



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**Caracterización de los haplotipos de ADN mitocondrial del
caracol terrestre invasor *Rumina decollata* (Linnaeus, 1758)
presentes en Argentina.**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE GRADO EN LICENCIATURA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tesista: Julian Guerrero Spagnuoli

Directora: Dra. Julia Pizá

Co-director: Dr. Juan Manuel Rodrigo

Junio 2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**Caracterización de los haplotipos de ADN mitocondrial del
caracol terrestre invasor *Rumina decollata* (Linnaeus, 1758)
presentes en Argentina.**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Julian Guerrero Spagnuoli
Tesisista

Dra. Julia Pizá
Directora

Dr. Juan Manuel Rodrigo
Co-director

Agradecimientos

Dedico esta tesis a todas aquellas personas que me acompañaron a lo largo de esta etapa en la universidad e hicieron de ella una de las más lindas de mi vida.

Quiero agradecer a mi madre, a mi padre y toda mi familia por el apoyo moral y económico para cumplir con las metas que me propuse. A mis amigos por festejar junto a mí en las buenas y bancarme en las malas. A los buenos docentes que me tocaron por hacer que me apasionara del mundo biológico tanto como ellos. A Miriam por la escucha. A Natalia por aconsejarme en estos años. Al laboratorio GENeTyC por el espacio y la capacitación. A Viviana por gestar este proyecto y pensar en mí para participar. A todos los “científicos ciudadanos” que se tomaron el tiempo de recolectar y enviarme las muestras. A la Asociación Argentina de Malacología por reconocermelo con el Premio J. J. Parodiz. A Daniela y Pilar por su ayuda en el análisis de los datos. A Sebastián por trabajar codo a codo conmigo en todo momento. A Julia y Juan Manuel por su compromiso con este trabajo y su confianza en mí.

Gracias a todxs.

Índice

Resumen	5
Introducción	6
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Materiales y métodos	11
1.1. Distribución geográfica	11
1.2. Muestras	11
2.1. Extracción del ADN	12
2.2. Amplificación por PCR de genes mitocondriales y secuenciación	13
2.3. Edición de secuencias	14
2.4. Análisis de relaciones filogenéticas	15
2.5. Redes de haplotipos	15
Resultados	16
1.1. Distribución geográfica de <i>Rumina decollata</i>	16
1.2 Muestras	17
2. Análisis genéticos	18
2.1 Extracción de ADN genómico total	18
2.2 Amplificación y secuenciación	19
2.4 Análisis de relaciones filogenéticas	19
2.5 Redes de haplotipos	22
Discusión	23
Conclusión	26
Bibliografía	27

Resumen

Rumina decollata (Linnaeus, 1758) es un gasterópodo terrestre omnívoro, hermafrodita con capacidad de reproducirse por fertilización cruzada o por autofecundación facultativa. Es una especie nativa de la región Mediterránea del sur de Europa y norte de África, aunque actualmente pueden encontrarse poblaciones introducidas de esta especie en varios países de América y Asia. Sus características biológicas le permiten adaptarse a una gran variedad de ambientes y condiciones climáticas y, por lo tanto, colonizar rápidamente nuevas y diversas regiones. Es una especie potencialmente invasora debido a su impacto negativo sobre la biodiversidad nativa, la producción agrícola y la salud humana y animal. Trabajos previos postulan que los individuos fuera del área de distribución nativa pertenecen a un mismo grupo filogenético denominado “Clado A” y asocian este clado con un morfo de color oscuro. Los estudios genéticos en especies exóticas y/o invasoras permiten ampliar el conocimiento de las relaciones filogenéticas de las distintas poblaciones y su variabilidad con el fin de tomar decisiones relacionadas con su manejo y eventual control. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar poblaciones de *Rumina decollata* en Argentina, centrándose en una actualización de su distribución actual y en la caracterización de los haplotipos y morfos presentes con el fin de poder dilucidar la vía de introducción en el país. Para ello, se desarrolló un proyecto de ciencia ciudadana que permitiera recabar información sobre la presencia de la especie y obtener el material necesario para realizar un análisis a nivel molecular, utilizando la región parcial del gen mitocondrial COI para estudiar las relaciones filogenéticas existentes entre ellas. Este análisis se realizó extrayendo el ADN genómico total de los individuos, amplificando y secuenciando la región parcial de ese gen y, posteriormente, confeccionando un árbol filogenético de máxima verosimilitud y una red de haplotipos.

Los resultados obtenidos permitieron ampliar la distribución conocida de la especie hasta el momento, registrándola en 179 localidades de 16 provincias diferentes. Además, se pudo determinar que existe un haplotipo predominante perteneciente al llamado Clado A, idéntico al encontrado en poblaciones de España y Portugal. En cuanto a la coloración, los individuos estudiados presentaron coloración variable del cefalopie, en discrepancia con el enunciado de algunos autores que establece que el morfo colonizador es el oscuro. Además, se encontró que una de las poblaciones presentaba variaciones con respecto al haplotipo de las demás muestras. Estos datos sugieren la importancia de realizar más investigaciones sobre la especie, teniendo en cuenta un mayor número de genes que den solidez a las relaciones filogenéticas aquí planteadas, así como emplear otras técnicas para medir la variabilidad genética intraespecífica, como puede ser el uso de microsatélites.

Introducción

Rumina decollata (Linnaeus, 1758) es un gasterópodo terrestre perteneciente a la familia Achatinidae (orden Stylommatophora). Se caracteriza por poseer hábitos omnívoros con un amplio espectro trófico, incluyendo una gran diversidad de plantas y frutos, además de alimentarse de madera, materia orgánica en descomposición, anélidos y otros caracoles (Batts, 1957; De Francesco & Lagiglia, 2007; Dundee, 1986; Fisher, 1966; Mc Donnell *et al.*, 2016; Rascop, 1960). Es una especie hermafrodita y ovípara, con capacidad de reproducirse por fertilización cruzada y por autofecundación facultativa.

El cuerpo de *R. decollata* es alargado, cubierto por una concha fusiforme y espiralada, caracterizada por presentar una sutura superficial crenulada, una abertura subvertical y un labro cortante y no reflejado (Virgillito & Miquel, 2013). La misma está constituida por paredes semisólidas y la coloración varía entre gris claro y marrón oscuro (Prévot *et al.*, 2014). *R. decollata* cuyo nombre vulgar es “caracol degollado”, se caracteriza por presentar un fenómeno conocido como decolación, que consiste en la formación de un tabique interno, retracción de la masa visceral y ruptura de los primeros anfractos de la concha. De esta manera, los caracoles juveniles presentan siete vueltas completas mientras que los adultos se caracterizan por presentar cinco vueltas o anfractos, de los cuales el quinto permanece dando una apariencia truncada (Batts, 1957).

Está adaptada a vivir en una amplia variedad de ambientes y condiciones climáticas. Puede permanecer enterrada en estivación durante las estaciones de clima seco y activarse durante las estaciones lluviosas (Moreno-Rueda, 2002).



Figura 1: Mapa con la distribución nativa de *Rumina decollata* sombreada en violeta.

R. decollata es nativa de la región Mediterránea (Figura 1) del sur de Europa y norte de África (Selander & Kaufman, 1973; Tupen & Roth, 2001). En la actualidad, presenta una distribución mundial debido a que fue introducida en varios países de América del Norte, Asia y América del Sur (Prévot *et al.*, 2014). En California, fue introducido intencionalmente en 1966 con el propósito de controlar a *Cornu aspersum* (Müller, 1774), considerada especie plaga de cítricos (Fisher *et al.*, 1980). Su presencia en Argentina fue reportada por primera vez en la provincia de

Buenos Aires (Miquel, 1988) y posteriormente en las provincias de La Pampa, Mendoza (De Francesco & Lagiglia, 2007), Córdoba (Reyna & Gordillo, 2018; Rau *et al.* 2022), Río Negro, Chubut (Pérez & Tissot, 2021) y Misiones (Rau *et al.* 2022).

Según Selander *et al.*, (1974) la especie *Rumina decollata* es un complejo de “cepas monogénicas” generadas por autofecundación facultativa, dos de las cuales corresponden a cepas de aloenzimas previamente distinguidas e identificadas como morfo oscuro y morfo claro. Entre estos dos morfos existen diferencias tanto de coloración de la superficie dorsal y región ventral del cefalopie (Figura 2), como en caracteres reproductivos (mayor número de huevos por puesta y peso individual de los huevos en el morfo oscuro; desarrollo más rápido en el morfo claro). Estas variaciones se asocian con ventajas para la colonización de nuevos ambientes.

