreviven ($n = 5$). En este último caso se evalúa su crecimiento donde los controles en promedio crecen un $11.53 \pm 11.10\%$ y los tratamientos decrecen un $4.43 \pm 5.12\%$ (Anexo I).

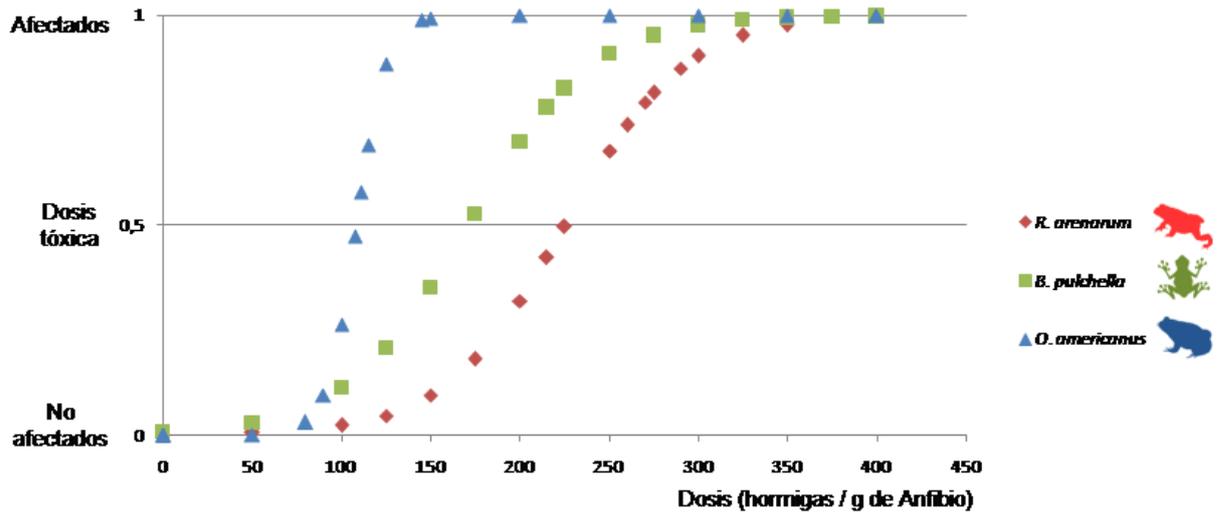


Figura 1. Curvas Dosis-Respuesta del efecto tóxico del veneno de la hormiga *L. humile* hacia anfibios juveniles de tres especies (*Rhinella arenarum*, *Boana pulchella* y *Odontophrynus americanus*) con diferente grado de mirmecofagia.

