



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA**

**“Estructura social y filogeografía de hormigas del género *Philidris*  
(Formicidae; Dolichoderinae) de la región Indo-australiana, integrando datos  
genéticos contemporáneos e históricos”**

Tesis que presenta: **Yuliza Tafoya Alvarado**

Para Obtener el Grado de

**Maestra en Ciencias**

En la especialidad de biotecnología de plantas

Codirectores de la tesis:

Dr. Rafael Montiel Duarte

Dr. Milan Janda

Irapuato, Guanajuato, México

Marzo, 2016

El presente trabajo fue realizado en el grupo de Interacción Núcleo Mitocondrial y Paleogenómica del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Politécnico Nacional, CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, bajo la codirección del Dr. Rafael Montiel Duarte y en co-tutoría con el Dr. Milan Janda del Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato, así como la asesoría del Dr. Martin Heil y el Dr. Luis Delaye Arredondo.

## Agradecimientos

Agradezco a Cinvestav por haberme aceptado en el programa de Biotecnología de plantas, a CONACYT por financiar el proyecto de investigación.

A mis padres que siempre han estado apoyándome en todas las decisiones de mi vida, por su comprensión, amor y mucha paciencia. A mi hermano Ángel por acompañarme en todo momento, por cada esfuerzo compartido, por brindarme un “todo estará bien” cuando las cosas iban mal. Gracias familia.

Agradezco especialmente a mis asesores de tesis, el Dr. Rafael Montiel Durarte, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por toda su paciencia, comprensión y consejos, por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de ADN antiguo. Al Dr. Milan Janda, por todas sus enseñanzas, por brindarme su apoyo, por su paciencia en todo momento, por su comprensión y trabajo para que saliera adelante este proyecto. Ellos formaron una parte muy importante en mi formación durante la etapa de estudiante de maestría.

A mis sinodales, los doctores Dr. Luis Delaye Arredondo y el Dr. Martin Heil, por sus aportaciones y consejos para llevar a cabo este proyecto.

A Flor Zamudio, por todos sus consejos y enseñanzas en el laboratorio.

A Jan Zima, por ayudarme en la genotipificación de los microsatélites.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios 10, 11, 13 y 14 del LANGEBIO, por todos sus consejos y apoyo, por todos los momentos de distracción. A los integrantes y ex integrantes del tapanco Montiel, en especial a Karla, Ale, Lalo, Sara y Miguel, por los buenos momentos.

A mis compañeros de generación, por todas las aventuras. A mis amigos Javier Carpinteyro, Mayra, Ale Torres, por su amistad y consejos. A mis amigos Sara Covarrubias, Jessica y Eric por brindarme su ayuda en cuestiones de análisis de datos. A Arlet por los momentos de plática, acompañada de una taza de café.

## ÍNDICE

I) Resumen	11
II) Introducción	13
A) Insectos eusociales.	13
B) Eusociabilidad de las hormigas.	14
C) Las hormigas. Estructura social de la colonia.	16
c.1) Sistema de reproducción haplo-diploide.	19
D) Hormigas del género <i>Phylidris</i> (Himenóptera: Formicidae) características y distribución.	21
E) Poliginia en especies de hormigas arbóreas.	24
III) Objetivo general	26
IV) Objetivos específicos	26
V) Hipótesis	27
VII) Métodos	28
A) Área de estudio	28
a.1) Colecta de especímenes modernos en diferentes sitios de la Región Indo-Australiana.	28
a.2) <i>Phylidris myrmecodiae</i> de la localidad de Yawan, Papúa Nueva Guinea.	29
a.3) Obtención de la muestras de museo en la localidad de las Islas Salomón.	30
B) Trabajo de laboratorio	31
A) Extracción de ADN de muestras modernas	31
a.1) Amplificación de fragmentos específicos para genes nucleares (EF1, EF2 y CAD) y mitocondrial (COI) para muestras modernas.	32

B) Extracción de ADN de muestras de museo.	33
b.1) Laboratorio de ADN antiguo.	33
b.2) Extracción de ADN mediante método no destructivo.	34
b.3) Amplificación del gen COI.	36
b.4) Clonación de amplicones.	36
C) Amplificación de microsatélites.	37
D) Análisis y procesamiento de datos.	38
d.1) Análisis de datos filogenéticos de especies del género <i>Philidris</i> de la región Indo-Australiana.	38
d.2) Comparación de secuencias modernas y de museo de la especie <i>P. myrmecodiae nigriventris</i> de la localidad de las Islas Salomón.	38
E) Análisis de estructura poblacional y estructura social.	39
e.1) Genotipificación de microsatélites.	39
e.2) Variación genética y equilibrio de Hardy- Weinberg.	40
e.3) Estimación de diferenciación genética poblacional, estadísticos de F de Wright ( $F_{ST}$ , $F_{IS}$ , $F_{IT}$ ).	40
e.4) Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y análisis de componentes principales (PCA).	41
e.5) Análisis BAPS ( <i>Bayesian Analysis of Population Structure</i> ).	41
e.6) Análisis estructura social.	42
VIII) Resultados	44

A) Relaciones filogenéticas de especies del género <i>Philidris</i> .	44
a.1) Obtención de ADN para muestras modernas.	44
a.2) <i>Construcción de filogenia de especies del género Philidris de la región Indo-Australiana.</i>	44
a.3) Comparación de muestras de museo y moderna de la especie <i>Philidris myrmecodiae nigriventris</i> de la localidad de las Islas Salomón.	46
a.4). Extracción de ADN de muestras de museo.	46
B) Genotipificación de microsatélites para las poblaciones de la especie <i>P. myrmecodiae</i> .	49
b.1) Obtención de secuencias microsatélites.	
C) Diversidad genética y estructura poblacional de <i>P. myrmecodiae</i> .	51
c.1) Variación genética poblacional, equilibrio de Hardy-Weinberg y análisis de varianza molecular (AMOVA).	51
c.2) Estimaciones de diferenciación genética poblacional, estadísticos de F ( $F_{ST}$ , $F_{IS}$ y $F_{IT}$ ) y análisis de componentes principales (PCA).	52
c.3) <i>Análisis BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure).</i>	55
D) Estructura social y determinación de pedigrí de <i>P. myrmecodiae</i> .	59
d.1) Pedigrí de nidos-plantas con más de cinco individuos.	60
d.2) Pedigrí del total de individuos por nido-planta.	65
IX) Discusión	68
A) Relaciones filogenéticas de especies del género <i>Philidris</i> .	68
B) Obtención de ADN de muestras de museo y construcción de filogenia de la especie <i>Philidris myrmecodiae nigriventris</i>	

de la localidad de las Islas Salomón.	69
C) Diversidad genética y estructura poblacional.	70
D) Estructura social.	73
X) Conclusiones	77
XI) Perspectivas	78
XII) Literatura citada	79

## Índice de figuras y tablas

### Figuras

<b>Figura 1.</b> Diferentes castas de hormigas, de izquierda a derecha: Hembra alada, reina, macho alado y obrera.	17
<b>Figura 2.</b> Número de reinas en la colonia de hormigas. Monoginia: una sola reina, Poliginia: dos o más reinas.	18
<b>Figura 3.</b> A) Vuelo nupcial de las hormigas y fundación de un nuevo nido. B) Mecanismos de fundación de la colonia.	18
<b>Figura 4.</b> Representacion de los cruces en una familia en la que los machos. son haploides.	20
<b>Figura 5.</b> Hormiga del género <i>Philidris</i> .	22
<b>Figura 6.</b> Plantas del género <i>Myrmecodia</i> .	23
<b>Figura 7.</b> Distribución horizontal de <i>Hydnophytum moseleyanum</i> ocupada por nidos de <i>Philidris sp.</i> en un manglar de Papúa Nueva Guinea.	24
<b>Figura 8.</b> Sitios de muestreo en la región Indo-Australiana.	28
<b>Figura 9.</b> Mapa donde se muestran los diferentes sitios de sitio de colecta en la localidad de Yawan, PNG.	29

<b>Figura 10.</b> Islas Salomón.	30
<b>Figura 11.</b> Ejemplo de diagrama de flechas del pedigrí que identifica a cada individuo en el programa <i>Pedigree viewer</i> .	43
<b>Figura 12.</b> Árbol Máxima verosimilitud (ML) para la estimación de la relación filogenética para diferentes especies <i>P. myrmecodiae</i> de diferentes localidades de la región Indo-Australiana basada en datos concatenados de cuatro genes (COI, Ef1- $\alpha$ F1; Ef1- $\alpha$ F2 y CAD).	45
<b>Figura 13.</b> Amplificados específicos para fragmento corto LCO-44R. del gen COI para 3 individuos diferentes de cuatro localidades de las Islas Salomón.	47
<b>Figura 14.</b> Gel de agarosa 1%. Clonas obtenidas con el vector pJET para algunos individuos de las localidades de Islas Salomón.	47
<b>Figura 15.</b> Alineamiento de secuencias de individuos de museo, donde se observan los sitios polimórficos marcados en recuadros.	48
<b>Figura 16.</b> Relacion entre individuos de museo y moderno ( <i>Philidris myrmecodiae_ems2616</i> ) de la especie <i>P. myrmecodiae nigriventris</i> , pertenecientes a la localidad de las Islas Salomón en base al método de ML.	49
<b>Figura 17.</b> Amplificación de bandas de microsatélites de diferentes tamaños para <i>P. myrmecodiae</i> de la localidad de Yawan, PNG.	49
<b>Figura 18.</b> Análisis de componentes principales analizando los genotipos de los individuos por árbol, basado en índices de diferenciación genética $F_{ST}$ .	54
<b>Figura 19.</b> Análisis de componentes principales (PCA) basado el coeficiente de parentesco (Queller & Goodnight, 1989) entre los genotipos de todos los individuos pertenecientes a nidos en diferentes árboles.	55
<b>Figura 20.</b> Mapa con los 20 clústeres para los grupos (árboles) usando	

un análisis bayesiano de estructura genética poblacional de la distribución espacial por individuos, basado en posiciones geográficas para cada sitio (árbol) de la localidad de Yawan, PNG. 56

**Figura 21.** Análisis BAPS de distribución no espacial por grupos (árboles (T) y nidos (S)). Cada barra con un color diferente representa los clústeres en los cuales se agruparon datos de los diferentes haplotipos. En la parte posterior se representa el nombre de los árboles. 57

**Figura 22.** Mapa de la localidad de Yawan donde se muestra en colores los clústeres resultado del análisis no espacial (Admixture) de los grupos de haplotipos en el programa BAPS, en la parte superior derecha en el recuadro se muestran los grupos que se encuentran mezclados. Cada color representa un grupo diferente. 58

**Figura 23.** Análisis BAPS de distribución no espacial (Admixture) por grupos (árboles y nidos). Cada barra con un color diferente representa los clústeres en los cuales se agruparon datos de los diferentes haplotipos. 59