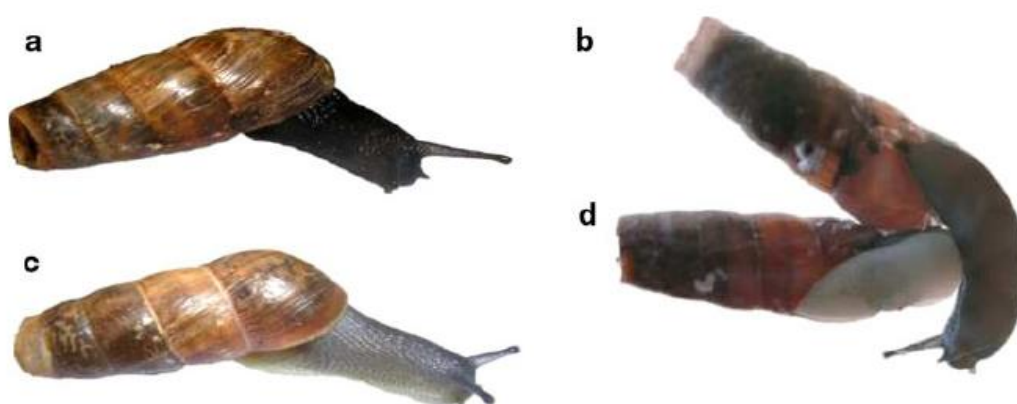


Figura 2: Detalle de los morfos oscuro (a y b) y claro (c y d) de *Rumina decollata*. Figura extraída de Prevot *et al.* (2013)

Prévot *et al.* (2013) determinaron, mediante un estudio de secuencias de ADN mitocondrial y nuclear (12S, 16S, COI, CytB, ITS1 e ITS2), que en el rango de distribución nativa de *Rumina decollata* pueden reconocerse seis clados considerados por ellos *especies filogenéticas* distintas; dos de éstas corresponden a los morfos “claro” y “oscuro” descritos previamente por Selander y Hudson (1976). Posteriormente, establecieron mediante un análisis genético comparativo que todas las poblaciones estudiadas introducidas en Asia y América (incluida una muestra de Mendoza, Argentina), corresponden a la especie filogenética identificada como clado A (i.e., morfo oscuro: cuerpo negro y pie gris oliva opaco). Estos autores asociaron el carácter invasivo y dispersivo de *R. decollata* con este clado y establecieron que los caracoles estudiados de Argentina y Brasil son originarios de las costas mediterráneas del sur de Francia y de la Península Ibérica, respectivamente (Prévot *et al.*, 2014). Estudios genéticos recientes, utilizando la secuencia parcial del gen COI, sobre esta especie determinaron que las poblaciones de Córdoba y Misiones presentan haplotipos idénticos a los encontrados en la Península Ibérica (España y

Portugal), a diferencia de la población de Mendoza que está más relacionada con las poblaciones francesas (Rau *et al.*, 2022).

Las especies invasoras son organismos que han sido introducidos intencional o accidentalmente fuera de su ámbito natural, generando impactos negativos sobre la biodiversidad nativa, la salud humana, la economía y los valores culturales (Howard, 1971; Argentina, Ministerio de Ambiente y desarrollo Sustentable, 2021). En nuestro país, esta especie fue recientemente incorporada a la “Lista oficial de especies exóticas de la Argentina” en la categoría 1, considerada Especie restringida (especies con alto impacto ambiental y socioeconómico, con uso productivo nulo o limitado) (Argentina, Ministerio de Ambiente y desarrollo Sostenible, 2021).

La consideración de *R. decollata* como especie invasora se fundamenta en el impacto negativo que puede ejercer esta especie sobre la biodiversidad nativa, la salud humana y animal y los cultivos.

Barker y Efford (2002) reportaron que *R. decollata* podía alimentarse de varias especies de caracoles y Tupen y Roth (2001) expresaron su preocupación sobre el impacto negativo de *R. decollata* sobre *Helminthoglypta walkeriana*, un gasterópodo nativo de Estados Unidos.

Por otro lado, en Argentina, Cardillo *et al.*, (2014, 2016, 2018) determinaron que *R. decollata* puede actuar como hospedador intermediario de *Toxocara cati* y *Aelurostrongylus abstrusus*, dos parásitos de gatos que pueden afectar al ser humano.

Además, si bien no es considerada una plaga de cultivos en nuestro país (Argentina, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, 2021), ha sido declarada plaga de cultivos en algunos estados de Estados Unidos, México, Cuba, Brasil y Japón (Barker & Efford, 2002; Correa Sandoval, 1993; Cowie, 2001; Landal *et al.*, 2019; Matamoros Torres, 2014; Matsukuma & Takeda, 2009; Tupen & Roth, 2001).

El conocimiento de sus características biológicas, genéticas y su distribución geográfica es fundamental para determinar su capacidad de dispersión e invasión y así poder diseñar medidas de prevención, monitoreo, manejo o control adecuadas.

En particular, los estudios genéticos son una importante herramienta para abordar el estudio de especies exóticas invasoras, ya que permite caracterizar a las poblaciones que se han establecido exitosamente en nuevas áreas de distribución (Dlugosch & Parker, 2008; Wilson *et al.*, 2009). Específicamente, analizando las características genéticas y comparando los haplotipos presentes en los rangos invadidos con los del rango nativo, se puede establecer el origen y las vías potenciales de introducción. Por lo tanto, es posible inferir si un proceso de invasión es el resultado de unos pocos individuos iniciales que llegaron mediante un único evento de

introducción, o de varios eventos de introducción y de diferentes orígenes. Este tipo de estudios pueden aportar a la comprensión de la dinámica de invasión de una especie, permitiendo apoyar o replantear lo conocido sobre su ruta de invasión e historia demográfica (Hierro *et al.*, 2005; Dlugosch & Parker, 2008; Wilson *et al.*, 2009).

El ADNmt presenta varias características que lo hacen adecuado para su uso como herramienta molecular: a- presenta un alto grado de polimorfismo y una tasa elevada de mutación, por lo que evoluciona más rápidamente que el ADN nuclear de copia simple; b- la mayoría de las variantes de ADNmt involucran sustituciones nucleotídicas sin cambios en la longitud de la molécula; c- la herencia del ADNmt es casi siempre materna por lo que normalmente no presenta recombinación genética intermolecular; y d) la mayoría de los individuos son homoplásmicos para un ADNmt prevalente (Avice *et al.*, 1987; Ballard & Whitlock, 2004; Lanteri & Confalonieri, 2003). Además, se encuentran disponibles cebadores universales para diferentes regiones mitocondriales animales. El gen Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) codifica para una subunidad del complejo citocromo oxidasa que es parte de la cadena transportadora de electrones. La secuencia parcial de este gen es de utilidad para diversos estudios como los filogeográficos o la identificación de especies (a través de códigos de barra genéticos: *DNA barcoding*). Su uso extensivo en estas áreas hace que existan protocolos y condiciones de amplificación estandarizados que garantizan la amplificación del gen con alto grado de éxito (DeWaard *et al.*, 2008).

Las hipótesis planteadas en este trabajo son:

1. La dispersión de la especie *Rumina decollata* está asociada a factores antrópicos y sus características biológicas favorecen su establecimiento en ambientes de características diversas.
2. Las especies que presentan capacidad de autofecundarse presentan baja variabilidad genética.
3. En *Rumina decollata*, las poblaciones introducidas pertenecen al clado A definido por Prevot *et al.* (2014) y se reconocen morfológicamente por la coloración oscura del cefalopie.

Los objetivos de este trabajo son:

Objetivo general

-Estudiar las poblaciones argentinas de *Rumina decollata*.

Objetivos específicos

- Conocer la distribución actual de *Rumina decollata* en la Argentina.
- Caracterizar los haplotipos de la subunidad I del gen mitocondrial de la enzima citocromo oxidasa I (COI) presentes en poblaciones argentinas de *Rumina decollata*.
- Determinar los morfos de color presentes en la Argentina y evaluar su correlación con los haplotipos de ADN mitocondrial.
- Estudiar los posibles orígenes de la especie en nuestro país mediante un análisis comparativo de secuencias de ADN y morfos de color entre las poblaciones argentinas y las poblaciones en el rango nativo de distribución.

Materiales y métodos

1.1. Distribución geográfica

Para actualizar el conocimiento de la distribución geográfica de *Rumina decollata* en nuestro país se desarrollaron dos acciones enmarcadas dentro un proyecto de Ciencia Ciudadana. En primer lugar, se presentó un póster en el 3er Congreso Argentino de Malacología (noviembre de 2019) para solicitar a la comunidad malacológica información de la presencia de la especie. Posteriormente, se publicó un *flyer* en la red social Facebook para alcanzar a la población en general. Ambas publicaciones incluyeron fotos de *Rumina decollata*, una breve descripción del proyecto y datos de contacto. Los registros de presencia se realizaron por medio de emails, mensajes privados y comentarios.