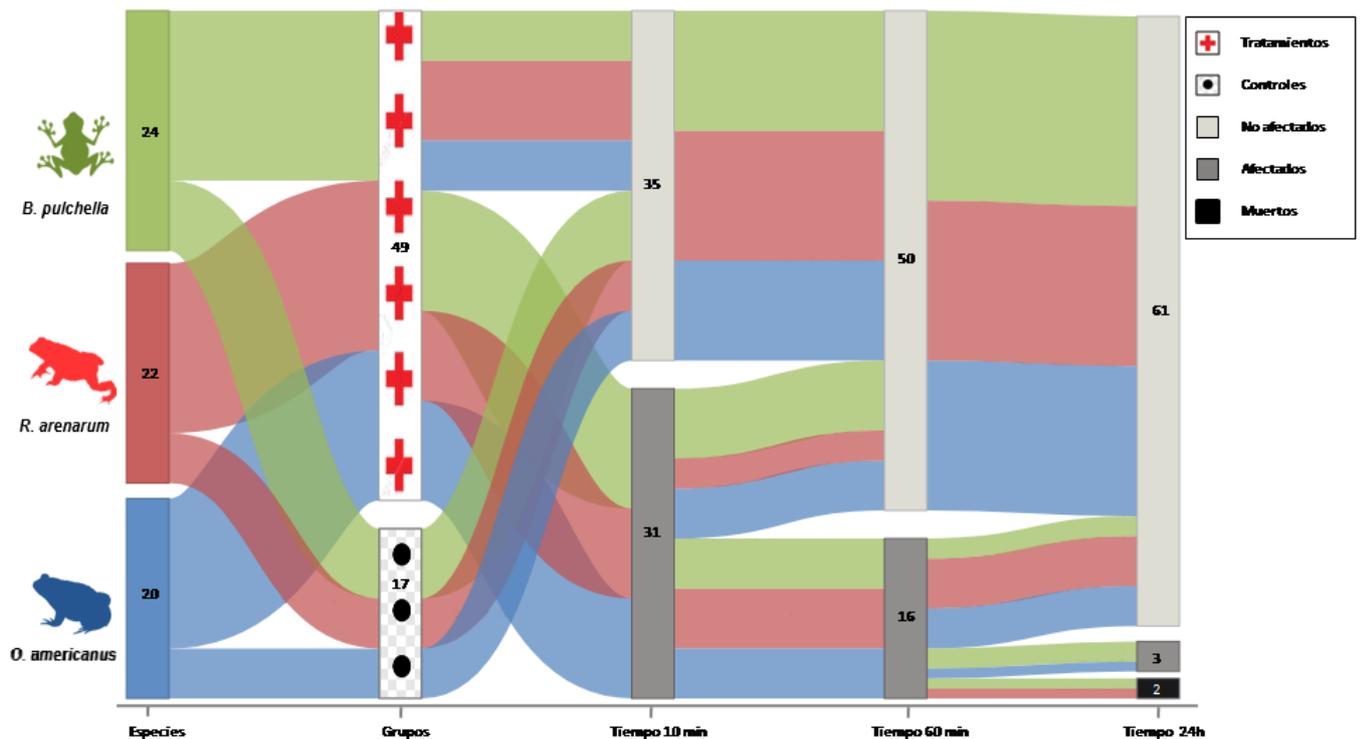


Figura 2. Diagrama de flujo que muestra la evolución de los individuos a los 10 minutos, 60 minutos y 24 horas, en gris claro los individuos no afectados, en gris oscuro los individuos afectados y en negro los muertos.

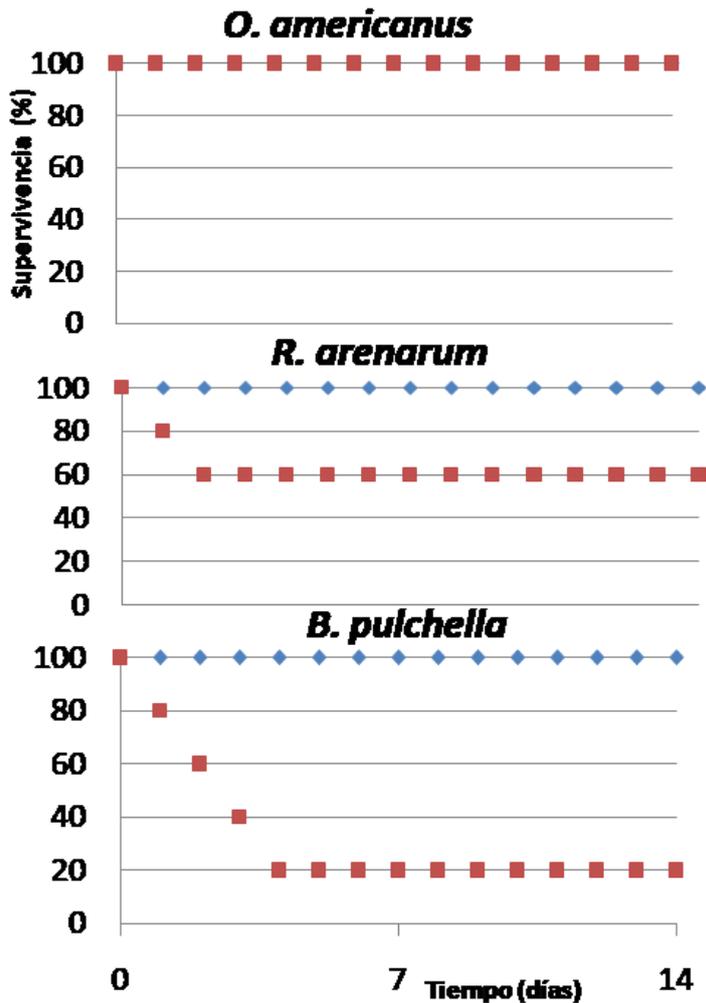


Figura 3. Supervivencia en 14 días de anfibios juveniles de tres especies tras la exposición al veneno de la hormiga *L. humile* (rojo, n = 5) y controles, sin exposición al veneno (azul, n= 5)