**Figura 24.** Pedigrí de *P. myrmecodiae* analizando el total de individuos pertenecientes a 6 nidos, indicando la línea materna (rosa) y la línea paterna (azul) para cada individuo. 60

**Figura 25.** Mapa con los diferentes sitios de muestreo de la localidad de Yawan, donde se muestra el número de árbol, numero de nidos (plantas hospederas) por árbol y el número de reinas y machos encontradas para cada nido analizado. 61

**Figura 26.** Pedigrí de los individuos pertenecientes a los nidos (N) 2 y 3 para el árbol número. 63

**Figura 27.** Pedigrí de los individuos pertenecientes a los nidos (N) 33 y 34

para el árbol número 6. 64

**Figura 28.** Diagrama representado los diferentes arboles (con nidos) y plantas individuales, donde se observó que nidos se encuentran conectados (en líneas largas) con más de una reina presente en varios nidos (número de líneas cortas = número de reinas compartidas) (ejemplo: para los árboles T17 y T9 se encontró una reina presente en ambos árboles; para T9 y T11 se compartieron 2 reinas). 66

### Tablas

**Tabla 1.** Proporción del parentesco en el sistema de haplodiploidía. 19

**Tabla 2.** Coeficiente de parentesco por árbol genealógico ( $b$ ) en un sistema haplodiploide. Se indican los valores de  $b$  de un macho y de una hembra con los miembros de su familia. 21

**Tabla 3.** Reactivos para preparar buffer de extracción. 31

**Tabla 4.** Total de muestras que fueron amplificadas con el fragmento LCO-44R para los dos protocolos de extracción de ADN. 47

**Tabla 5.** Resumen del total de 16 loci polimórficos para *P. myrmecodiae*, donde se muestra el número de loci, tamaño molecular (pb), Fluoróforo y número de alelos por locus. 50

**Tabla 6.** Grupos (plantas), número de individuos analizados (N), número de alelos diferentes ( $N_a$ ), número de alelos efectivos ( $N_e$ ), proporción de heterocigotos observados ( $H_O$ ) y esperados ( $H_E$ ), riqueza de alelos privados (RAP) y porcentaje de loci polimórficos. 51

**Tabla 7.** Resultados de los análisis de varianza molecular (AMOVA) de los individuos pertenecientes a los diferentes grupos (árboles) comparando la variación genética en 3 niveles. 53

## I. Resumen

El presente proyecto está dividido en tres enfoques: en la primer parte se llevó a cabo la reconstrucción de una primera filogenia en base a 15 especies diferentes pertenecientes al género *Philidris* (Formicidae: Dolichoderinae) distribuidas en 13 localidades de la región Indo-Australiana, utilizando la combinación de genes mitocondriales y nucleares. En base a este primer estudio para este género se determinó que algunas especies son endémicas de una localidad y que la especie *P. myrmecodiae nigriventris* reportada para la localidad de las Islas Salomón proviene de un antepasado originario de Nueva Guinea. En un segundo enfoque se realizó una comparación entre secuencias de individuos de museo de la especie *P. myrmecodiae nigriventris* colectados hace 100 años pertenecientes a la colección entomológica del Museo de Historia Natural Smithsonian en Washington, DC, EE.UU., donde se implementó un protocolo de extracción de ADN no destructivo, permitiendo conservar la muestra original. Con base a esta técnica se logró amplificar una región del gen mitocondrial COI y hacer una comparación entre secuencias de individuos de museo colectados hace 100 años y secuencias de individuos modernos para la búsqueda de posibles SNPs. Un tercer enfoque se situó en el estudio de la estructura social y poblacional de hormigas de la especie *P. myrmecodiae* que viven en plantas hospederas del género *Myrmecodia* (Rubiaceae: Myrmecodiae) en un bosque de Yawan en Papúa Nueva Guinea. En base a marcadores microsatélites (STRs) y análisis del pedigrí de las obreras, se determinó que estas hormigas tienen una estructura de tipo polidomia ocupando más de un nido por colonia y de tipo poliginia donde la colonia está encabezada por más de una reina.

## Abstract

This project is divided into three approaches: the first part was carried out reconstruction of a first phylogeny based on 15 different species belonging to the genus *Philidris* (Formicidae: Dolichoderinae) distributed in 13 locations in the Indo-Australian region, using the combination of mitochondrial and nuclear genes. Based on this first study for this genus, it was determined that some species are endemic to a town, and the species *P. myrmecodiae nigriventris* reported for the town of Solomon Islands comes from an ancestor that is native to New Guinea. A second approach was a comparison between sequences of individuals of the museum species of *P. myrmecodiae nigriventris* collected 100 years belonging to the Entomological collection of the Museum of Natural History in Washington, DC, USA, where we implemented a non-destructive DNA extraction protocol, allowing preserving the original sample. Based on this technique was achieved to amplify a region of the Mitochondrial COI gene and make a comparison between sequences of individuals of Museum collected 100 years ago and sequences of modern individuals for the search of possible SNPs. A third approach is put in the study of the social and population structure of ants of the species *P. myrmecodiae* host of the genus *Myrmecodia* living in plants (Rubiaceae: *Myrmecodiae*) in a forest of Yawan in Papua New Guinea. Based on microsatellite markers (STRs) and analysis of the pedigree of the workers, it was determined that these ants have a structure of type polidomia occupying more than one nest colony and type polygyny where the colony is led by more than one queen.

## II. Introducción

### **Insectos eusociales**

Los insectos forman sociedades las cuales son conformadas por individuos de la misma especie; estos individuos están organizados de manera cooperativa mediante un sistema eficiente que les permita mantener en orden la población. Algunos insectos viven en sociedades que pueden ser simples o complejas, pero todo con un objetivo en común, el cuidado de la descendencia (Hölldobler & Wilson, 2009).

La palabra eusociedad es definida por los biólogos como una sociedad avanzada, la cual está caracterizada porque sus miembros sacrifican su capacidad reproductiva en favor de los otros miembros de la sociedad. Se considera que la eusociedad tiene cuatro características fundamentales: 1) división de trabajo reproductivo, 2) cooperación en el cuidado de las crías, 3) varias generaciones de adultos que ayudan al cuidado de la descendencia y 4) altruismo (López & Ramón 2010). Los insectos que mantienen una sociedad bien organizada se caracterizan por tener miembros de diferentes castas, reina (encabeza la colonia) hembras y machos reproductivos, obreras y soldados. Cada uno de los miembros del grupo desempeña un papel en particular, dividiéndose así las tareas necesarias para el mantenimiento de la colonia. El éxito de los insectos sociales se debe principalmente a la cooperación y organización social basada en la división del trabajo. Así mientras uno o varios miembros de la colonia se encargan de la reproducción, los otros cuidan las crías, consiguen alimento, construyen el hogar y lo protegen (Hölldobler & Wilson, 2009).

Actualmente se sabe que pocos organismos en el planeta forman grupos eusociales, siendo los insectos como las abejas, hormigas y termitas los más representativos (Wilson, 1971). Pero también se tiene conocimiento de algunos otros organismos como los camarones sociales del género *Synalpheus* que habitan esponjas en arrecifes de coral (Duffy, 2003); los únicos vertebrados eusociales registrados son la rata-topo desnuda de la especie *Heterocephalus glaber* y la rata-

topo Damara, que vive en colonias subterráneas en la parte oriental de África (Sherman & Jarvis, 1991).

### **Eusociabilidad de las hormigas.**

Las hormigas pertenecen al grupo de los Himenópteros, en los cuales también están agrupados otros insectos como avispas y abejas; estos grupos de insectos mantienen una organización social que llega a niveles de complejidad elevados y sus sociedades han llegado a constituir uno de los logros evolutivos más notables. Estos insectos son muy abundantes en los ecosistemas del planeta Tierra y han sido de suma importancia por el hombre para estudios de genética poblacional, además los Himenópteros tienen una importancia económica, ya sea por la producción de productos de consumo humano como la miel, estudios de control de plagas, etc.

La sociabilidad de los insectos presenta una gran diversidad de niveles de desarrollo, desde los insectos que se encuentran solitarios, los que se relacionan con sus semejantes solo para aparearse, hasta los que constituyen grandes colonias. La organización de insectos eusociales está basada en el cumplimiento de tres características distintivas: la primera, el solapamiento de más de una generación; la segunda, la división de las labores reproductivas para cada miembro de la colonia y la tercera, los cuidados parentales compartidos (Fernández, 1999).

Muchas de las relaciones sociales de los animales, tienen como objetivo principal la supervivencia. Tal es el caso de los insectos como las hormigas que trabajan en conjunto conviviendo en nidos, los cuales forman colonias (Hölldobler & Wilson, 2009). En cada nido conviven distintos miembros de la colonia organizados en diferentes castas especializadas, desde la casta reina hasta las obreras, cada una de estas desempeñando un papel importante, dividiéndose el trabajo para el bienestar de la colonia.

Aun no se sabe a ciencia cierta que les permitió a las hormigas y a otros insectos sociales mantener una organización tan peculiar. Para comprender las condiciones que favorecieron la evolución de la eusociabilidad es necesario primeramente

conocer su historia evolutiva, desde el antecesor y cuáles fueron los eventos que lo llevaron a mantener este nivel de organización. Se han planteado tres teorías que pueden explicar el origen de la eusociabilidad en insectos: mutualismo, manipulación parental y selección por parentesco (Fernández, 1999).

La primera, el mutualismo, fue descrita por Michener (1958) y posteriormente elaborada por Lin y Michener (1972), y se refiere al éxito reproductivo y al aumento de esperanza de vida que tienen los insectos al vivir en conjunto, respecto a los que viven solos. Sin embargo esta teoría no puede explicar por qué existe una casta estéril (hormigas de la casta obrera). La segunda teoría es la manipulación parental. Esta teoría podría definirse como una forma de esclavitud y esterilización de las hormigas obreras por parte de la reina y de esta manera este grupo de obreras le pueden ayudar a aumentar el número de hijas y aumentar el número de individuos más emparentados con la reina, en lugar de dejar que estas obreras se reproduzcan y aumentar el número de nietas, de las cuales el grado de parentesco es menor. Wilson en 1971 asume que en el conflicto reina-obrera, la reina no actúa de manera agresiva con la colonia para designar el papel que desempeñará cada miembro de la colonia, sino que lo hace por medio de sustancias químicas (feromonas), el cual resulta ser un método muy efectivo especialmente en colonias de gran tamaño. La tercera teoría propuesta es la de selección por parentesco (*kin selection* en inglés). El origen de este concepto fue tomado de forma muy general por Charles Darwin en *El origen de las especies*, en la que no se explicaba cómo es que existe una casta estéril (obreras) en la sociedad de insectos sociales, que ayudan a reproducir a otra (la reina) y para poder explicar este tipo de comportamiento, Darwin introdujo dentro de su teoría la idea de la selección natural actuando a nivel de familia. Pero hubo que esperar hasta finales de los sesenta para encontrar la moderna teoría por parentesco y castas estériles propuesta por William D. Hamilton (1964) el cual la define como “La alteración, en la siguiente generación, de la frecuencia de los genes de un individuo compartidos por sus parientes a través de acciones que favorecen o desfavorecen la reproducción y supervivencia de dichos familiares; en otras palabras es la selección natural mediatizada por las interacciones entre parientes”. El cual en su trabajo explicaba que había dos formas

de pasar los alelos a las futuras generaciones, una es por reproducción a nivel individuo y la segunda por reproducción de los familiares que llevan los mismos alelos, a esta teoría le acuñó un nombre “eficacia familiar o eficacia total” (*inclusive fitness* en inglés) el cual incorpora las dos formas de pasar los alelos de una generación a otra descritas anteriormente.