1.2. Muestras

Las muestras de caracoles utilizadas en este trabajo para el estudio genético se obtuvieron a partir de la información recabada en el proyecto de Ciencia Ciudadana.

De todos los reportes recibidos, seleccionamos dos localidades por provincia y solicitamos el envío de una muestra compuesta por al menos 20 individuos vivos (Tabla 1 y Figura 3). Los caracoles recolectados fueron colocados en envases herméticos y enviados al laboratorio. Allí, los individuos fueron fotografiados para determinar el morfo de color presente en cada población y posteriormente fueron preservados en alcohol 96% hasta el momento de la extracción del ADN. Se obtuvieron 20 muestras de las siguientes localidades:

Tabla 1: Muestras de *Rumina decollata* usadas en el análisis genético. Se indica el número asignado (ID) provincia, localidad y colector.

ID	Provincia	Localidad	Colector
1	San Luis	Villa Mercedes	Iriel Alvarez
2	Río Negro	General Roca	Facundo Catalán
3	La Pampa	La Adela	Graciela Diaz Pastorino
4	Córdoba	Córdoba Capital	Natalia Gudino
5	Río Negro	San Antonio Oeste	Andrea Roche
6	Santa Fe	Venado Tuerto	Graciela Valentini
7	Córdoba	Rio Cuarto	Juan José Zabala
8	La Pampa	Santa Rosa	Pablo Villalba
9	Rio Negro	Cipolletti	Julio Mussoto
10	La Rioja	La Rioja	Carola Bertone
11	Chubut	Puerto Madryn	María Mendez
12	Buenos Aires	Carmen de Patagones	Doris Sanchez
13	Entre Ríos	Gualectuaychú	Agustina Collazo
14	Buenos Aires	Bahía Blanca	Julia Pizá
15	San Juan	San Juan	Nadia Espinosa
16	Neuquén	Andacollo	Sebastián Villanueva
17	Neuquén	Neuquén	Susana Esayag
18	Buenos Aires	Tres Arroyos	Silvina Raziati
19	Entre Ríos	Concepción del Uruguay	Mariana Pioli
20	Buenos Aires	Tandil	Rosana Rodríguez

2.1. Extracción del ADN

Para realizar la extracción del ADN genómico total se probaron distintos protocolos con el fin de encontrar el más conveniente. Finalmente se adaptó el protocolo de extracción utilizado en el laboratorio de genotipado del CERZOS (GENeTyC) con modificaciones menores.

Se seleccionó un individuo de cada muestra para realizar la extracción. Inicialmente se seccionó el pie del individuo y se lo cortó con bisturí en pequeñas porciones colocándolas en un microtubo de 1,5 ml, dejándolo secar a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la evaporación del alcohol.

Se agregó 0,8 ml de buffer CTAB (2% [p/v] CTAB: 1,4 M NaCl, 0,2% [v/v] 2-mercaptoetanol, 20 mM ácido etilendiaminotetraacético, 100 mM Tris pH 7,5) a cada tubo y se lo dejó incubar a 65°C por 30 minutos en un proceso de agitación leve y continua. Para eliminar

la mayor cantidad posible de proteínas se realizaron 3 lavados orgánicos con cloroformo. Por cada lavado se realizó una centrifugación de 10 minutos a 13000 rpm, previo agitado por inversión, y posteriormente se trasvasó la fase acuosa (superior) a un nuevo microtubo para realizar el lavado siguiente. Para obtener el precipitado de ADN, luego del último lavado se trasvasó a un nuevo microtubo la fase acuosa y se le agregó 2/3 [v/v] de alcohol isopropílico frío. El contenido fue homogenizado por inversión y dejado 1 hora a una temperatura de -20° C. Luego, tras una nueva centrifugación de 1 minuto a 13000 rpm, el pellet de ADN resultante fue lavado con etanol 70% y 100%, secado en estufa y resuspendido en 70ul de buffer TE 1X.

Para comprobar el rendimiento y la calidad de la extracción se analizó la absorbancia de la muestra a tres longitudes de onda 230, 260 y 280 nm en nanodrop (DeNovix). Además, para evaluar la integridad del material genómico extraído, se tomaron 2 µl de muestra para ser analizadas por electroforesis en gel de agarosa (agarosa 1% [p/v] a 80V por 50 min). El gel fue teñido en una solución de bromuro de etidio 0,5 µgr/ml y visualizado mediante luz UV en un transiluminador. Para estimar la cantidad y el tamaño del ADN obtenido, las muestras se corrieron con un marcador de peso molecular (100 pb precisión, PBL Productos Bio-Lógicos). Por último, se realizaron diluciones de trabajo estandarizadas en 50 ng/µl de ADN genómico. Las diluciones y *stocks* de ADNs se conservaron refrigeradas hasta el momento de su utilización.

2.2. Amplificación por PCR de genes mitocondriales y secuenciación

Mediante el empleo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) el ADN genómico total de cada individuo fue empleado para obtener amplificaciones de una región parcial del gen mitocondrial COI. Para ello, se utilizaron cebadores descriptos por Prevot *et al.* (2013) (Tabla 2) así como las condiciones de ciclado descriptas por ellos (Tabla 4). La reacción de PCR fue realizada en un volumen de reacción de 20 µl conteniendo 2 mM de cada dNTP, 0,2 mM de cada cebador, 1.25 U de Taq de alta fidelidad Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, USA) y 1 µl de la dilución de ADN extraído (Tabla 3). En la reacción de PCR se incorporó un control negativo, que consistió en una reacción sin adición de ADN, con el fin de testear posibles contaminantes.

El producto de PCR se analizó por electroforesis horizontal en agarosa (2% [p/v] a 80V por 1,5h) sembrando 7µl pcr + 1,4 µl de loading RS. En esta corrida también se utilizó un marcador de peso molecular.

Los productos resultantes de la PCR fueron acondicionados y enviados para su secuenciación en ambos sentidos a MacroGen Inc. (Corea del Sur).

Tabla 2: Cebadores utilizados en la amplificación parcial del gen mitocondrial COI de *Rumina decollata*. Tm: Temperatura de melting. TEA: tamaño esperado aproximado del producto de amplificación según bibliografía.

	Cebadores	Secuencia	Tm	TEA
COI	LCO1490 (forward)	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	50,5 °C	655 bp
	HCO2198 (reverse)	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'	55,3 °C	

Tabla 3: Composición de la mezcla de reacción utilizada en la PCR.

	1X (20 µl)	Concentración final
H2O dde	10,55	
Buffer (10x)	2	1 X
MgCl2 (50 mM)	1	2,5 mM
dNTPs (2,5 mM c/u)	1,6	0,2 mM
Primer L-R (5 µM o 5 pmol/µl c/u)	1,6	0,4 µM
Taq (5U/µl)	0,25	1,25 U
ADN (50ng/µl)	3	150 ng
Volumen total	20	

Tabla 4: Detalle del perfil térmico empleado en la PCR.

Pasos	Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	45 seg	35
Hibridación	40°C	45 seg	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	5 min	1

2.3. Edición de secuencias

Los electroferogramas fueron analizados y editados mediante el programa BioEdit (Hall, 1999) para eliminar los cebadores utilizados y obtener la secuencia consenso de cada individuo. La valoración de la calidad y especificidad de las secuencias obtenidas se realizó por comparación con secuencias de referencia depositadas en GenBank mediante el algoritmo BLASTn. Las secuencias de COI fueron alineadas mediante el programa Mega X (Kumar *et al.* 2018) utilizando el algoritmo ClustalW.

2.4. Análisis de relaciones filogenéticas

Para estudiar las relaciones entre los haplotipos y las posibles localidades de origen, se realizó el abordaje filogenético probabilístico de Máxima verosimilitud (Maximum Likelihood: ML) utilizando las secuencias obtenidas en este estudio sumadas a las secuencias disponibles en GenBank usadas por Prévot *et al.* (2013, 2014) y Rau *et al.* (2022), y considerando como *outgroup* a la especie *Subulina octona* (Bruguière, 1789); el dataset final tuvo 79 secuencias en total. El análisis ML se realizó con PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010) mediante el programa bioinformático Geneious (Geneious Prime® 2022.1.1) con el algoritmo de intercambio de ramas (*Branch swapping*) y la opción de intercambio con el vecino más cercano (Nearest-Neighbor Interchange: NNI). El modelo óptimo de sustitución nucleotídica fue seleccionado utilizando el algoritmo ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.* 2017) en la versión web de IQTree a través del Criterio de Información de Akaike; fue escogido el modelo GTR+G. Los valores de soporte de los nodos se calcularon mediante *Bootstrap* de 1000 réplicas (Felsenstein 1985).