Discusión

Los anuros neotropicales muestran ser sensibles a la toxina de la hormiga invasora *L. humile* al igual que las especies europeas (Tabla 1). Este resultado apoya la hipótesis del “arma novedosa”, ya que explicaría que el veneno existe y funciona en el rango nativo de la hormiga invasora, al igual que se ha visto que afecta en el rango invasor. En esta discusión describimos las diferencias en la efectividad del veneno entre unas especies y otras, y porqué se puede considerar un arma novedosa en el rango invasor. En este sentido, discutiremos sobre el rol de la hipótesis de la coevolución de los anfibios del rango nativo con respecto al veneno.

Los anfibios del rango nativo de la hormiga argentina presentaron valores de dosis tóxica significativamente diferentes a los anfibios del rango invasor. El valor de dosis tóxica para *Epidalea calamita* es casi 6 veces menor que para su par americano *R. arenarum*. En ambos casos (Europa y América) son las especies que ingieren mayor número de hormigas en su dieta en estado juvenil

(Alvarez-Blanco et al. 2017; Moreira 2021). Para el caso de la especie Europea *Pelobates cultripes* su valor de dosis tóxica es significativamente menor que el de su par americano *O. americanus*. Por último, *Hyla meridionalis* presenta una dosis tóxica más de dos veces mayor a su par americano *B. pulchella*, siendo esta última relación contraria a nuestra predicción acorde a la hipótesis de coevolución de los predadores en su rango nativo (Tabla 1).

Odontophrynus americanus sobrevive los 14 días a los efectos de la toxina, esto puede deberse a que esta especie es de genoma tetraploide, por lo que al presentar redundancia en su material genético está estudiado que puede presentar una mejor respuesta frente a citotóxicos (Pollo et al. 2019) como es el caso de la iridomermicina. Sus valores de crecimiento no tienen un apoyo estadístico (N=10, para cada especie) y desconocemos su supervivencia a largo plazo. Un estudio fisiológico en distintos tejidos como del hígado, riñón y cerebro nos habrían servido para asegurar su estado de salud e inferir su supervivencia a futuro (Alvarez-Blanco et al. 2020).

La hipótesis del "arma novedosa" (Callaway et al. 2004) se propuso inicialmente en plantas, e indicaba que ciertas especies invasoras traen consigo una serie de productos químicos que son relativamente ineficaces contra las especies de sus comunidades nativas, pero son altamente inhibitoras para las plantas nativas de las comunidades invadidas (que parecen *naïf* ante esos productos). Esta hipótesis se ha visto sobre todo en plantas, pero también en algunos sistemas animales, como en el de la introducción de un ave parasitada, cuyos parásitos son nuevos para la comunidad de aves invadida afectándoles negativamente (Clark et al. 2015; Lopes et al. 2018). Para comprobar esta hipótesis se hace necesario investigar las relaciones que produce el arma novedosa en el rango nativo e invasor (Hierro et al. 2005), lo cual justifica los experimentos y el diseño experimental que aquí se presenta y las comparaciones con el trabajo de Alvarez-Blanco et al. (2021) realizado en el rango nativo. De nuestro experimento se deduce que el veneno de la hormiga argentina existe en las poblaciones del rango nativo y causa la muerte de los anfibios juveniles expuestos. Sin embargo, los resultados obtenidos en el laboratorio, no pueden ser linealmente extrapolados a lo que ocurre en la naturaleza. En el campo, el escenario es más complejo, y es de esperar que el veneno de *Linepithema* no produzca efectos negativos tan marcados, por las razones que se exponen a continuación.