### **Las hormigas. Estructura social de la colonia.**

La familia de los formícidos (*Formicidae*), conocidos comúnmente como hormigas, son una familia de insectos sociales, que como las avispas y las abejas, pertenecen al orden Hymenoptera siendo este orden muy abundante y dominan la mayor parte de los hábitats en el planeta Tierra, desde los desiertos hasta las zonas tropicales; suponen alrededor del 20% de la biomasa. En la actualidad se conocen más de 13,000 especies de hormigas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en las siete regiones biogeográficas (Pálearctica, Neártica, Neotropical, Etiópica, India y Australiana) descritas por Alfred Russell Wallace en 1876 siendo la región Neotropical la que cuenta con la mayor diversidad con 3,100 especies (Fernández & Sendoya, 2004). Debido a su éxito evolutivo, las hormigas constituyen el grupo con mayor número de especies y más diverso ecológicamente; el cual se debe a que fueron los primeros insectos sociales con hábitos depredadores que ocuparon el suelo (Deneubourg & Goss, 1989, Rojas, 2001). El primer registro fósil indica que los ancestros más antiguos datan del Cretácico inferior, hace alrededor de 130 millones de años. Se tiene la teoría de que derivan de un antepasado vespoide arborícola, que con la ayuda de la glándula metapleurale pudieron explorar y colonizar el ambiente terrestre ya que les permitió tener una protección contra los parásitos y microorganismos abundantes en este nuevo ambiente (Nel *et al.*, 2004).

Como se mencionó anteriormente, estos insectos sociales mantienen una organización que los distingue de los demás grupos como son inteligencia colectiva en la adquisición de recursos para la construcción y defensa del nido (Deneubourg & Goss, 1989). Viven en sociedades o agrupamientos, llamados hormigueros (nidos), donde viven individuos de tres castas distintas: los machos (haploides) y hembras (diploides) que son fecundos y alados, y las hormigas “obreras”, que son

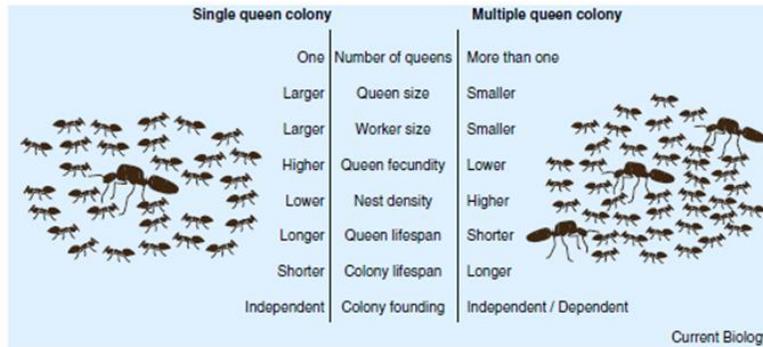
hembras infecundas y sin alas; estas últimas tienen una variación en su morfología y adoptan aspectos y tamaños distintos (obreras mayor y menor), pudiendo llegar a construir una nueva casta, las “soldados” (Figura 1), pero todos pertenecen a la misma especie de hormigas y viven en el mismo hormiguero y todas desempeñan un papel diferente en la preservación y cuidado de nido, como el cuidado de las larvas, defensa del nido y en el caso de la reina la reproducción y preservación de la colonia (Hölldobler & Wilson, 2009).



**Figura 1.** Diferentes castas de hormigas, de izquierda a derecha: Hembra alada, reina, macho alado y obrera.

Los nidos u hormigueros son de dimensiones variables, en algunas especies se han encontrado nidos gigantes, y existen diferentes tipos, construidos de acuerdo a las necesidades de la especie. Algunos son construidos en el suelo, debajo de las piedras, en troncos o material vegetal viejo, en partes vivas de las plantas (en asociación mutualista), en troncos, ramas y espinas; tal es el caso de la acacia cornígera que alberga en sus espinas a una especie de hormiga del género *Pseudomyrmex* (Heil *et al.*, 2009). Algunas colonias poseen una sola reina (monoginia) y en algunos casos, dependiendo de la especie mantienen dos o más reinas por colonia (poliginia) (Figura 2). La poliginia se clasifica en dos tipos: la primera es la “poliginia primaria”, donde varias reinas ponen huevos y contribuyen a la misma colonia, tal es el caso de los géneros *Formica*, *Plagiolepis* y *Linepithema*, y la segunda “poliginia secundaria” o “falsa poliginia” cuando dos o más reinas pueden vivir en el mismo nido, pero únicamente hasta que nacen las primeras obreras, ya que éstas eliminan a una de las reinas, tal es el caso del género *Lasius*.

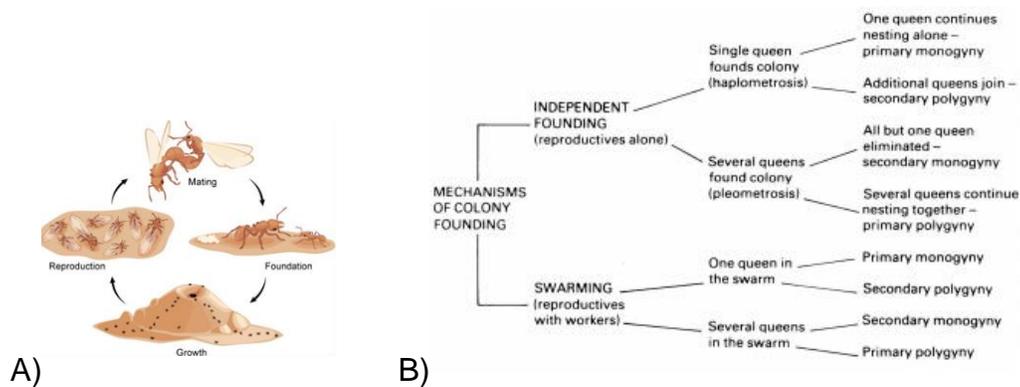
Single queen colony		Multiple queen colony	
One	Number of queens	More than one	
Larger	Queen size	Smaller	
Larger	Worker size	Smaller	
Higher	Queen fecundity	Lower	
Lower	Nest density	Higher	
Longer	Queen lifespan	Shorter	
Shorter	Colony lifespan	Longer	
Independent	Colony founding	Independent / Dependent	



Current Biology

**Figura 2.** Número de reinas en la colonia de hormigas. Monoginia: una sola reina, Poliginia: dos o más reinas.

La casta de las reinas son los únicos miembros de la colonia que pueden reproducirse. La hormiga reina es la fundadora del nido, que es fecundada una vez en su vida por un macho alado perteneciente a otro nido; la época de apareamiento para estos insectos es en temporada de lluvias, ambos (macho y hembra alados) realizan el vuelo nupcial donde el macho muere después de la cópula y la hembra pierde las alas y almacena el esperma en un órgano llamado espermateca, cae al suelo y busca un lugar adecuado para invernar y fundar una colonia nueva (Figura 3). Las primeras hormigas que nacerán, son las que se encargarán de cuidar a la reina y a las próximas generaciones (Hölldobler & Wilson, 2009). La reina puede aparearse con un macho de un nido distinto una vez en su vida (monogamia) y almacenar el esperma en la espermateca; así como también puede aparearse con varios machos (poliandria).



**Figura 3.** A) Vuelo nupcial de las hormigas y fundación de un nuevo nido. B) Mecanismos de fundación de la colonia.

Los nidos de las hormigas pueden clasificarse en dos: Monodomia, que se refiere a una colonia de hormigas que ocupa solo un nido; y Polidomia donde la colonia se expande para ocupar diversos hormigueros, produciendo hormigueros sin reina, ya que la colonia es muy abundante y existe una gran competencia por el espacio.

**Sistema de reproducción haplodiploide.**

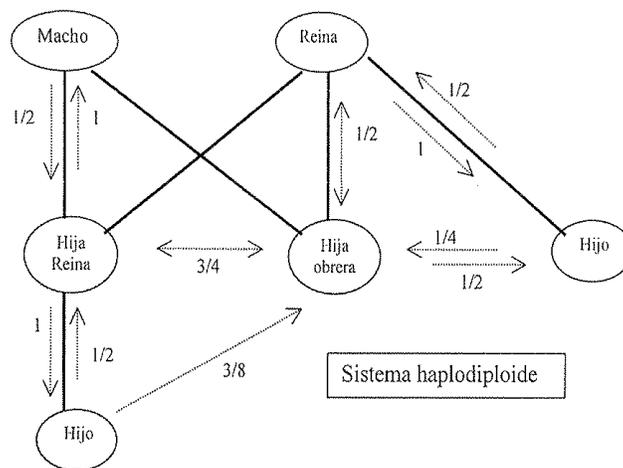
Las hormigas presentan una organización en la colonia muy particular en la que la mayor parte de los miembros de la colonia son hembras y ocasionalmente aparecen los machos. La determinación del sexo de los miembros de la colonia es por un sistema llamado haplodiploidía (Figura 4), lo que significa que los huevos no fertilizados dan lugar a machos y los huevos fertilizados dan lugar a hembras. Debido a esto, los machos son haploides, es decir, que tienen solo una dotación cromosómica que proviene de la madre y las hembras son diploides, las cuales tienen el material genético proveniente de la madre y del padre (Hölldobler & Wilson, 2009). En un sistema normal diploide la hembra está relacionada genéticamente igual con la hija que con la hermana, compartiendo un 50% de sus genes (tabla 1), pero en el caso del sistema haplodiploide, una hembra está más relacionada con su hermana (75%) que con su hija (50%).

**Tabla 1.** Proporción del parentesco en el sistema de haplodiploidía.

<i>Sistema</i>	<i>Hija-madre</i>	<i>Hermana- hermana</i>
<i>Diploide</i>	$(\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}) + (\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}) = 0.5$	$(\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}) + (\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}) = 0.5$
<i>Haplodiploide</i>	$(\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}) + (\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}) = 0.5$	$(\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}) + (1 \times \frac{1}{2}) = 0.75$

Este tipo de sistema de reproducción tiene importantes consecuencias para la evolución social en insectos (Hamilton, 1964), los cuales se mencionan a continuación:

- Permite a las hembras no apareadas producir hijos.
- La hembra que pone los huevos puede controlar la proporción sexual de los nuevos miembros de la colonia.
- El sistema haplodiploide permite que el parentesco genético entre parientes cercanos sea diferente al del sistema diploide de la mayoría de los organismos (Tabla 2). Este hecho ha sido esencial en la explicación de la evolución social de los himenópteros.