2.5. Redes de haplotipos

Se reconstruyó una red de haplotipos (Mardulyn, 2012) para los individuos pertenecientes al Clado A (Prévot *et al.* 2014), mediante el algoritmo Median Joining (Bandelt, 1999) utilizando el programa PopART (Leigh, 2015).

Resultados

1.1. Distribución geográfica de *Rumina decollata*

El proyecto de ciencia ciudadana resultó en un total de 685 registros de la especie en nuestro país (664 encuestas válidas y 21 mensajes o emails con fotos) de 179 localidades en 16 provincias y en CABA (Figura 3). *Rumina decollata* se distribuye desde la Patagonia norte (43°S) hasta la provincia de Jujuy (23°S) a 2130 km de distancia, y desde la costa Atlántica (ciudades costeras de Buenos Aires, Río Negro y Chubut; 56°O) a la precordillera Andina 70°O en la provincia de Neuquén. La especie está ausente en la Patagonia austral (provincias de Tierra del Fuego, Santa Cruz, y Chubut al sur de los 43°S de latitud. La mayoría de los registros de presencia de esta especie no-nativa provinieron de la provincia de Buenos Aires (63,79%), con un 19,27% de Bahía Blanca. El 36,20% de los registros restantes fueron de CABA (10,36%) y 133 ciudades y pueblos de 15 provincias de Argentina. *Rumina decollata* se registró por primera vez para 157 localidades de 16 provincias, ocho de las cuales no habían sido mencionadas previamente (Jujuy, Santiago del Estero, La Rioja, San Luis, San Juan, Santa Fe, Entre Ríos y Neuquén). La especie probablemente esté presente en Resistencia, Chaco, de donde recibimos dos registros independientes que no pudieron ser confirmados con fotos. La gran mayoría de los registros provinieron de áreas urbanas y periurbanas: 95% en jardines privados o lugares públicos, como aceras, plazas o parques, 4,4% en huertos urbanos, 2,2% en baldíos y 2,4% de ambientes seminaturales de la periferia de las ciudades. No se registraron reportes en áreas protegidas o naturales.

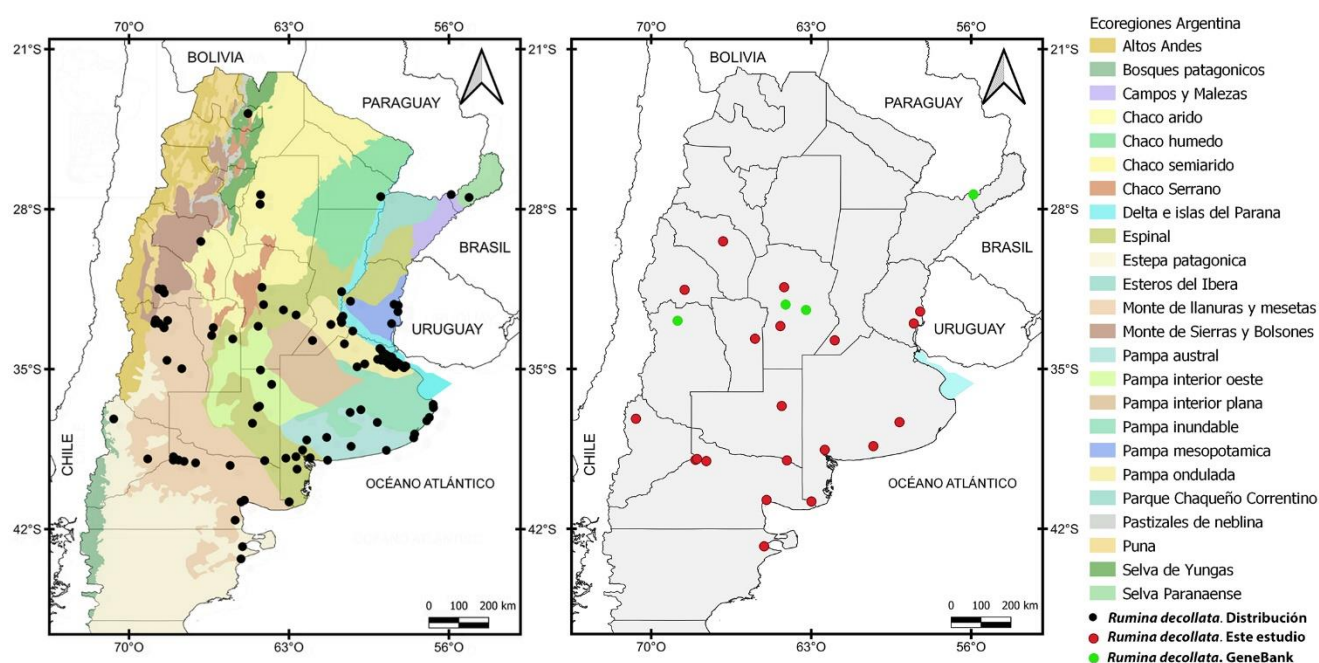


Figura 3: Distribución geográfica de *Rumina decollata*. Izquierda: mapa de reportes de *R. decollata* obtenidos en el proyecto de ciencia ciudadana. Derecha: distribución de las muestras

usadas en el análisis genético. Puntos rojos: localidades de origen de las muestras obtenidas en este trabajo; puntos verdes: secuencias disponibles en GenBank.

1.2 Muestras

Los caracoles estudiados de las 20 localidades presentaron coloraciones del cefalopie variables; muchas muestras presentan coloración que pueden ser categorizadas como pertenecientes al morfo claro, de acuerdo a lo establecido por Prévot *et al.* (2013) (Figura 4).

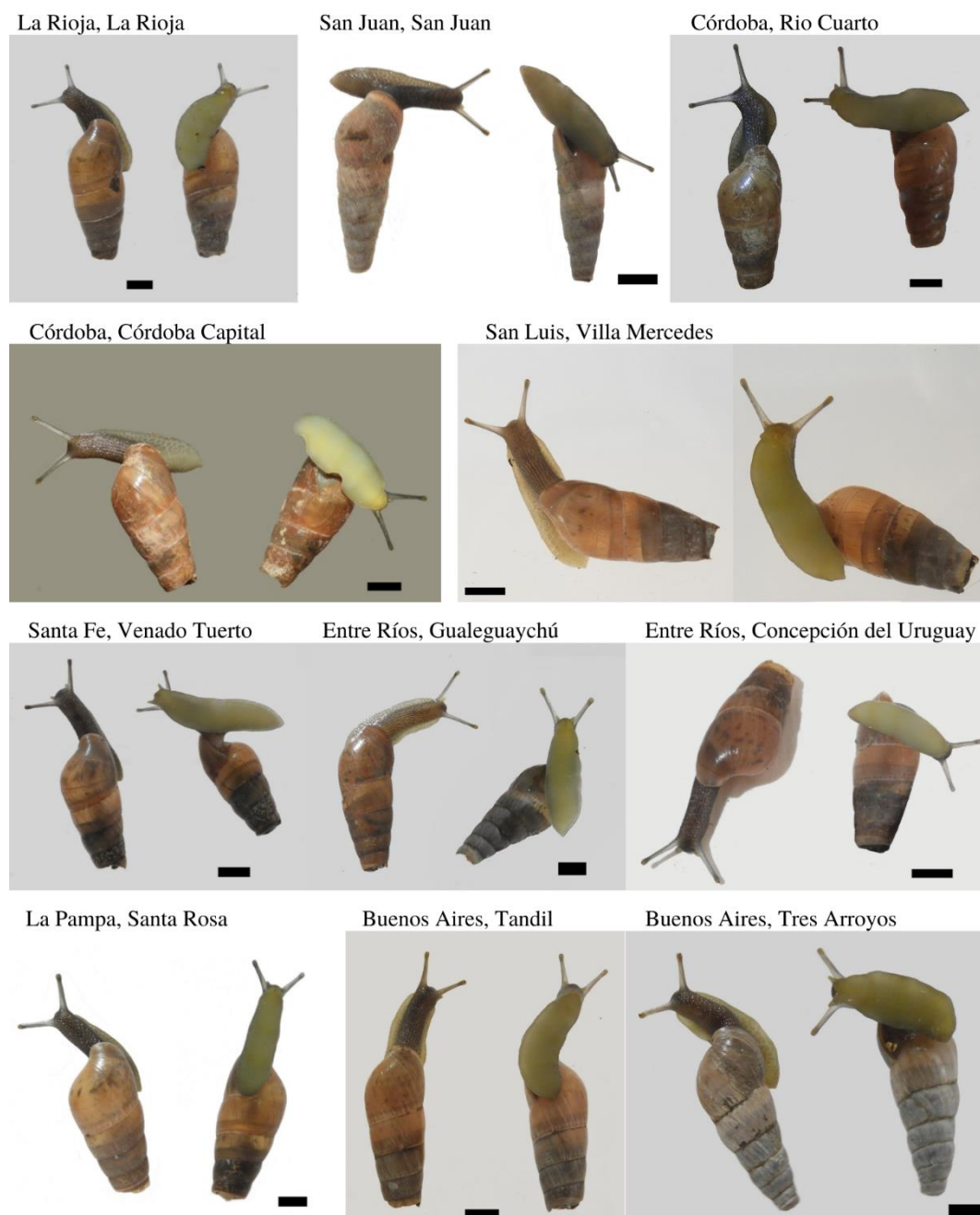




Figura 4: Vista dorsal y ventral de individuos representativos de las distintas poblaciones de *Rumina decollata* analizadas en este trabajo con su provincia y localidad. Barra de escala: 5 mm.