La hipótesis del "arma novedosa" sobre el impacto de la invasión de *Linepithema humile* y la hipótesis de la coevolución de los predadores de su rango nativo son complementarias. Los resultados que encontramos se explican por la diferente disponibilidad de presas (formícidos) entre el rango invasor y el rango nativo, y por lo tanto, por las diferencias en la relación predador-presa que se pueden dar entre anfibios y hormigas entre ambos rangos. En el rango invasor *L. humile* es capaz de eliminar a la mayor parte de las especies de hormigas nativas, convirtiéndose en la única presa hormiga presente y en muy altas abundancias (Angulo et al. 2011). Ello podría favorecer a los predadores especialistas en hormigas, aunque esta situación no parece darse, probablemente por la toxicidad de su veneno (Alvarez-Blanco et al. 2017, 2021). Sin embargo, en el rango nativo de *Linepithema*, esta especie de hormiga no está en grandes abundancias ni es la única especie de formícido, sino que sus abundancias están limitadas por la competencia en la comunidad de hormigas nativas principalmente (Suarez et al. 1999; Calcaterra et al. 2008; Blight et al. 2017). Nuestra región, la Neotropical, está entre las regiones más diversa en formícidos junto a la región Indoaustraliana (Fernández 2003, Lach et al. 2010), siendo la competencia el principal mecanismo de control entre formícidos en estas regiones. Por lo tanto, parte del éxito de su invasión podría estar relacionada con la diferente composición de las

comunidades nativas presentes en Europa o América del Norte, explicándose mejor su impacto a través de la hipótesis de “liberación del enemigo” (“*Enemy release*”) (Elton 1958; Jeschke et al. 2012; Beaury et al. 2020), en la que la hormiga argentina se liberaría de sus principales competidores. En una comunidad, la invadida, en la que la hormiga argentina es la única especie de formicido y que está en altas abundancias, los anfibios que emergen de las charcas en zonas invadidas están indefensos ante el veneno, como ha mostrado Alvarez-Blanco et al. (2021). Esta situación no ocurre en el rango nativo, y dado que *Linepithema* no es la única especie disponible que los formicívoros comen (Moreira 2021), la posible coevolución de los anfibios del rango nativo no parece que tenga sentido.

Tabla 1. Dosis tóxica (media \pm SE) del veneno de la hormiga *L. humile* en: (a) anfibios juveniles de su rango nativo de distribución (Uruguay). (b) Para comparar, se muestran los datos de Alvarez-Blanco et al. 2020, con anfibios juveniles de similaridad ecológica en Europa (rango invasor de la hormiga).

a		América Latina	Dosis tóxica (Nº de hormigas / g anfibio)	Nº de individuos
	<i>Rhinella arenarum</i>		225.4 \pm 22.8	22
	<i>Odontophrynus americanus</i>		108.4 \pm 7.7	20
	<i>Boana pulchella</i>		171.3 \pm 26.1	24
b		Europa	Dosis tóxica (Nº de hormigas / g anfibio)	Nº de individuos
	<i>Epidaleia calamita</i>		40.1 \pm 9.5	11
	<i>Pelobates cultripes</i>		90.6 \pm 6.5	14
	<i>Hyla meridionalis</i>		367.8 \pm 44.5	21

Consideraciones finales

Se demuestra que la invasión de *L. humile* está ligada a la hipótesis de arma novedosa y se abre la puerta a otras hipótesis que podrían contemplar mejor las variables claves para el éxito en su invasión. Sería interesante probar este experimento con anfibios que mantienen una dieta formicívora incluso en estado adulto como es el caso de *Elachistocleis bicolor* (Berazategui et al. 2007).

El trabajo es novedoso ya que es la primera vez que se explora los efectos de la toxina a medio plazo. *Odontophrynus americanus* presentó una supervivencia mayor y no precisamente por presentar una dieta más orientada a la formicívora, si no a posiblemente características propias de su genoma.