**Figura 4.** Representación de los cruces en una familia en la que los machos son haploides. Los hijos sólo descienden de la reina (huevos no fertilizados) y las hijas de la reina y el macho (huevos fertilizados). Se indican los grados de parentesco entre los miembros de la familia (flechas continuas) y los cruces entre ellos (líneas continuas) (Tomado de Fernandez, 1999).

El parentesco entre los individuos de una colonia indica la probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo de un gen, heredado de un antecesor común. El coeficiente de parentesco se calcula mediante la siguiente fórmula y se representa con la letra *b*.

$$b = \frac{1}{2} P_a + \frac{1}{2} P_b$$

Donde  $P_a$  y  $P_b$  representan cada una de las probabilidades de que un determinado alelo sea heredado por parte del antecesor por vía materna (a) y paterna (b). En

base a esta fórmula y en las proporciones de parentesco mostradas en la tabla 2, se puede inferir los grados de parentesco entre cada miembro de la colonia.

**Tabla 2.** Coeficiente de parentesco por árbol genealógico (*b*) en un sistema haplodiploide. Se indican los valores de *b* de un macho y de una hembra con los miembros de su familia (Tomado de Fernandez, 1999).

X	Y								
	Madre	Padre	Hija	Hijo	Hermana	Hermano	Tía	Sobrino	Sobrino
Sistema haplodiploide									
♀	1/2	1	1/2	1	3/4	1/2	3/8	3/8	3/4
♂	1/2	0	1/2	0	1/4	1/2	3/8	1/8	1/4
Sistema diploide									
♂ - ♀	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/4	1/4	1/4

### Hormigas del género *Philidris* (Himenóptera: Formicidae) características y distribución.

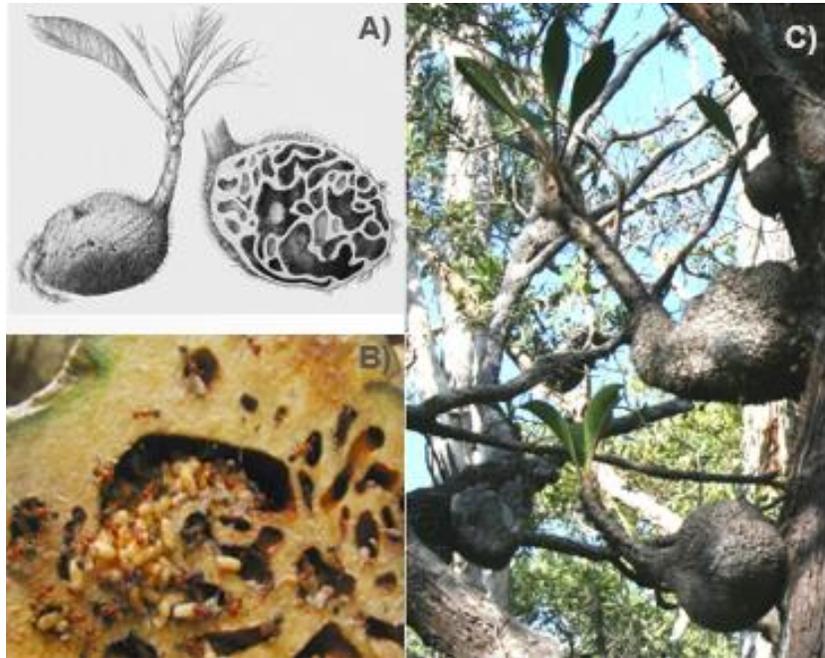
Las hormigas del género *Philidris* pertenecen a la subfamilia Dolichoderinae, donde se incluyen 7 especies y 7 subespecies o variedades (Figura 5). Son hormigas de tamaño pequeño y morfologías distintas dependiendo de la casta, son muy agresivas y territoriales. Este género de hormigas habita en regiones tropicales (Zhou & Zheng, 1977), su distribución se restringe a la Región Oriental y la Región Indo-Australiana (principalmente en Nueva Guinea, Islas Salomón y Fiyi) (Figura 5). Esta región forma parte del Archipiélago Malayo que comprende más de 20,000 islas incluyendo Nueva Guinea e Islas Salomón, el cual está situado entre la parte continental del sudeste de Asia y Australia, entre los océanos Índico y Pacífico, (Lomand *et al.*, 2011). Debido a que estas regiones se caracterizan por tener una amplia diversidad de especies animales y vegetales, así como endemismos; ha sido una región característica para diferentes estudios, ya sea de genética poblacional, biogeografía, e interacción entre organismos.

Una forma peculiar de interacción entre especies estudiadas en esta región se da en el género *Philidris*; este género de hormigas mantiene una relación de tipo mutualista (donde ambos participantes se benefician) con unas plantas epifitas (que

crecen en los troncos y ramas de los arboles) de los géneros *Hydnophytum* y *Myrmecodia* (Figura 6). Este tipo de relación planta-hormiga es muy común en plantas mirmecofíticas, donde la planta le proporciona refugio, cámara de cría y alimento a la hormiga, y a cambio, la hormiga le proporciona nutrientes y defensa contra depredadores herbívoros (Maeyama & Matsumoto, 2000).



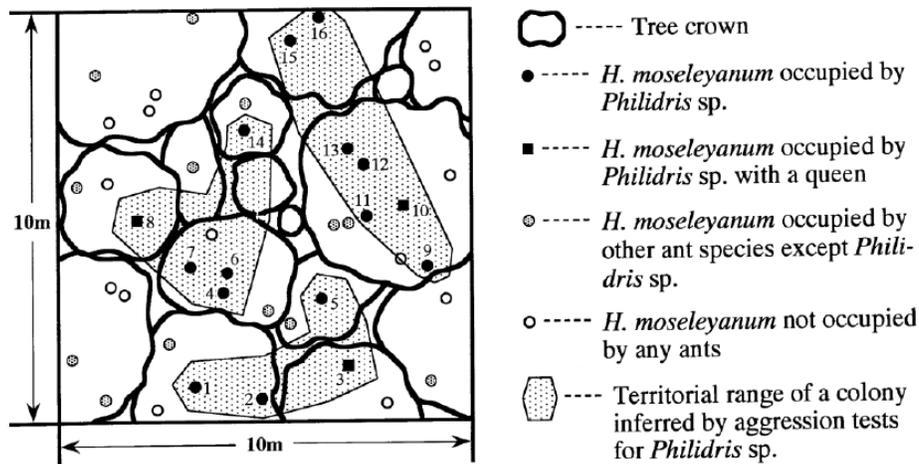
**Figura 5.** Hormiga del género *Philidris*. A) Vista al estereoscopio, B) hormigas obreras, C) Mapa de distribución de hormigas del género *Philidris* la cual se restringe a la región Indo- Australiana marcado en color rosa (Tomado de [www.antwiki.org](http://www.antwiki.org)).



**Figura 6.** Plantas del género *Myrmecodia*. A) Estructura de la planta. B) Colonia de hormigas *Philidris* viviendo dentro de la planta. C) *Myrmecodia* en el tronco y ramas de un árbol en el bosque de Papúa Nueva Guinea.

Como ya se mencionó anteriormente, estas colonias de hormigas viven dentro de las cavidades de la planta epífita del género *Myrmecodia*, ocupando una o más plantas por colonia, teniendo una estructura de la colonia de tipo monoginia o poliginia. En estudios realizados por Maeyama y Matsumoto (2000) sobre el sistema colonial que presentan las hormigas *Philidris* en un manglar de Papúa Nueva Guinea, en base a test de agresividad entre miembros de la casta obrera pertenecientes a una y varias colonias distribuidas en diferentes sitios dentro del área de estudio, se observó que estas hormigas tienen un alto nivel de agresividad y que miembros de la misma colonia no se atacan, caso contrario, los miembros de diferentes colonias son altamente agresivos unos para otros (Maeyama & Matsumoto, 2000). En este estudio se llegó a la conclusión de que obreras que habitaban distintos nidos, pertenecen a la misma colonia conformada por una sola reina; esto independientemente de que los nidos se encuentren en el mismo árbol o no, teniendo así una estructura colonial de tipo polidomia (Una serie de nidos conectados, pertenecientes a la misma colonia) y monoginia (manteniendo una

reina por colonia), lo cual revela que estas colonias tienen un patrón de distribución en mosaico (Figura 7).



**Figura 7.** Distribución horizontal de *Hydrophytum moseleyanum* ocupada por nidos de *Philidris* sp. en un manglar de Papúa Nueva Guinea. Todos las plantas/ nidos están enumerados (Tomado de Maeyama & Matsumoto, 2000).

### Poliginia en especies de hormigas arbóreas.

Muchas plantas mirmecofíticas mantienen una relación con hormigas en la que las hormigas establecen sus colonias dentro de las cavidades de las plantas, ya sea en las ramas huecas, espinas, tallos hinchados, etc. Se estima que aproximadamente 40 géneros de hormigas y 100 géneros de angiospermas están involucradas en una asociación de tipo mutualista (Davidson & McKey, 1993).

La relación planta-hormiga está conformada por una estructura colonial que difiere según la especie de hormigas que habite la planta. Por ejemplo, algunas colonias de hormigas de Mesoamérica (*Pseudomyrmex veneficus*) que habita una especie de acacia, es poliginia (más de una reina por colonia) y polidomia, siendo estas colonias muy abundantes y ocupando cientos de acacias (Janzen, 1975).

Este tipo de estructura también está reportada en Asia, donde colonias de hormigas del género *Crematogaster* ocupan plantas de la especie *Macaranga triloba* (Feldhaar et al., 2000) y en África, siendo *Leonardoca africana* – *Petalomyrmex*

*phylax* las involucradas en este tipo de relación y manteniendo una estructura de tipo poliginia. Generalmente las colonias poliginias son también polidomia (ocupando múltiples nidos) (Debout *et al.*, 2007). Un ejemplo de hormigas poliginias y polidomias es la especie *Formica yessensis* en Hokkaido, las cuales llegan a formar supercolonias con hasta 45,000 nidos, 1, 080,000 reinas y más de 306 millones de obreras (Higashi & Yamauchi, 1979). Más recientemente, en un estudio realizado por Kautz *et al.*, (2009) donde se estudió la poliginia y polidomia de *Pseudomyrmex pepeñi*, se realizaron ensayos de agresividad entre miembros de la casta obrera, determinándose que estas especies de hormigas establecen supercolonias poliginias, que pueden habitar grandes grupos de árboles hospederos. Con la ayuda de una herramienta muy útil para determinar las relaciones de parentesco entre miembros de diferentes castas, como son los microsatélites (SSR o STR), se analizaron reinas, obreras, machos y reinas vírgenes de dos súper colonias, y fueron observados un máximo de tres alelos por locus, en ocho marcadores polimórficos, dentro de una colonia, determinando así la relación cercana que existe entre miembros de distintos nidos pertenecientes a una de las supercolonias (Kautz *et al.*, 2009).