2. Análisis genéticos

2.1 Extracción de ADN genómico total

El protocolo empleado para extraer el ADN genómico total resultó exitoso para las 20 muestras, obteniéndose cantidad y calidad suficiente para realizar la amplificación por PCR. Esto se visualizó en una electroforesis en gel de agarosa (Figura 5) donde se encontraron bandas de ADN genómico bien definidas, con bajo nivel de degradación y sin restos de ARN visibles.

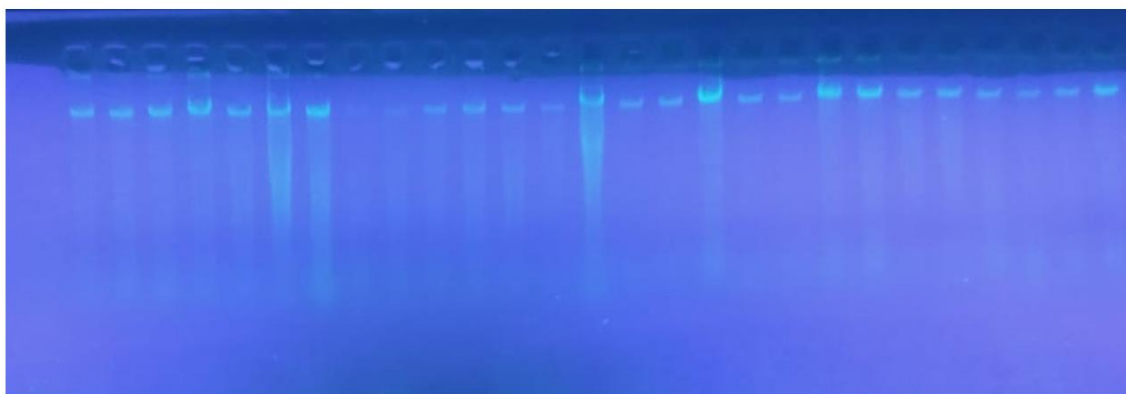


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa de las extracciones de ADN genómico total de individuos de *R. decollata*.

2.2 Amplificación y secuenciación

Posteriormente, se logró la amplificación de fragmentos únicos por medio de PCR con cebadores específicos para el gen mitocondrial COI en el total de las muestras. Se verificó el tamaño aproximado de los productos por electroforesis en gel de agarosa (figura 6), donde se constató una banda de aproximadamente 700 pb.

2.3 Edición de secuencias

Las secuencias obtenidas para las regiones parciales evidenciaron una alta calidad, a excepción de la muestra número 4 (Figura 7, A) correspondiente a la población de Córdoba Capital, la cual no fue incluida en los análisis posteriores. Por medio del análisis con BLASTn se corroboró la identidad de las secuencias obtenidas contrastándolas con secuencias depositadas en Genbank. Luego de la edición, las secuencias consenso tuvieron una longitud de 655 pb.

De las 19 muestras analizadas, 18 fueron idénticas entre sí. La muestra de Venado Tuerto (provincia de Santa Fe; C6) presentó dos bases distintas al resto en la posición 211 (C en lugar de T) y 271 (A en lugar de C).

2.4 Análisis de relaciones filogenéticas

El árbol filogenético obtenido con el método de Máxima Probabilidad (Maximum Likelihood: M) se muestra en la Figura 8, en el que se identifican 6 clados para el gen COI (A, B, C, D, E, F). Todos los individuos analizados en este estudio (C1 a C20) se ubicaron dentro del Clado A.

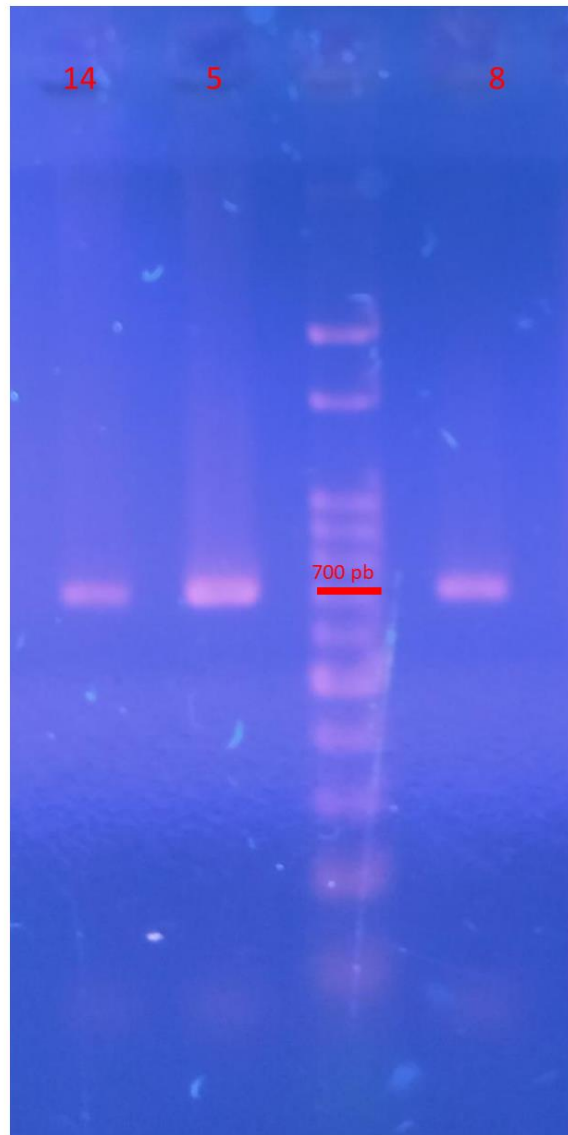


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de regiones parciales del gen mitocondrial COI en algunos individuos de *Rumina decollata*.

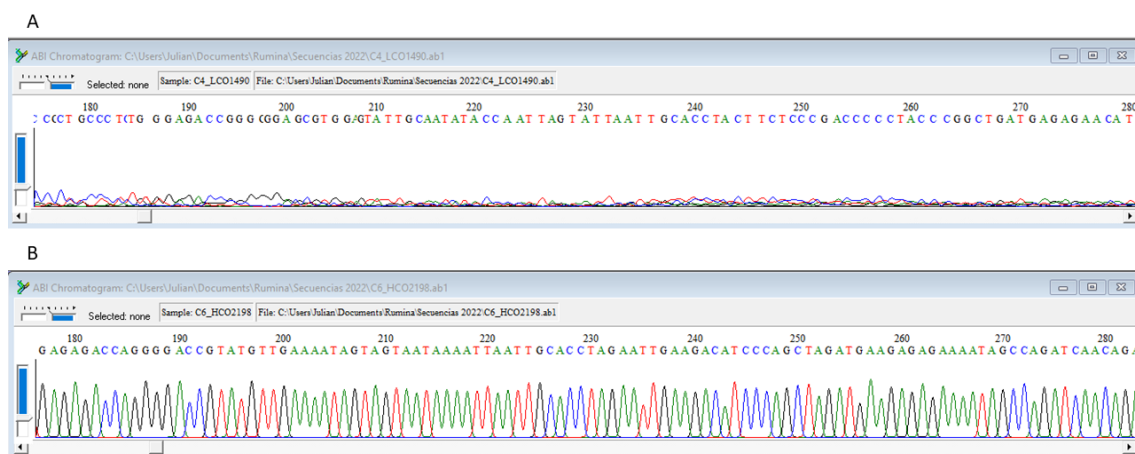


Figura 7: Cromatogramas obtenidos en la secuenciación. A) Muestra 4 descartada por presentar mala calidad. B) Muestra 6.