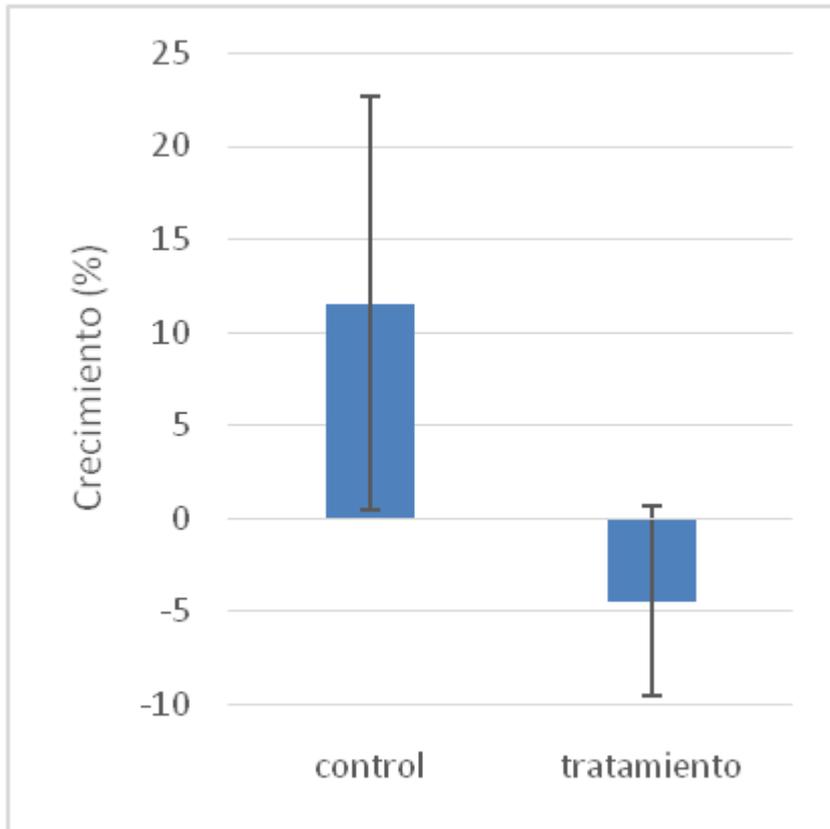
Cabe aclarar que si bien se lograron dilucidar muchas interrogantes planteadas también surgen otras nuevas, ¿Por qué *O. americanus* fue la especie más sensible a corto plazo siendo la especie con mayor supervivencia? Especulamos que haya diferencias en la velocidad de la digestión a la hora de

metabolizar la toxina en cada especie, pero no hay bibliografía que apoye esta teoría. ¿Por qué *H. meridionalis* resulta ser más resistente que cualquiera de las especies americanas a corto plazo? Estas preguntas nos abren las puertas que nos permitan formular nuevas hipótesis para dirigir nuevas investigaciones que nos permitan comprender un poco más el mundo de las invasiones biológicas.