En el presente trabajo se pretende evaluar cómo se encuentra constituida la estructura social del complejo *Hydnophytum-Philidris* (planta-hormiga, por lo tanto se han planteado las siguientes preguntas: 1) ¿Todas las plantas/nidos que se encuentran en los diferentes sitios de muestreo están relacionados entre sí?, es decir, si forman parte de la misma colonia; 2) ¿Cuál es la estructura social de la colonia? Si los nidos pertenecen a una o varias colonias (Monodomia o polidomia) y si estas colonias están encabezadas por una o varias reinas (monoginia o poliginia); 3) ¿Existe un patrón de distribución de las colonias de *Philidris* dentro del sitio de estudio?

### **III) Objetivo general:**

Analizar la estructura social de hormigas de la especie *Philidris myrmecodiae* que habitan plantas hospederas del genero *Myrmecodia sp.* en localidades de la región Indo-Australiana y contribuir a la reconstrucción de su historia filogenética y filogeográfica.

### **IV) Objetivos específicos**

1. A partir de marcadores genéticos nucleares y mitocondriales, reconstruir la historia filogenética y filogeográfica de hormigas del género *Philidris* de la región Indo-Australiana, integrando datos modernos y de museo.
2. En base a marcadores microsatélites (STRs), inferir sobre la estructura social de la colonia y estructura poblacional que presentan las hormigas de la especie *Philidris myrmecodiae* que ocupan distintas plantas hospederas en el bosque de la localidad Yawan, PNG.

## V) Hipótesis

Los nidos- plantas que se encuentran en el mismo árbol, forman parte de una misma colonia de hormigas de la especie *P. myrmecodiae*, teniendo una estructura de tipo polidomia.

## V) Métodos

### Área de estudio.

*Colecta de especímenes modernos en diferentes sitios de la Región Indo-Australiana.*

La región Indo-Australiana es una región que se extiende desde la frontera de Indonesia, abarcando el océano Índico, Australia, Islas Salomón, Fiyi, Melanesia y extendiéndose hasta Nueva Zelanda (Lohman *et al.*, 2011). Las muestras fueron colectadas entre el 2005 y el 2013 en 13 localidades, abarcando desde Borneo hasta el norte de Australia y Fiyi (Figura 8). Se colectaron plantas epifitas del género *Myrmecodia* en las cuales viven las hormigas, para cada colonia se colectaron alrededor de 5-15 individuos de la casta obrera y estos fueron preservados en etanol absoluto. Las muestras fueron colectadas en la vegetación del bosque, algunas en el suelo y otras en las plantas epifitas. Solo una porción de colonias fueron colectadas en plantas mirmecofíticas y una gran parte de las muestras se encontraron en troncos y hojas en el suelo. En total, se reunió 150 muestras, de las cuales se hizo una identificación preliminar hasta morfoespecies y la identificación de especies fue conformada en base a secuencias de COI. En total se tienen 15 especies del género *Philidris* y algunas especies como grupos externos de los géneros *Anonychomyrma*, *Iridomyrmex*, *Ochetellus*, *Linepithema* y *Papyrius* para este análisis.



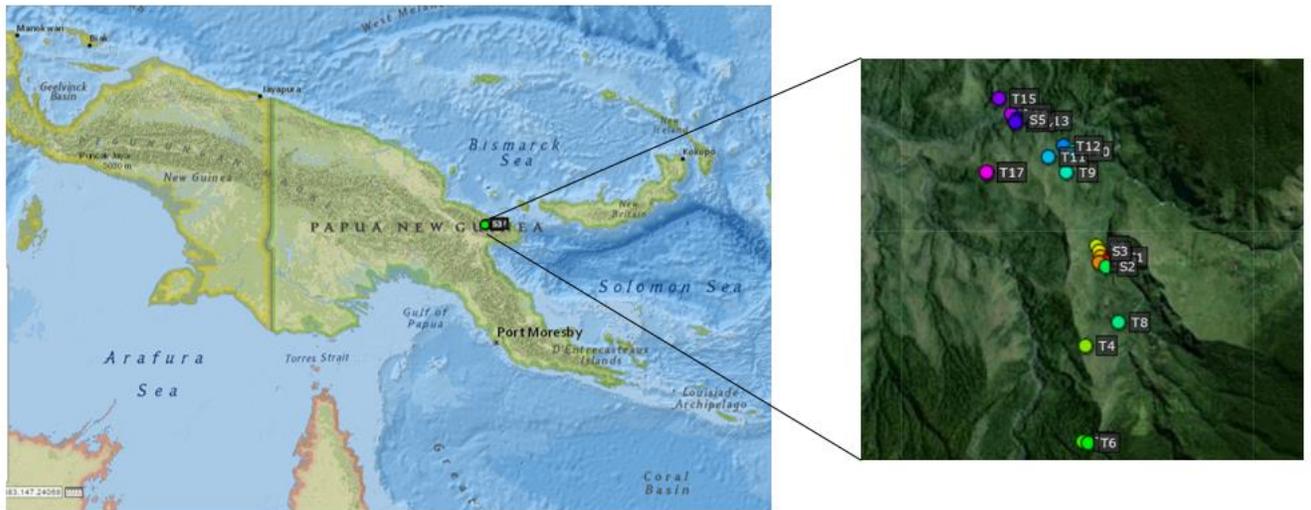
**Figura 8.** Sitios de muestreo en la región Indo-Australiana.

*Philidris myrmecodiae* de la localidad de Yawan, Nueva Guinea.

Las muestras fueron colectadas en la localidad de Yawan en la provincia Morobe en NG (con una latitud de  $6^{\circ} 08' 00''$  S y una longitud de  $146^{\circ} 52' 00''$  E) recordando que estas hormigas viven en plantas hospederas que habitan los árboles del bosque, se colectaron plantas en diferentes árboles en diferentes sitios de muestreo (Figura 9).

Estas especies son morfológicamente similares a las especies de las Islas Sólomon, pero con algunas características que las hacen distintas como la presencia de pelo en el cuerpo y tamaño de la cabeza. Las especies de la Islas Salomón fueron clasificadas como *Philidris myrmecodiae nigriventris* (Donisthorpe, 1941).

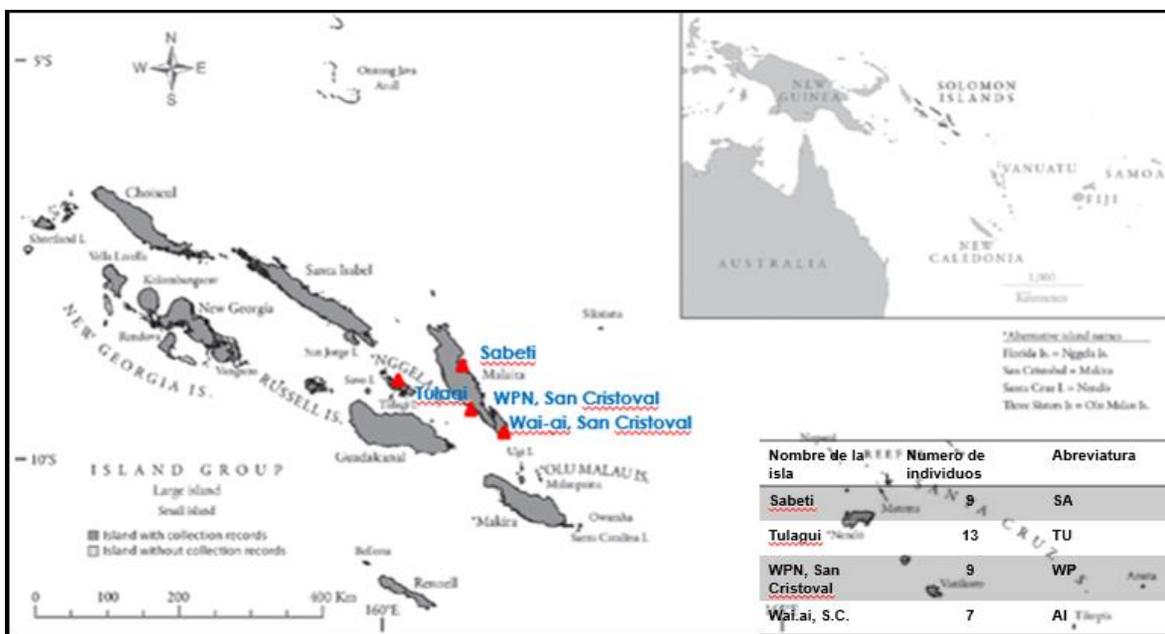
En el mapa se muestran el número de árboles en diferentes puntos de muestreo, en los cuales se encuentran las plantas hospederas del género *Myrmecodia* las cuales albergan interior hormigas de la especie *Philidris myrmecodiae*. Las coordenadas y más detalles de los sitios de muestreo se encuentran en el apéndice 1.



**Figura 9.** Mapa donde se muestran los diferentes sitios de sitio de colecta en la localidad de Yawan, PNG. En el mapa de la derecha se muestra en un gradiente de colores el numero de árboles donde se realizo la colecta de las plantas hospederas.

*Obtención de las muestras de museo en la localidad de las Islas Salomón.*

Las muestras de museo fueron colectadas en las Islas Salomón las cuales están conformadas por un conjunto de islas que se encuentran en la región de Melanesia al noroeste de Australia en el año de 1913 por el Dr. William W. Mann, las cuales fueron preservadas en etanol y almacenadas en el Museo de Historia Natural Smithsonian, Washington, DC, EE.UU. Afortunadamente se tuvo acceso a muestras de la especie *Philidris myrmecodiae nigriventris* de 4 localidades de las Islas Salomón, teniendo así un total de 4 colonias, una colonia por localidad con más de 5 individuos por colonia (Figura 10).



**Figura 10.** Islas Salomón. Se muestra en color rojo los sitios de muestreo y nombre de cada una de las islas donde se colectaron las muestras de museo en el año de 1913, en la tabla a la derecha se muestra el número de individuos que se tiene por localidad y la abreviatura del nombre de las islas.

## Trabajo en el laboratorio

### Extracción de ADN de muestras modernas

La extracción de DNA de hormigas se llevó a cabo mediante un protocolo de microextracción para insectos. Protocolo tomado de Cheung *et al.*, (1993) y modificado por Tafoya A. y Zamudio H. (2013). Este método consiste en preparar un *buffer* de extracción de ADN de un individuo de la casta obrera, en el cual se utilizaron reactivos tales como la Proteínasa K, la cual permite la separación del ADN de las proteínas involucradas en el tejido de la hormiga. Más detalles de reactivos utilizados en el *buffer* se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Reactivos para preparar *buffer* de extracción.