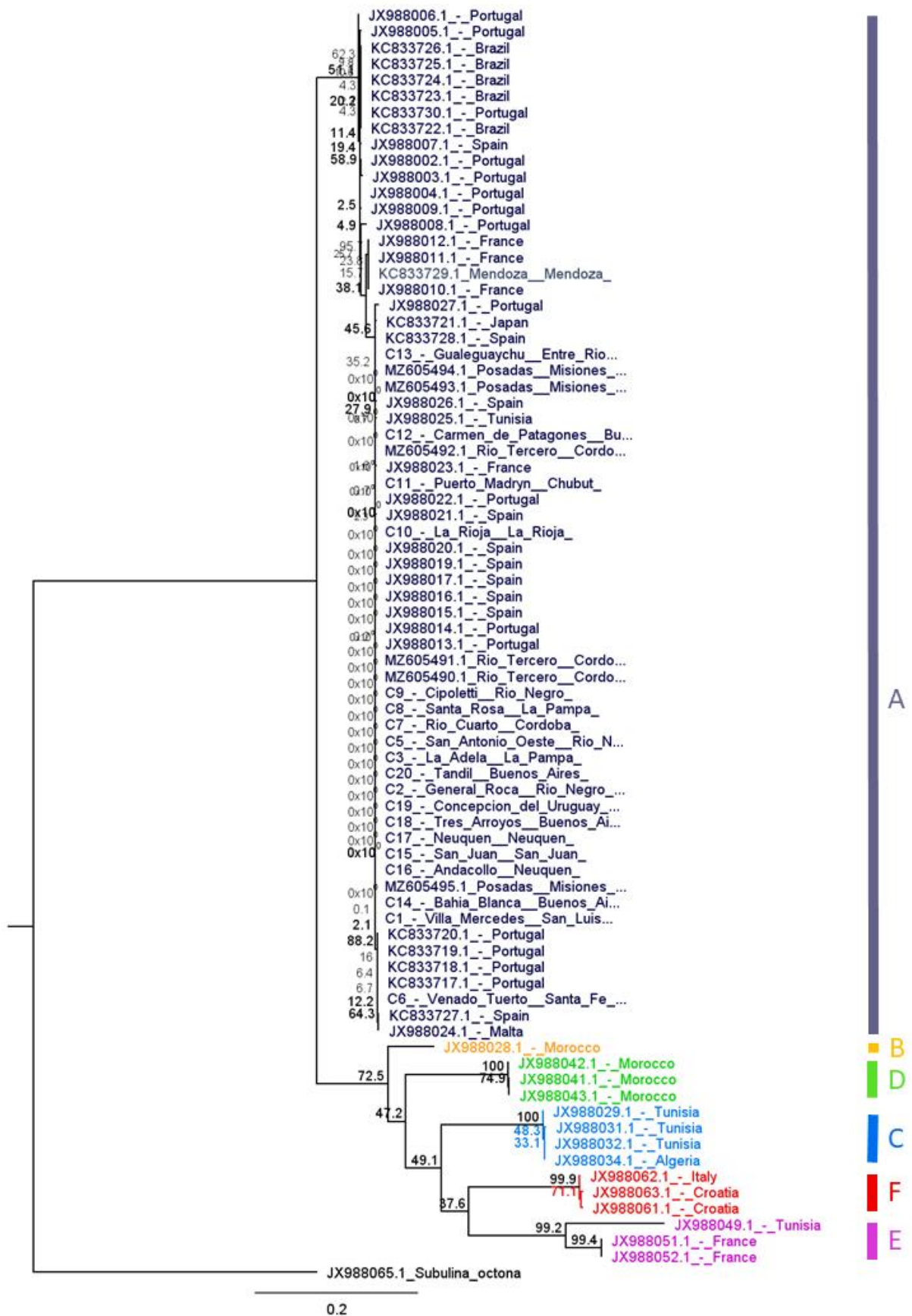


Figura 8. Árbol de Máxima verosimilitud (ML) de *Rumina decollata* a partir de secuencias parciales del gen COI.

2.5 Redes de haplotipos

La red de haplotipos obtenida para el marcador COI (Figura 9) muestra que las poblaciones argentinas analizadas en este trabajo presentan tres haplotipos diferentes, originados en distintas áreas dentro de la distribución nativa: 1) el haplotipo “Arg”, descrito por Prevot *et al.* (2014) en individuos de la provincia de Mendoza, relacionados con poblaciones de Francia; 2) las muestras aquí analizadas, al igual que las caracterizadas por Rau *et al.* (2022), con un haplotipo idéntico a poblaciones de la Península Ibérica (España y Portugal) y el haplotipo de Venado Tuerto (provincia de Santa Fe), idéntico al encontrado en poblaciones de Portugal.

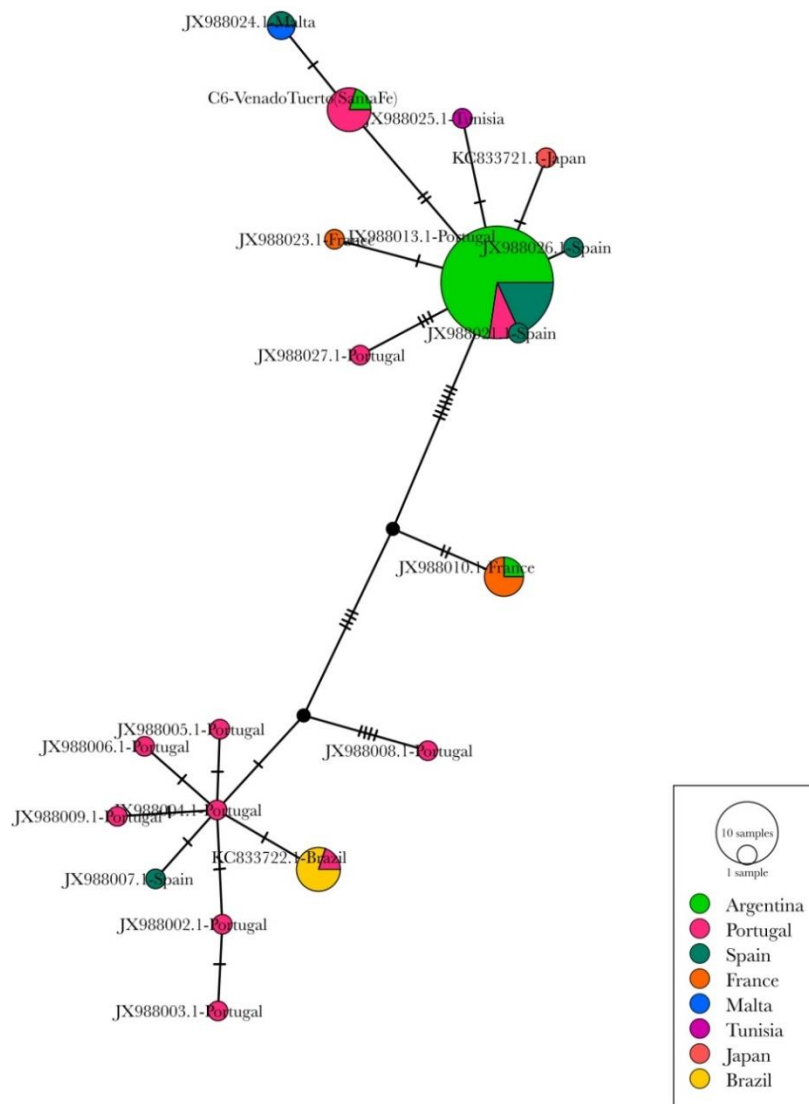


Figura 9: Red de haplotipos de *Rumina decollata* (solo haplotipo A) para el marcador COI.

Discusión

Los resultados de este estudio evidenciaron que *Rumina decollata* presenta una amplia distribución geográfica en Argentina, habitando a lo ancho y largo del país en 157 localidades de 16 provincias distintas. Hasta el momento, su distribución está limitada a conglomerados urbanos y áreas circundantes seminaturales, apoyando la idea de que su dispersión está muy relacionada con la actividad humana. Los reportes obtenidos van desde el norte de la Patagonia (43°S de latitud) hasta la provincia de Jujuy (23°S de latitud), y desde la costa atlántica, en ciudades costeras de la provincia de Buenos Aires (56°O), Río Negro y Chubut, hasta la precordillera andina, en la provincia de Neuquén (70°O). El rango de altitud registrado varía entre el nivel del mar hasta alrededor de los 1900 metros s.n.m. en la provincia de San Juan. La distribución aquí presentada abarca múltiples provincias biogeográficas argentinas (definidas según Olson *et al.* 2001) con diferencias climáticas significativas, como las áridas ecorregiones de la Estepa Patagónica, el Monte y el Chaco Seco, y regiones húmedas como la Pampa Húmeda y las Yungas. Entonces, además de una actualización de la distribución de *Rumina decollata*, nuestros datos ilustran la gran capacidad adaptativa de la especie y advierten sobre su potencialidad para colonizar ambientes naturales.