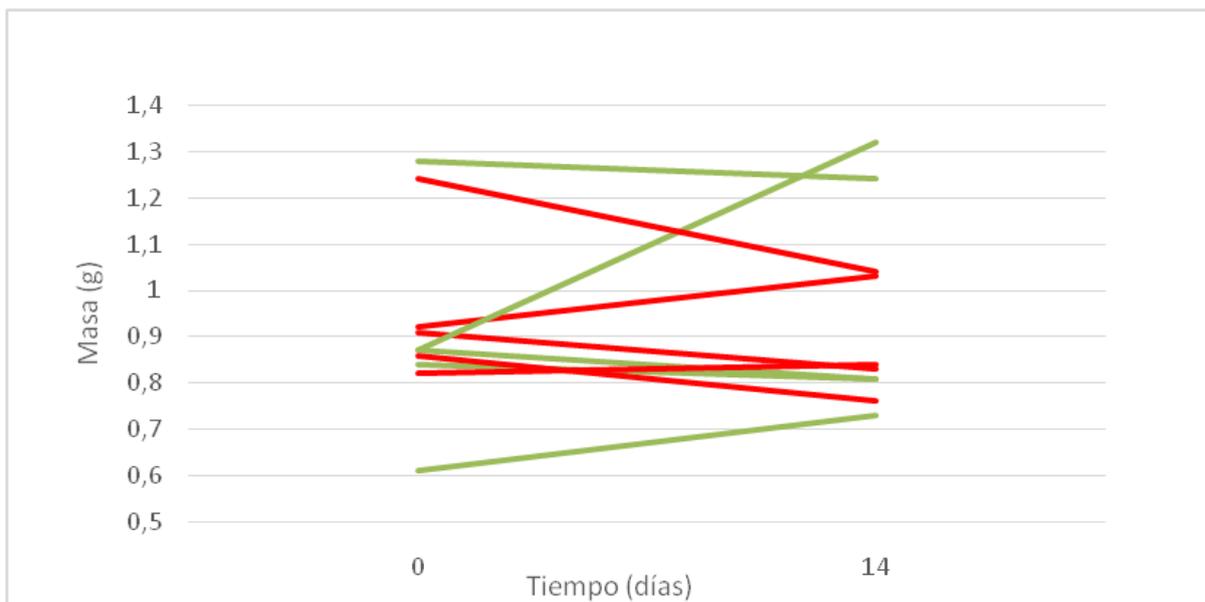
Agradecimientos

Quería darles las gracias a los miembros del tribunal, Dr. Ciro Invernizzi y Msc. Alvaro Laborda, por brindarme esta oportunidad de exponer mi trabajo. Sobre todo y principalmente a mis tutores el Dr. Raúl Maneyro y la Dra. Paloma Álvarez Blanco por su paciencia y compromiso durante todo este tiempo que trabajamos juntos, como también eternamente agradecido con la Dra. Elena Angulo por su gran aporte en la realización de este trabajo y al Dr. Alok Bang por ayudarme en el análisis de datos. También a Lucía Moreira por su ayuda durante el trabajo experimental y al equipo del Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados por brindarnos el espacio para trabajar. Y gracias a mi familia y amigos por siempre estar presentes, aportando cada uno con su cariño y afecto en los recuerdos de mi propia historia.

Anexos



Anexo I. Crecimiento de juveniles de *Odontophrynus americanus*, durante los 14 días de seguimiento (valor medio \pm SE, n= 5 controles y n= 5 tratamientos).



Anexo II. Crecimiento en bruto (masa) de *Odontophrynus americanus*, desde el tiempo 0 (inicio del experimento) y al final. Control: verde (n=4), Tratamiento: rojo (n=4).

Bibliografía

Angulo E, Caut S, & Cerdá X. (2011). Scavenging in Mediterranean ecosystems: effect of the invasive Argentine ant. *Biological Invasions*, 13:1183-1194.

Allaire JJ, Gandrud C, Russell K, & Yetman CJ. (2017). networkD3: D3 JavaScript Network Graphs from R. R package version 0.4. <https://CRAN.R-project.org/package=networkD3>

Alvarez-Blanco P, Caut S, Cerdá X, & Angulo E. (2017). Native predators living in invaded areas: responses of terrestrial amphibian species to an Argentine ant invasion. *Oecologia*, 185:95-106

Alvarez-Blanco P, Cerdá X, Hefetz A, Boulay R, Bertó-Moran A, Díaz-Paniagua C, Lenoir A, Billen J, Liedtke C, Chauhan K R, Bhagavathy G, & Angulo E. (2020). Effects of the Argentine ant venom on terrestrial amphibians. *Conservation Biology*, 35:216-226.

Beaury E M, Finn J T, Corbin J D, Barr V, & Bradley BA. (2020). Biotic resistance to invasion is ubiquitous across ecosystems of the United States. *Ecology letters*, 23: 476-482.

Bellard C, & Jeschke J. (2016). A spatial mismatch between invader impacts and research publications. *Conservation Biology*, 30:230-232.

Berazategui M, Camargo A, & Maneyro R. (2007). Environmental and seasonal variation in the diet of *Elachistocleis bicolor* (Guérin-Méneville 1838) (Anura: Myrobatrachidae) from northern Uruguay. *Zoological Science*, 24:225-231.

Blackburn TM, Essl F, Evans T, Hulme PE, Jeschke JM, Kühn I, Kumschick S, Marková Z, Mrugala A, Nentwig W, Pergl J, Pysek P, Rabitsch W, Ricciardi A, Richardson DM, Sendek A, Vilá M, Wilson JR, Winter M, Genovesi P, & Bacher S. (2014). A unified classification of alien species based on the magnitude of their environmental impacts. *PLoS biology* 12:e1001850

Blight O, Josens R, Bertelsmeier C, Abril S, Boulay R, & Cerdá X. (2017). Differences in behavioural traits among native and introduced colonies of an invasive ant. *Biological Invasions*, 19:1389-1398.

Boeiro M, Catry P, Jardim CS, Menezes D, Silva I, Coelho N, Oliveira P, Gatt MC, Pedro P, & Granadeiro JP. (2018). Invasive Argentine ants prey on Bulwer's petrels nestlings on the Desertas Islands (Madeira) but do not depress seabird breeding success. *Journal for Nature Conservation*, 43: 35-38.

Calcaterra, L A, Livore, J., Delgado A., & Briano, J A. (2008). Ecological dominance of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*, in its native range. *Oecologia*, 156(2), 411-421.

Caldwell J P. (1996). The evolution of myrmecophagy and its correlates in poison frogs (Family Dendrobatidae). *Journal of Zoology*, 240:75-101.

Callaway R M. & Ridenour, W. M. (2004). Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2:436-443.