<i>Buffer de extracción:</i>	<i>Otros reactivos</i>
200 Mm Tris-HCL PH 8.0	Sarcosyl 5%
70 mM EDTA	Acetato de Amonio 10 M
2 M NaCl	TE (10mM Tris-HCl pH8 1mM de EDTA)
20 mM metabisulfito de sodio	Agua destilada estéril

El procedimiento para la extracción se llevó a cabo de la siguiente manera: primeramente se tomó una hormiga del conjunto (el tamaño del individuo puede variar, dependiendo de la especie y de la casta), a continuación se procedió a secar la muestra, asegurándose de que el tejido estuviese perfectamente libre de etanol (puede secarse con una sanita o papel absorbente estéril). También es recomendable mantener las hormigas a temperatura ambiente sobre el papel por un mínimo de 30 minutos para permitir que se evapore el etanol, posteriormente se colocó la hormiga en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. y se agregó 160 µl de *buffer* de extracción. Para triturar el tejido se pueden utilizar métodos físicos como pistilo de plástico, el cual puede introducirse en un tubo Eppendorf o fuerzas mecánicas eléctricas como el TissueLyser. En este caso se utilizó un pistilo de plástico perfectamente estéril. Se adicionó 40µl de Sarcosil 5% y se incubó a 60 °C por 1

hora en agitación para llevar a cabo la lisis de las células. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a centrifugar la muestra durante 15 minutos a 16,000 rpm, posteriormente se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, teniendo cuidado de no traer restos de tejido. Para precipitar el ADN se agregó 90  $\mu$ l de acetato de amonio 10 M + 200  $\mu$ l de Isopropanol y se almacenó a 20°C por un mínimo de 2 a 4 horas y preferentemente toda la noche. Transcurrido este tiempo se procedió a centrifugar la muestra durante 15 minutos a 16,000 rpm y se decantó el sobrenadante; para el lavado de la pastilla se utilizó etanol al 70% (500  $\mu$ l) y se centrifugó durante 15 minutos a 16,000 rpm y se decantó el sobrenadante, repitiendo este procedimiento de lavado dos veces para obtener un mejor lavado de la pastilla.

Para eliminar el etanol presente en las muestras se mantuvieron los tubos abiertos a temperatura ambiente por un mínimo de 1 hora o hasta que se haya evaporado el etanol por completo. Por último se resuspendió la pastilla en 30  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C, para su posterior utilización.

*Amplificación de fragmentos específicos para genes nucleares (EF1, EF2 y CAD) y mitocondrial (COI) para muestras modernas.*

La amplificación de las regiones de ADN fueron obtenidas usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual consiste en amplificar regiones específicas del ADN por medio de un par de oligonucleótidos (*primers forward* y *reverse*) y reacciones enzimáticas en diferentes condiciones y ciclos térmicos. Se utilizaron los *primers* LCO\_T7 y HCO\_T3, para el gen mitocondrial, añadiéndole las colas de T3 y T7 (Folmer *et al.*, 1994). Los genes nucleares que se usaron fueron Ef1- $\alpha$ F1; Ef1- $\alpha$ F2 y CAD (Bacci *et al.* 2009) (para más detalles de oligos ver apéndice 2) Estos genes fueron amplificados usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual se realizó en un volumen de 25  $\mu$ l, en una mezcla que contenía 3.25  $\mu$ l de 10x PCR buffer KAPA *Taq* (que contiene MgCl<sub>2</sub> a 50 mM), 0.5  $\mu$ l de dNTPs 10mM, 0.63  $\mu$ l de cada oligo (*forward* y *reverse* a una concentración inicial de 10mM para cada juego de oligos), 0.5  $\mu$ l de KAPA *taq* polimerasa, disponible en el paquete comercial KAPA *taq* PCR kit además se adicionó 1  $\mu$ l de DMSO y 2  $\mu$ l de ADN

genómico, completando la reacción con 17.49 µl de agua libre de nucleasas. Las concentraciones y condiciones de la reacción de PCR fueron estandarizadas anteriormente en el Laboratorio de Genómica Ecológica y Evolutiva por Tafoya A. Yuliza y Zamudio H. Flor en el año 2013 (datos no publicados). Las temperaturas y ciclos utilizados fueron: para inicio de desnaturalización de 5 min a 95°C (x1); desnaturalización de 30 s a 94°C, alineamiento 30s a 45°C (55° para los genes EF1, EF2 y CAD), extensión de 90 s a 72°C (x35); y extensión final de 10 min a 72°C (x1). Los fragmentos esperados fueron purificados, cuantificados y secuenciados por el método de Sanger en Macrogen, Corea.

### **Extracción de ADN de muestras de museo.**

#### *Laboratorio de ADN antiguo.*

Para realizar la extracción de ADN de museo, se debe tener en cuenta una serie de precauciones, para asegurar la calidad de los datos obtenidos, los cuales se mencionan a continuación:

1. Aislamiento en las áreas de trabajo. Separar las muestras de museo de las muestras modernas. Es necesario tener un laboratorio de ADN antiguo, en el cual se realiza la preparación de soluciones para extracción de ADN y preparación de reacción de PCR en un área separada de la extracción de ADN.

En cada una de estas áreas se tienen medidas de precaución como el uso de presión positiva donde el aire del laboratorio es de una presión ligeramente mayor a la del exterior, evitando la entrada de aire del exterior, además de que el aire es irradiado con lámparas de luz UV-C eliminando de esta manera moléculas contaminantes y posteriormente ultrafiltrado (filtros HEPA). Las áreas de extracción y soluciones son limpiadas con etanol antes y después de su uso. Este laboratorio debe de estar en otra área separado del laboratorio para uso cotidiano.

2. Acceso al cuarto de aDNA. El laboratorio cuenta con una área gris, en la cual el usuario se debe preparar para ingresar, usando cofia, guantes, botas

quirúrgicas y cubre bocas, para poder entrar al área de vestidores del área de extracción y área de soluciones, en las cuales se debe colocar un traje para cada área.

3. Uso de controles negativos tanto en la extracción como para la reacción de PCR. El objetivo es buscar posibles contaminantes que pudieron haber sido introducidos en algún paso de la extracción de ADN o en la preparación de amplificación. La cual consiste en añadir uno o más tubos añadiendo agua en lugar de muestra y realizando el mismo procedimiento de extracción de ADN y PCR. De esta manera se puede detectar si alguno de los reactivos que se están utilizando está contaminado.

#### *Extracción de ADN mediante un método no destructivo*

El protocolo de extracción de ADN para las muestras de museo fue tomado y modificado de Gilbert *et al.*, (2007). El primer paso para realizar la extracción fue preparar un *buffer* de digestión, los reactivos y el volumen se describen en el apéndice 3.

El *buffer* fue modificado a partir de Pfeiffer *et al.* (2004) y consiste en CaCl<sub>2</sub> 3 mM, Dodecil sulfato de sodio 2 % (SDS), Ditiotreitól 40 mM (DTT), Proteinasas K 250 mg/ml, Buffer Tris 100 mM pH 8 y NaCl 100 mM (concentraciones finales).

La extracción se realiza en dos días de trabajo, como se describe a continuación: Para el día 1. Se coloca un individuo en un tubo de 2 ml Eppendorf Biopur totalmente sumergido en buffer de digestión (300µl) el volumen total de la reacción fue de 0.5-0.7 ml), y se incubó durante la noche (16-20 h) a 55°C en un agitador termomixer compact (Eppendorf) a 350 rpm. Para el día 2 se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, después se colectó la fase acuosa (la superior en este caso) ubicándola en un tubo nuevo y se agregaron 300 µl de fenol. Se agitó a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos. Se colectó la fase acuosa (superior). Repitiendo este último paso para obtener mejores resultados. Posteriormente se agregó un volumen de cloroformo (300µl), agitando a temperatura ambiente por 5

minutos y se centrifugó a 13,000 RMP por 5 minutos y se colectó la fase acuosa superior ubicándola en un tubo nuevo. Para finalizar con la extracción se transfirió el sobrenadante a un tubo Amicon Ultra-4® 30K (Millipore) y se llevó a 3.5 ml. Se centrifugó a 7000 g por 20 min, desechando el líquido residual y se añadieron 3.5 ml de agua milli-Q estéril al Amicon. Se centrifugó por 15 minutos a 7000 g desechando el líquido residual y se añadieron 3.5 ml de agua y se centrifugó por 6 min a 7000 g, revisando cada 2 min. hasta que llegó a un volumen de 2 ml. Por último se concentró a 250 µl y se pasó a un microtubo nuevo *Multi Low-binding* (BioLab) de un volumen de 2 ml. y se almacenó a -20°C para su posterior utilización. Para obtener una referencia de la extracción de ADN de las muestras de museo se implementó un segundo protocolo de extracción de ADN (desarrollado en el laboratorio de *Institute of Entomology* de la Republica Checa y modificado en el Laboratorio de ADN antiguo del Langebio, 2015), el cual consiste en retirar la hormiga del etanol y dejarla secar dentro de un tubo Eppendorf, hasta que se evaporen los residuos de etanol, posteriormente se preparó un *buffer* de extracción (H<sub>2</sub>O 17.7 µl, 10X PCR *Buffer* 2µl, Tris-HCL 750 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200mM y MgCl<sub>2</sub> 25 mM), al que se añadieron 0.4 µl de Tween 20 1% y 1 µl de Proteinasa K (20 mg/µl). Una vez preparado este buffer de extracción se le agregan 20 µl a la muestra libre de etanol, recordando que la muestra no debe ser manipulada (en caso de tener muestras de mayor tamaño se puede pinchar la cabeza, tórax o abdomen con ayuda de una aguja estéril, lo que ayudará a que el buffer entre por los orificios del insecto además de boca, ano y espiráculos). Para que el tejido de la hormiga sea más flexible, se colocó al insecto con el *buffer* a -20°C durante por lo menos 20 minutos, inmediatamente se colocó a 65°C por un lapso de 12 horas, seguido de 10 minutos a 90°C y se colocó en hielo. Posteriormente se centrifugó por dos minutos a 11600 rpm y se tomó el sobrenadante en un tubo nuevo y se almacenó a -4°C. El insecto se retiró del tubo una vez terminada la extracción y se enjuagó en etanol absoluto para poder ser regresado a la colección.

### *Amplificación del gen COI.*

Para la amplificación de una región de la subunidad 1 del gen mitocondrial citocromo oxidasa (COI), se diseñaron primers para fragmentos cortos para una mejor amplificación, debido a que el ADN de estas muestras se encuentra fragmentado. Los *primers* que se utilizaron para amplificar una un parte del gen mitocondrial COI son los siguientes: LCO-44R; LCO-84R; 116-190R (para más información de oligos ver apéndice 4). Para cada juego de *primers* se estandarizaron las temperaturas para PCR, las cuales fueron probadas en ADN de muestras frescas (hormigas colectadas del jardín). Las temperaturas de desnaturalización para cada juego de *primers* son los siguientes: LCO-44R (47.2°C), LCO1490-88R (57.1°C), 116-1190 (55.1°C).