En cuanto al análisis molecular, se observó que 18 de las 19 muestras analizadas presentan el mismo haplotipo para la región parcial del gen COI, A su vez, es el mismo que presentan poblaciones de Córdoba y Misiones, analizadas por Rau *et al.* (2022). Este haplotipo, incluido dentro del Clado A, fue identificado previamente por Prevot *et al.* (2013) en las poblaciones de España y Portugal de la Península Ibérica. Sin embargo, difiere del haplotipo hallado en Mendoza por estos mismos autores, que se relaciona con poblaciones del sur de Francia. Además, la muestra de Venado Tuerto presente otro haplotipo diferente a los dos anteriores, en este caso idéntico al de individuos de poblaciones portuguesas. Esto sugiere que en nuestro país ocurrieron al menos tres introducciones de esta especie, una proveniente del sur de Francia, otra de Portugal y otra desde la Península Ibérica, esta última resultando más exitosa ya que se encuentra en múltiples localidades. La amplia distribución que presenta la especie actualmente podría deberse a una o unas pocas introducciones iniciales del mismo origen a partir de las cuales se produjo una gran expansión territorial. La vía de introducción de *R. decollata* en Argentina, si bien sigue siendo incierta al día de hoy, es posible que esté relacionada con el transporte humano accidental asociado al comercio de plantas ornamentales y hortícolas, como ha ocurrido en otros lugares (Cowie y Robinson 2003; Cowie *et al.* 2008). Las poblaciones más cercanas de esta especie a nivel regional se encuentran reportadas en estados del sur de Brasil (Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo y Santa Catarina) (Landal *et al.* 2019), aunque sus haplotipos presentan

una distancia génica considerable (13 mutaciones/pasos mutacionales) con respecto al hallado en las poblaciones locales, lo que sugiere que tienen orígenes de introducción diferentes.

En el contexto de las bioinvasiones, es esperable que los organismos con capacidad de autofecundarse, como *Rumina decollata*, establezcan nuevas poblaciones en ausencia de parejas reproductivas y a partir de pocos individuos fundadores (Lounnas *et al.*, 2017).

En las poblaciones argentinas de *R. decollata* estudiadas, la variabilidad en las secuencias del gen de subunidad I de la citocromo oxidasa I (COI) fue muy baja. La pérdida de variabilidad genética es otro resultado previsible de las poblaciones invasoras debido al efecto fundador (deriva génica) haciendo que sea más probable la propagación de un genotipo único (o de unos pocos), especialmente cuando se puede purgar la carga genética, contribuyendo al éxito de la invasión (Charlesworth & Willis 2009). La autofecundación también puede afectar la estructura genética de las poblaciones, resultando en una pérdida de variabilidad debido a la reducción del tamaño poblacional efectivo (N_e) y de la tasa de recombinación (Lounnas *et al.*, 2017).

Para profundizar en estos aspectos y agregar solidez a los resultados sobre las relaciones filogenéticas de las distintas poblaciones, se deberían secuenciar y analizar un mayor número de genes, tales como 12S rDNA, 16S rDNA y CytB o regiones nucleares como los ITS1 e ITS2. Además, con el fin de evaluar adecuadamente la variabilidad genética intraespecífica podrían analizarse otros marcadores moleculares adecuados para tal fin, como microsatélites, por ejemplo. Con los datos analizados de forma conjunta podría evaluarse el efecto de la autofecundación y la deriva génica sobre la variabilidad y estructura genética de las poblaciones, como así también esclarecer los orígenes de introducción de esta especie en Argentina.

Por otro lado, si bien nuestros datos confirman que las poblaciones en las áreas de distribución no nativas pertenecen al Clado A de acuerdo a lo establecido por Prevot *et al.* (2015), no se pudo confirmar la relación entre este clado y la coloración oscura de cuerpo y pie del animal indicada por estos autores. Los individuos analizados presentaron una coloración variable, y algunos incluso se asemejaron más al morfo claro. Esta característica sería aparentemente más diversa de lo que se creía en un primer momento, pudiendo depender de otros factores, como las condiciones ambientales. En este último aspecto, existe evidencia de que la coloración de algunos moluscos podría estar relacionada con la temperatura, como es el caso de *Cepaea nemoralis* y *C. hortensis* donde los individuos presentes en zonas más cálidas muestran una coloración más pálida que aquellos encontrados en ambientes con temperaturas más frías (Cowie y Jones, 1985).

Por último, otro aspecto interesante de este trabajo fue la utilización de un enfoque de ciencia ciudadana a través de redes sociales para la recolección de datos y la obtención del material necesario para el análisis molecular. Por un lado, en este trabajo se pudo corroborar que es una estrategia que permite obtener información de manera rápida, económica y precisa. Y por

otro, es destacable su valor como herramienta educativa ya que promueve el involucramiento y el compromiso de la población (científicos ciudadanos) en temas de impacto social como la conservación de las especies o las bioinvasiones. Más allá de los datos de presencia de la especie en el país, se pudo recolectar información sobre la percepción de las personas sobre el impacto de *R. decollata* en plantas ornamentales y hortícolas, en otras especies de caracoles terrestres y sobre medidas de control, entre otros aspectos.

Conclusión

Las principales conclusiones de este trabajo, en concordancia con los objetivos específicos planteados previamente, fueron:

- La ampliación de la distribución geográfica de *Rumina decollata* en Argentina, donde se determinó que la especie habita 179 localidades de 16 provincias y CABA.
- Los haplotipos presentes en el país se ubicaron dentro del Clado A y resultaron idéntico a los encontrados en poblaciones nativas de la Península Ibérica (España y Portugal) y Francia.
- No se corroboró la correlación entre el Clado A (invasor) y el morfo oscuro.

Bibliografía

- Argentina, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (2021a) Resolución 109 / 2021: Gestión integral de especies exóticas invasoras y potencialmente invasoras. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resolución-109-2021-348718>. Acceso: 9 de febrero de 2022.
- Argentina, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (2021b) Lista de especies exóticas invasoras, potencialmente invasoras y criptogénicas. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/lista_oficial_eei_boletin_oficial_con_nombres_comunes_0.pdf. Acceso: 7 de mayo de 2022.
- Argentina, Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (2021) *Rumina decollata*. <https://www.sinavimo.gov.ar/plaga/rumina-decollata>. Acceso: 7 de mayo de 2022.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T. Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489–522. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>.
- Baker, H.G. (1967) Support for Baker's law-as a rule. *Evolution*, 21(4): 853–856.
- Ballard, J.W. & Whitlock, M.C. (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13(4): 729–744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2003.02063.x>
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16 (1): 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Barker, G.M & Efford, M.G. (2002) Predatory gastropods as natural enemies of terrestrial gastropods and other invertebrates. En: Barker, G.M. (ed.) *Natural Enemies of Terrestrial Molluscs*. CAB International, Wallingford, pp 279–403.
- Batts, J.H. (1957) Anatomy and life cycle of the snail *Rumina decollata* (Pulmonata: Achatinidae). *The Southwestern Naturalist*, 2 (2-3): 74–82.
- Cardillo, N., Clemente, A., Pasqualetti, M., Borrás, P. & Rosa, A.M.R. (2014) First report of *Aelurostrongylus abstrusus* in domestic land snail *Rumina decollata* in the Autonomous city of Buenos Aires. *Veterinary*, 16: 15–22.
- Cardillo, N., Ercole, M., Fariña, F. Pasqualetti, M., Loiza Y., Pérez, M., Bonboni A. & Ribicich, M. (2018) Larval development of *Aelurostrongylus abstrusus* in experimentally infected *Rumina decollata* snails. *Veterinary Parasitology*, 251: 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.002>.