Clark N J, Olsson-Pons S, Ishtiaq F, & Clegg S M. (2015). Specialist enemies, generalist weapons and the potential spread of exotic pathogens: malaria parasites in a highly invasive bird. *International Journal for Parasitology*, 45: 891-899.

Colautti RI, Ricciardi A, Grigorovich IA, & MacIsaac HJ. (2004). Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? *Ecology Letters*, 7:7217-33.

da Rosa I, Canavero A, Maneyro R, D E N., & Camargo A. (2002). Diet of four sympatric anuran species in a temperate environment. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 13:12–20.

Delibes M. (2005). *La naturaleza en peligro: causas y consecuencias de la extinción de especies*. Editorial Destino, Barcelona.

Elton CS. (1958). *The ecology of invasions by plants and animals*. Methuen, London.

Fernández F. (ed.). (2003). *Introducción a las Hormigas de la región Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá.

Gotelli NJ. (1996). Ant community structure: effects of predatory ant lions. *Ecology*, 77:630-638

Hantak M M, Grant T, Reinsch S, McGinnity D, Loring M, Toyooka N, & Saporito R A. (2013). Dietary alkaloid sequestration in a poison frog: an experimental test of alkaloid uptake in *Melanophryniscus stelzneri* (Bufonidae). *Journal of Chemical Ecology*, 39:1400-1406.

Hierro J L, Maron J L, & Callaway R M. (2005). A biogeographical approach to plant invasions: the importance of studying exotics in their introduced and native range. *Journal of Ecology*, 93:5-15.

Hölldobler B, & Wilson E O. (1990). *The Ants*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.

Holway DA, Lach L, Suarez AV, Tsutsui ND & Case TJ. (2002). The causes and consequences of ant invasions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33:181-233.

Invasive Species Specialist Group. (2021). *Global Invasive Species Database*. <http://www.iucngisd.org/gisd/>. Acceso en 14 de diciembre de 2021.

Isacch J P, & Barg M. (2002). Are bufonid toads specialized ant-feeders? A case test from the Argentinian flooding pampa. *Journal of Natural History*, 36:2005-2012.

Jeschke JM, Gómez Aparicio L, Haider S, Heger T, Lortie CJ, Pyšek P & Strayer DL (2012). Support for major hypotheses in invasion biology is uneven and declining. *NeoBiota*, 14:1–20.

Kahn C. (2005). *The Merck veterinary manual*. 9th ed. Merck Hardcover, Philadelphia.

Keane RM, & Crawley MJ. (2002). Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution*, 17:164-170

Kumschick S, Gaertner M, Vilà M, Essl F, Jeschke JM, Pyšek P, Ricciardi A, Bacher S, Blackburn TM, Dick JT, Evans T, Hulme P, Kühn I, Mrugala A, Pergl J, Rabitsch W, Richardson D, Sendek A, & Winter M. (2015). Ecological impacts of alien species: quantification, scope, caveats, and recommendations. *Bioscience* 65:55-63

Lach L, Parr C, & Abbott K. (Eds.). (2010). *Ant ecology*. Oxford University Press, Oxford.

Lemm J. (1997). Predation of captive reptiles in southern California by the introduced Argentine ant, *Leptothema humile*. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 7:4-5.

Lopes R J, Correia J, Batalha H, & Cardoso G C. (2018). Haemosporidian parasites missed the boat during the introduction of common waxbills (*Estrilda astrild*) in Iberia. *Parasitology*, 145:1493-1498.

Maneyro R, & da Rosa I. (2004). Temporal and spatial changes in the diet of *Hyla pulchella* (Anura, Hylidae) in southern Uruguay. *Phyllomedusa*, 3:101-113.

Mebis D, Jansen M, Köhler G, Pogoda W, & Kauert G. (2010). Myrmecophagy and alkaloid sequestration in amphibians: a study on *Ameerega picta* (Dendrobatidae) and *Elachistocleis* sp. (Microhylidae) frogs. *Salamandra*, 46:11-15.

Moreira L. (2021). Ecología trófica de anfibios juveniles (Amphibia: Anura) y análisis de la incidencia de las hormigas (Hymenoptera: Formicidae) como presa potencial [Tesis de grado para Licenciatura en Ciencias Biológicas]. Universidad de la República. Uruguay.

Naples VL. (1999). Morphology, evolution and function of feeding in the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). *Journal of Zoology*, 249:19-41.