Para la reacción de PCR se utilizó la *Taq* polimerasa BIOLINE y se utilizó la siguiente reacción de PCR: 3 µl de 10x Buffer, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, 0.6 µl de dNTPs 25mM, 0.48 µl de oligos 0.3µM, 0.12 µl de *Taq* Polimerasa 5U/µl, 2 µl de ADN, llevando la reacción a 25 µl con agua libre de nucleasas. Usando las siguientes condiciones de amplificación: para inicio de desnaturalización de 5 min a 95°C (x1); desnaturalización de 30 s a 94°C, alineamiento 30s a una temperatura adecuada para cada oligo descrita anteriormente, extensión de 90 s a 72°C (x35); extensión final de 5 min a 72°C (x1). El tamaño esperado para cada fragmento se observó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% (*buffer* TAE 1X) y utilizando como *buffer* de carga 6X Orange DNA Loading Dye, marcador fluorescente Gel Red y un marcador de peso molecular *HyperLadder* 50bp (Bioline).

### *Clonación de amplicones.*

Los fragmentos del tamaño esperado se clonaron en el vector de clonación pJET 1.2, utilizando el kit CloneJET PCR Cloning (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante. La transformación se llevó a cabo en células competentes TOP10 de *Escherichia coli* utilizando choque térmico. Las bacterias recombinantes se obtuvieron por selección positiva en un medio solido Luria Bertani (LB), el cual contiene ampicilina (100mg/mL), ya que este vector presenta el gen letal *eco47IR* y

solo fueron seleccionadas aquellas colonias que crecieron en el medio sólido. La presencia de fragmentos esperados fue confirmada por PCR de las colonias seleccionadas y utilizando los cebadores dirigidos a las regiones flanqueantes del sitio de clonación múltiple del vector (pJET 1.2 5'-CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC-3' Y Pjet 5'-AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG-3'). Los fragmentos esperados fueron observados por electroforesis, se purificaron con el kit GeneAll (Fermentas), se cuantificaron en un NanoDrop y se mandaron secuenciar por el método de Sanger en el Laboratorio de Servicios Genómicos, Langebio.

### **Amplificación de microsatélites**

Para la amplificación de secuencias simples repetidas (SSRs por sus siglas en inglés), se utilizaron *primers* para amplificación de microsatélites universales para hormigas con motivos repetidos dinucleótidos previamente diseñados y probados en otros estudios por Butler *et al.*, 2014, en varias subfamilias de hormigas, incluyendo *Dolichoderinae* a la cual pertenece el género *Pholidris* (para más detalles sobre los microsatélites ver apéndice 5).

Tomado de la referencia se probaron 20 loci. Primeramente se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos con una reacción de PCR para un total de 68 muestras con individuos diferentes pertenecientes a 69 plantas distribuidas en 21 árboles de los cuales se llevó a cabo la amplificación de microsatélites en 6 placas de 96 pozos. El procedimiento se llevó a cabo en un termociclador (BIORAD) utilizando placas para tiempo real; se utilizó una mezcla de buffer de reacción de 10 µl (4 µl de MasterMix Qiagen Multiplex PCR el cual contiene una mezcla de fluoróforos para el marcaje de los fragmentos: VIC, FAM, PET, NED), 2 µL de mix de primers 10mM. (4 sets), 1 µl de Q-solution, 1 µl de agua para PCR y 2 µl de DNA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: temperaturas de desnaturalización 95° C por 15 m, 94°C por 30 s, alineamiento 50°C por 90 s, extensión 72°C por 60s por 35 ciclos y una extensión final 72°C 30 m (Butler *et al.*, 2014). Para la visualización de los fragmentos de PCR se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa 1.5 % (buffer TAE 1X), utilizando 2µl de buffer de carga 6X Orange G adicionando GelRed, y 4 µl de reacción de PCR. Se utilizó el marcador

de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Genómica Ecológica y Evolutiva del LANGEBIO. Para el análisis de los fragmentos se enviaron las placas a la compañía Macrogen en Corea, donde se utilizó una matriz LIZ500 y se corrió en un secuenciador de ADN, de los cuales se obtuvieron los resultados en formato electrónico.

## **Análisis y procesamiento de datos**

*Análisis de datos filogenéticos de especies del género Philidris de la región Indo-Australiana.*

Las secuencias obtenidas de los genes mitocondrial y nucleares fueron ensambladas y editadas en los programas informáticos Geneious v. 6.1 ([www.Geneious.com](http://www.Geneious.com); Kaerse *et al.*, 2012) y Bioedit (Hall, 1999). El alineamiento de secuencias se hizo en el programa MAFFT v.7 (Kato *et al.*, 2002).

Se llevó a cabo la reconstrucción del árbol filogenético para las muestras modernas de especies del género *Philidris*; se utilizaron un total de 60 secuencias de individuos pertenecientes a diferentes localidades de la Región Indo-Australiana. Como grupos externos se utilizaron 17 secuencias de otros géneros de hormigas (incluyendo linajes hermanos *Anonychomyrma*, *Iridomyrmex*, *Ochetellus*) incluyendo la localidad de las Islas Salomón. La filogenia fue construida combinando los genes mitocondrial (COI) y nucleares (Ef1- $\alpha$ F1; Ef1- $\alpha$ F2; CAD), y mediante el programa RAxML v. 7.2.8 (Randomized Accelerated Maximum Likelihood, Stamatakis, 2014) usando matrices concatenadas. Se hizo una búsqueda del mejor modelo de sustitución nucleotídica, siendo el mejor modelo GTR+G con seis categorías de sustitución, usando un “bootstrap” de 1000 repeticiones.

Comparación de secuencias modernas y de museo de la especie *P. myrmecodiae nigriventris* de la localidad de las Islas Salomón.

Para la reconstrucción del árbol para muestras de museo, se usaron secuencias de fragmentos cortos del gel COI pertenecientes a 13 individuos de la especie *P. myrmecodiae nigriventris* de sitios de muestreo de la localidad de Las Islas

Salomón. Para cada fragmento se obtuvieron secuencias de más de tres clonas, las cuales fueron editadas en el programa Geneious v. 6.1 (Kaerse *et al.*, 2012) y obtuvo una secuencia consenso para cada individuo. Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de todos los individuos en el programa MEGA v. 6 por el método de MUSCLE empleando como secuencia de referencia un individuo moderno del mismo sitio de muestreo y así buscar posibles SNP. Finalmente se hizo la reconstrucción de una filogenia con el método de máxima verosimilitud (ML) con el modelo de Kimura (1980) usando el programa informático MEGA v. 6 (Kumar *et al.*, 2008), empleando como referencia una secuencia del individuo moderno de la misma especie.

### **Análisis de estructura poblacional y estructura social.**

#### *Genotipificación de microsatélites*

Para el análisis de los electroferogramas, resultado de la amplificación de secuencias microsatélites se tuvo la ayuda de Jan Zima del Instituto de Entomología de la República Checa, donde se utilizó el programa GeneMapper (Applied Biosystems) para detectar una señal de fluorescencia representada como un pico de lectura que corresponde a un alelo y cuyo tamaño es determinado por el programa con base en un marcador de peso molecular. Así se determinó a qué locus pertenece cada color y el rango de tamaño en el que se encuentra. También se pueden obtener datos de homocigocidad y heterocigocidad para los loci encontrados, ya que en el marco de lectura de los picos, cuando se encuentran dos picos a un mismo tamaño, esto significa que hay un locus portador de dos alelos. Los valores obtenidos en este programa se encuentran en decimales, por lo que fue necesario redondear este número utilizando siempre el mismo criterio para todos los locus encontrados. Las estimaciones de los datos fueron registrados en una base de datos en Excel (Sirven *et al.*, 2011).

Después se procedió a hacer el análisis estadístico y computacional de las muestras clasificándolas en: i) nidos/plantas con más de 5 obreras ii) individuos por nido/planta (datos en el apéndice 1).

### *Variación genética y equilibrio de Hardy- Weinberg*

Para estos análisis se utilizaron los datos del número total de individuos por nido-planta, calculando el número promedio de alelos de los 16 loci polimórficos por población para la localidad de Yawan, así como la riqueza de alelos privados en el programa GenAlEx v. 6.5. (Peakall & Smouse, 2012). Además se calculó la heterocigocidad esperada ( $H_E$ ) y observada ( $H_O$ ) para cada población combinando todos los loci. También se calculó  $F$ , un estimador de la  $F_{IS}$  (endogamia dentro de las poblaciones) (Weir & Cockerham, 1984) la cual determina si hay exceso de heterocigotos dentro de las poblaciones en relación con lo que se espera si la población estuviese en equilibrio de Hardy-Weinberg. El cálculo de  $F_{IS}$  puede adquirir valores entre -1 y 1, donde los valores que sean mayor a cero indican diferencia de heterocigotos, mientras que los valores con valores menores a cero indican exceso de heterocigotos (Weir & Cockerham, 1984).

### *Estimaciones de diferenciación genética poblacional, estadísticos de $F$ de Wright ( $F_{ST}$ , $F_{IS}$ y $F_{IT}$ ).*

Es una manera propuesta por Wright (1951), de evaluar la diferenciación genética entre las diferentes poblaciones, que se estima mediante el análisis de las frecuencias alélicas. La  $F_{ST}$  mide el grado de diferenciación genética entre las poblaciones, la  $F_{IT}$  el coeficiente de endogamia y  $F_{IS}$  el coeficiente de coancestría. Los análisis se realizaron por locus y cada parámetro fue calculado con el programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) usando el método de *remuestreo* “bootstrap” con 999 replicaciones (valor permitido por el programa). Utilizando la matriz de distancias en base a los valores de  $F_{ST}$  del total de los 69 individuos agrupados en 21 grupos (árboles, incluidas las plantas individuales). La variación de los datos fueron analizados en tres niveles: entre poblaciones, entre individuos y dentro de los individuos. La visualización de los datos se hizo mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés) usando el total de árboles (21) para los diferentes nidos (plantas).

El segundo PCA se realizó mediante el coeficiente de parentesco entre los 69 individuos totales donde se utilizó la opción de Queller & Goodnight (1989). Los datos fueron comparados con los obtenidos en el programa COLONY para la estimación del parentesco entre individuos de diferentes nidos.

*Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y análisis de componentes principales (PCA).*

Este tipo de análisis se llevó a cabo para las distintas poblaciones de hormigas de los distintos puntos de muestreo dentro de la localidad de Yawan, PNG. Consiste en determinar la cantidad de variabilidad genética contenida dentro de subgrupos, dentro y entre ellos, por medio de un análisis jerarquizado con una matriz de distancias a partir de los estadísticos de F de Wright. Los cálculos se llevaron a cabo en el programa GenAlEx v. 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) con un total de 999 permutaciones (valor permitido por el programa).