- Cardillo, N., Prous, C., Krivokapich, S., Pittaro, M., Ercole, M. Perez, M. Pasqualetti, F. Fariña, A. Rosa, A., Gatti, G. & Ribicich, M. (2016) First report of *Toxocara cati* in the domestic land snail *Rumina decollata*. *Revista Argentina de Microbiología*, 48: 206–209.
- Charlesworth, D. & Willis, J. H. (2009) The genetics of inbreeding depression. *Nature reviews genetics*, 10(11): 783–796.
- Correa-Sandoval, A. (1993) Caracoles terrestres (Mollusca: Gastropoda) de Santiago, Nuevo León, México. *Revista de Biología Tropical*, 41 (3): 683–687.
- Cowie, R.H. (2001) Can snails ever be effective and safe biocontrol agents? *International Journal of Pest Management*, 47(1): 23–40.
- Cowie, R.H., Hayes, K.A., Tran, C.T. & Meyer III, W.M. (2008) The horticultural industry as a vector of alien snails and slugs: widespread invasions in Hawaii. *International Journal of Pest Management*, 54(4): 267–276.
- Cowie, R.H & Jones, J. (1985) Climatic selection on body colour in *Cepaea*. *Heredity*, 55: 261–267. <https://doi.org/10.1038/hdy.1985.100>
- Cowie, R.H. & Robinson, D.G. (2003) Pathways of introduction of nonindigenous land and freshwater snails and slugs. En: Ruiz, G. & Carlton, J.T. (ed.) *Invasive species: vectors and management strategies*, Island Press, Washington D.C, pp 93–122.
- De Francesco, C.G. & Lagiglia, H. (2007) A predatory land snail invades central-western Argentina. *Biological Invasions*, 9: 795–798.
- deWaard, J.R., Ivanova, N.V., Hajibabaei, M. & Hebert, P.D.N. (2008) Assembling DNA barcodes: analytical protocols. En: Martin, C. (ed.), *Methods in molecular biology: environmental genetics*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 275–293. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-548-0_15
- Dlugosch, K.M. & Parker, I.M. (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular ecology*, 17(1): 431–449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03538.x>
- Dundee, D.S. (1986) Notes on the habits and anatomy of the introduced land snails, *Rumina* and *Lamellaxis* (Subulinidae). *The Nautilus*, 100 (1): 32–37.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783–791.
- Fisher, T.W. (1966) *Rumina decollata* (Linnaeus, 1758) (Achatinidae) Discovered in Southern California. *The Veliger*, 9(1): 16.

- Fisher, T.W., Orth, R.E. & Swanson, S.C. (1980) Snail against snail. *California Agriculture*, 34: 18–20.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. & Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3): 307–321.
- Hall, T. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser*, 41: 95–98.
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.0022-0477.2004.00953.x>
- Howard, G. (1971) Especies invasoras y humedales. RAMSAR. COP 7. Doc 24. 1–11.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K., Von Haeseler, A. & Jermin, L.S. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods*, 14(6), 587–589.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6): 1547.
- Landal, M.C.T., Bach, R.P., Gomes, S.R., Botton, M. & Zawadneak, M.A.C. (2019) Terrestrial gastropods as *Fragaria* × *ananassa* pests in southern Brazil: morphological identification. *Ciência Rural*, 49(3): e20180444. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180444>
- Lanteri, A., & Confalonieri V.A. (2003) Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. En: Llorente Bousquets y J. J. Morrone (eds.). *Una perspectiva latinoamericana de la Biogeografía*, Facultad de Ciencias, UNAM. México, pp. 185-193.
- Leigh, J.W. & Bryant D. (2015) PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol*, 6(9): 1110–1116.
- Lounnas, M., Correa, A.C., Vázquez, A.A., Dia, A., Escobar, J.S., Nicot, A., Arenas, J., Ayaqui, R., Dubois, M.P., Gimenez, T., Gutiérrez, A., González-Ramírez, C., Noya, O., Prepelitchi, L., Uribe, N., Wisnivesky-Colli, C., Yong, M., David, P., Loker, E S., Jarne, P., Pointier, J.P. & Hurtrez-Boussès, S. (2017) Self-fertilization, long-distance flash invasion and biogeography shape the population structure of *Pseudosuccinea columella* at the worldwide scale. *Mol. Ecol.*, 26(3): 887–903

- Mardulyn, P. (2012) Trees and/or networks to display intraspecific DNA sequence variation? *Mol. Ecol.*, 21: 3385–3390.
- Matamoros Torres, M., Massó Villalón, E., Ojeda Martínez, D. A., Cueto Zaldívar, N., Crespo Zulueta, K., Rodríguez Mejías, D. & Darel Mompeller Rodríguez. (2017) Influencia de la humedad relativa y la temperatura en la densidad poblacional de *Rumina decollata* (L.) (Gastropoda: Subulinidae) en el Organopónico Vivero Alamar. *Fitosanidad*, 21 (2): 61–65.
- Matsukuma, A. (2009) An invasive snail *Rumina decollata* (Linnaeus, 1758) in Japan, with records of quarantine by the Plant Protection Station, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan during 1997-2007. *The Kyushu University Museum*, 7: 35–84.
- Mc Donnel, R., Santangelo, R., Paine, T. & Hoddle, M. (2016) The feeding behaviour of *Rumina decollata* (Subulinidae: Gastropoda) raises questions about its efficacy as a biological control agent for *Cornu aspersum* (Helicidae: Gastropoda). *Biocontrol Science and Technology*, 26(3): 331–336.
- Miquel, S.E. (1988) Reciente introducción de un gasterópodo terrestre en la República Argentina. *Neotropica*, 33: 88.
- Moreno-Rueda, G. (2002) Selección de hábitat por *Iberus gualtierianus*, *Rumina decollata* y *Sphincterochila candidissima* (Gastropoda: Pulmonata) en una sierra del sureste español. *Iberus*, 20(1): 1–8.
- Olson, D., Dinerstein, E., Wikramanayake, E., *et al.* (2001) Terrestrial ecoregions of the world: A new map of life on earth. *BioScience*, 51: 933–938.
- Pérez, C. H. & Tissot, L.G. (2021) Primer reporte para la Patagonia del gasterópodo exótico invasor *Rumina decollata* (Linnaeus, 1758), (Subulinidae: Gastropoda). *Historia Natural*, 11(2): 131–139.
- Prévot, V., Jordaens, K., Sonet, G. & Backeljau, T. (2013) Exploring species level taxonomy and species delimitation methods in the facultatively self-fertilizing land snail genus *Rumina* (gastropoda: pulmonata). *PLOS ONE*, 8(4): e60736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060736>
- Prévot, V., Jordaens, K., & Backeljau, T. (2014) Predominance of a single phylogenetic species in colonization events among a sextet of decollate land snail, *Rumina decollata* (Mollusca: Pulmonata: Subulinidae), species. *Genome*, 57(3), 161–167.
- Prevot, V., Backeljau, T. & Jordaens, K. (2015) Morphometric evaluation of DNA-based cryptic taxa in the terrestrial decollate snail genus *Rumina*. *Journal of Molluscan Studies*, 81(2), 223–232.

- Rascop, A.M. (1960) The biology of *Rumina decollata* (Linnaeus) Pulmonata: Achatinidae. TESIS. The University of Arizona.
- Rau, A.I., Beltramino, A.B., Serniotti, E.N., Pizá, J., Caffetti, J.D. & Vogler, R.E. (2022) The exotic snail *Rumina decollata* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda, Achatinidae, Rumininae) in Argentina: new records, range extension, and areas of origin of Argentine populations. *Check List*, 18(1): 91–102. <https://doi.org/10.15560/18.1.91>
- Reyna, P. & Gordillo, S. (2018) First report of the non-native snail *Rumina decollata* (Linnaeus, 1758) (Subulinidae: Gastropoda) in Córdoba (Argentina): Implications for Biodiversity and Human Health. *American Malacological Bulletin*, 36(1):150–152.
- Selander, R.K. & Hudson, R.O. (1976) Animal population structure under close inbreeding: the land snail *Rumina* in Southern France. *The American Naturalist*, 110(974): 695–718. <https://doi.org/10.1086/283098>.
- Selander, R.K. & Kaufman, D.K. (1973) Self-fertilization and genetic population structure in a colonizing land snail (allozymic variation/ genic heterozygosity/ inbreeding/ monogenic strains). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 70(4): 1186–1190.
- Selander, R.K., Kaufman, D.W. & Ralin, R.S. (1974) Self-fertilization in the terrestrial snail *Rumina decollata*. *The Veliger*, 16: 265–270.
- Tupen, J. & Roth, B. (2001) Further spread of the introduced decollate snail, *Rumina decollata* (Gastropoda: Pulmonata: Subulinidae), in California, USA. *Veliger, Berkeley*, 44(4): 400–404.
- Virgillito, M. & Miquel, S.E. (2013) New records of exotic land snails and slugs in Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 15(2): 295–303.
- Wilson, J., Dormontt, E., Prentis, P., Lowe, A. & Richardson, D. (2009) Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends in ecology & evolution*, 24: 136–44. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.10.007>.