Passera L. (1994). Characteristics of tramp species. In: Williams DF. (ed) *Exotic Ants: biology, impact and control of introduced species*. Westview Press, Boulder. pp. 23-43

Pavan M. (1952). Iridomyrmecin as insecticide. IX Int Congr Emtomol Amsterdam 17-24 August 1951, 1:321-327.

Pianka ER, & Parker WS. (1975) Ecology of horned lizard: a review with special reference to *Phrynosoma platyrhinos*. *Copeia*, 1975:141-162

Pollo F E, Grenat P R, Otero M A, Babini S, Salas N E, & Martino A L (2019). Evaluation in situ of genotoxic and cytotoxic response in the diploid/polyploid complex *Odontophrynus* (Anura: Odontophrynidae) inhabiting agroecosystems. *Chemosphere*, 216:306-312.

Pyšek P, Richardson DM, Pergl J, Jarošík V, Sixtova Z, & Weber E. (2008). Geographical and taxonomic biases in invasion ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 23:237-244

Quiroga L B, Sanabria E A, & Acosta J C. (2009). Size-and sex-dependent variation in diet of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) in a wetland of San Juan, Argentina. *Journal of Herpetology*, 42:311-317.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rankin DT, Clark CJ, & Rankin EEW. (2018). Hummingbirds use taste and touch to discriminate against nectar resources that contain Argentine ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 72:44.

Santos JC, Coloma L A, & Cannatella DC. (2003). Multiple, recurring origins of aposematism and diet specialization in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100:12792–12797.

Seebens H, Blackburn T M, Dyer EE, Genovesi P, Hulme PE, Jeschke J M, ... Ansong, M. (2018). Global rise in emerging alien species results from increased accessibility of new source pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115: E2264-E2273.

Sih A, Bolnick DI, Luttbeg B, Orrock JL, Peacor SD, Pintor LM, Preisser E, Rehage JS, & Vonesh JR. (2010). Predator-prey naïveté, antipredator behaviour, and the ecology of predator invasions. *Oikos*, 119:610-621.

Simberloff D, Martin J-L, Genovesi P, Maris V, Wardle DA, Aronson J, Courchamp F, Galil B, Garcia-Berthou E, & Pascal M. (2013). Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology and Evolution*, 28:58-66.

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. *Biological Invasions* 1:43-53.

Suarez AV, Richmond JQ, & Case TJ. (2000). Prey selection in horned lizards following the invasion of Argentine ants in southern California. *Ecological Applications*, 10:711-725.

Suarez AV, & Case TJ. (2002). Bottom-up effects on persistence of a specialist predator: Ant invasions and horned lizards. *Ecological Applications*, 12:291-298.

Suarez AV, Yeh P, & Case TJ. (2005). Impacts of Argentine ants on avian nesting success. *Insectes Sociaux*, 52:378-382.

Suarez AV, Holway DA, & Tsutsui ND. (2008) Genetics and behaviour of a colonizing species: The invasive Argentine ant. *American Naturalist*, 172:S72-84.

Therneau T M, & PM Grambsch. (2000). *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer, New York.

Touyama Y, Ilhara Y, & Ito F. (2008). Argentine ant infestation affects the abundance of the native myrmecophagic jumping spider *Siler cupreus* Simon in Japan. *Insectes Sociaux*, 55:144-146.

Trevan, J W. (1927). The error of determination of toxicity. *Proceedings of the Royal Society of London (Ser. B)*, 101:483-514.

Varela AI, Luna N, & Luna-Jorquera G. (2018). Assessing potential Argentine ant recruitment to pipping eggs in the red-tailed tropicbird on Rapa Nui (Easter Island). *Emu-Austral Ornithology*, 118:381-384.

Venables WN, & Ripley BD. (2002). *Modern Applied Statistics with S*. Springer, New York.

Wells K D (2010). *The ecology and behavior of amphibians*. University of Chicago Press, Chicago & London.

Welzel KF, Lee SH, Dossey AT, Chauhan KR, &Choe D-H. (2018). Verification of Argentine ant defensive compounds and their behavioral effects on heterospecific competitors and conspecific nestmates. *Scientific Reports*, 8:1477.

Wiebe KL, & Gow EA. (2013). Choice of foraging habitat by northern flickers reflects changes in availability of their ant prey linked to ambient temperature. *Ecoscience*, 20:122-130.