*Análisis BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure).*

El software BAPS (<http://www.helsinki.fi/bsg/software/>) consta de una serie de análisis bayesianos que permite analizar las frecuencias alélicas representando todos los genotipos de las obreras de todos los nidos (plantas) para evaluar como los individuos de los nidos y arboles están agrupados dentro de grandes grupos genéticos. Se usaron frecuencias alélicas (16 loci) de 69 individuos de la casta obrera, de los cuales están distribuidos en 21 grupos (arboles), incluyendo nidos-plantas individuales, esto en la localidad de Yawan, PNG.

El programa considera las frecuencias de ambos haplotipos y variables al azar del número de grupos genéticamente divergidos y utiliza la optimización estocástica para inferir el modo de la distribución posterior. El análisis bayesiano de la estructura de la población se ejecutó con el número máximo de grupos (K) de 2-10 y cada corrida fue repetida cuatro veces para comprobar la congruencia entre cada corrida. El número de particiones se evaluó por Log (marginal Likelihood).

Se usaron dos posibles enfoques para la evaluación de la estructura genética: 1) análisis de agrupamiento por individuos con información espacial explícita que también permite hacer una asignación de los individuos dentro de grupos. 2) agrupación de los individuos de los cuales se conservan dentro de sus grupos (árbol) originales y por consiguiente un análisis mezclando todos los grupos (Admixture).

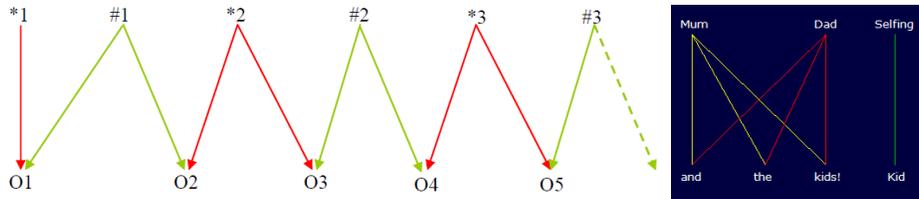
La segunda opción permite una mejor integración de la variabilidad genética a nivel individual de cada muestra.

### *Análisis estructura social*

Para determinar el pedigrí de los individuos analizados en este estudio, se utilizó el programa COLONY (Wang, 2004; Wang & Santure, 2009), el cual utiliza métodos estadísticos basados en reglas de herencia Mendeliana y métodos basados en máxima verosimilitud para inferir el parentesco entre individuos a partir de datos genéticos multilocus. Este programa puede ser usado para especies diploides y haploides, utilizando marcadores dominantes y codominantes, así como especies con sistema monogamia y poligamia (Jones & Wang, 2010). En este análisis se utilizaron datos de marcadores codominantes, para especies con un sistema haplodiploide, de tipo monogamia y poligamia, no se conoce el genotipo de los padres y solo se usaron individuos de la casta obrera.

El análisis de coeficiente de relación entre miembros del nido, fue complementado con el programa de computo *Pedigree viewer* desarrollado por Brian y Sandy Kinghorn, Universidad de New England, Australia (<http://www-personal.une.edu.au/~bkinghor/pedigree.htm>), el cual lee un archivo de datos generado por el programa y muestra la estructura del pedigrí en la pantalla a base de redes conectadas entre sí. Cada individuo es representado por una identidad (línea materna, línea paterna y crías) dependiendo del ID que se le haya asignado. Este programa también nos permitió calcular el número de machos que están relacionados con la reina y que contribuyen genéticamente a la descendencia (*Mate selection*). *Pedigree viewer* muestra una pantalla con una serie de redes, donde se

observa cada individuo de la colonia y sus posibles padres; mostrando en color rojo (\*) a los padres y en color amarillo (#) el número de reina y a las crías con el número de ID asignado anteriormente (Figura 11).



**Figura 11.** Ejemplo de diagrama de flechas del pedigrí que identifica a cada individuo en el programa *Pedigree viewer*. Donde diferencia por colores las líneas maternas en color verde y líneas paternas en color rojo.

El método que utiliza el programa *Pedigree Viewer* para el cálculo del coeficiente de parentesco, es el desarrollado por Wright (1922), citado por Lush (1969), siendo la fórmula:

$$F_x = 0.5^{n_1+n_2+1}(1 + F_A)$$

Donde,  $F_x$  = coeficiente de consanguinidad del individuo x.

$n_1$  = número de generaciones que va desde un padre al antecesor común.

$n_2$  = número de generaciones desde el otro padre al antecesor común.

$F_A$  = coeficiente de endogamia del antecesor A.

Los datos fueron analizados a partir del genotipo de la descendencia (*offspring* en inglés) los cuales son los individuos de la casta obrera. Debido a que el genotipo de la reina (Q) y del macho (M) no se conocen. Se determinó el parentesco entre obreras de los diferentes nidos (nidos únicamente con 5 o más obreras) pertenecientes a los árboles con ID 1, 2, 4 y 6. Primeramente se analizaron los árboles (1 y 6) que presentan más de un nido (planta hospedera) para ver si estos pertenecen a una misma colonia o si son colonias distintas en el mismo árbol. Después se hizo el mismo análisis para las plantas de los árboles 2 y 4, los cuales presentan solo un nido. Finalmente se hizo un análisis del pedigrí de los individuos

totales, abarcando todos los árboles y nidos (plantas) y observar cuáles nidos se comparten las mismas reinas.

## VI) Resultados

### **Relaciones filogenéticas de especies del género *Philidris* de la región Indo-Australiana.**

#### *Obtención del ADN para muestras modernas.*

Se obtuvo una amplificación exitosa de los genes nucleares y mitocondrial en 47 individuos de 13 sitios de muestreo. Los fragmentos esperados fueron: COI (650 pb); Ef1- $\alpha$ F1 (405 pb); Ef1- $\alpha$ F2 (569 pb); CAD (486pb).

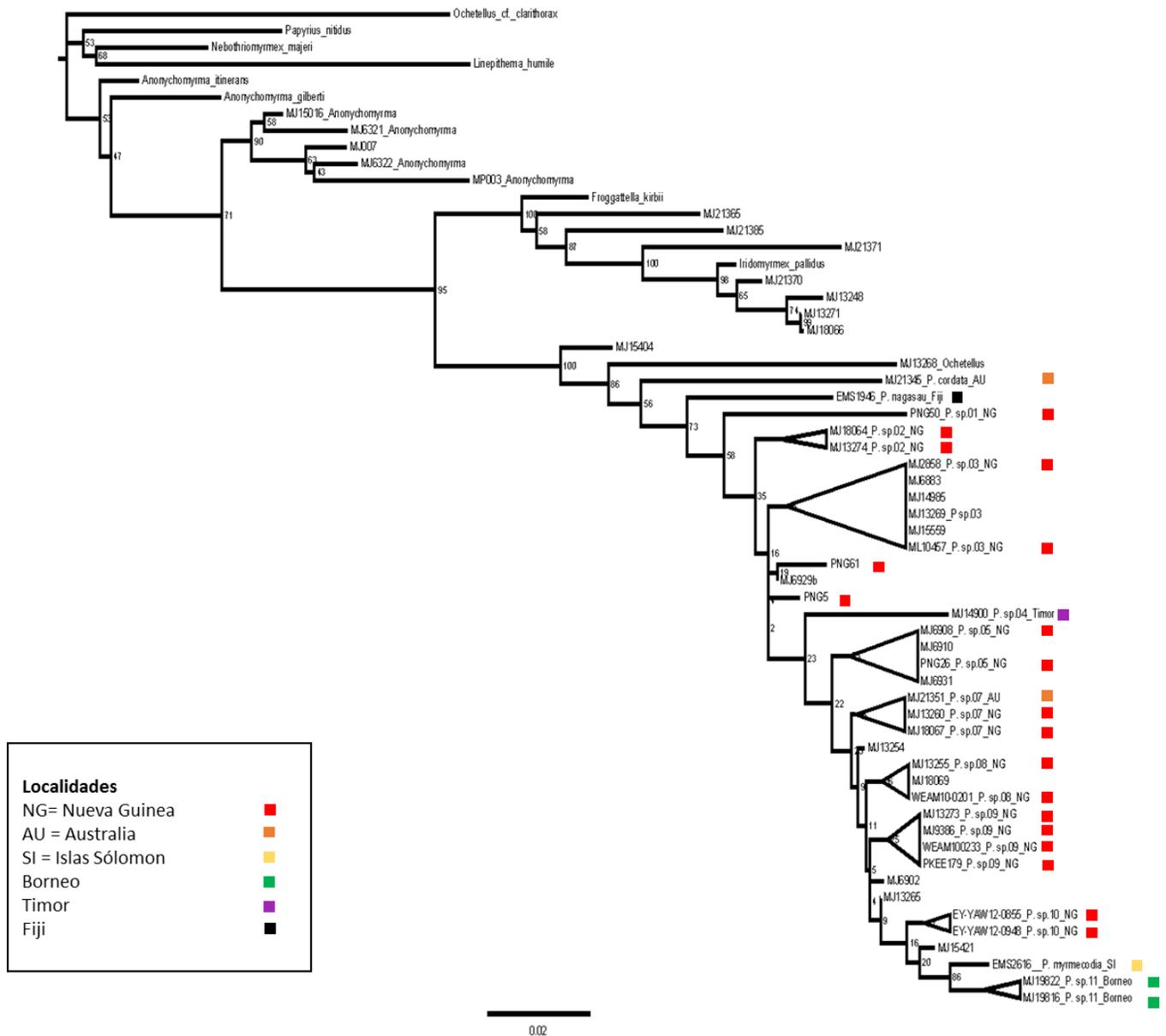
#### *Construcción de filogenia de especies del género *Philidris* de la región Indo-Australiana.*

Para el gen mitocondrial (COI) se obtuvieron un total de 650pb y combinando todos los genes nucleares (Ef1- $\alpha$ F1, Ef1- $\alpha$ F2, CAD) resultó una secuencia concatenada total de 1624 pb. Solo algunas ramas tuvieron soporte por bootstrap de más de 50, esto puede ser debido a la poca cantidad filogenéticamente informativa en los datos. Los porcentaje de identidad para los genes fueron de 83.7% para COI; 97.8% para Ef1- $\alpha$ F1; 97.7% para Ef1- $\alpha$ F2 y 97% para CAD.

La topología que resultó del análisis de ML al combinar los genes mostró que todas las especies pertenecientes a la localidad de NG (se incluyó a Papúa Nueva Guinea dentro de la localidad de NG) formaron linajes hermanos del linaje de Fiyi y que las especies de NG forman un grupo paráfiletico, que contiene también ancestros de las localidades de las especies de Timor e Islas Salomón.

La especie *Philidris* sp\_07 de la localidad de Australia fue la única que se agrupó dentro de las especies pertenecientes a Nueva Guinea. La especie de la localidad de Timor, se agrupó de manera independiente pero cercana al clado de las especies

pertenecientes a Nueva Guinea. Por último la especie *P. myrmecodiae nigriventris* perteneciente a las Islas Salomón se encontró en un clado de manera independiente y cercano a la localidad de Borneo; estas últimas aparecieron en un clado hermano. El grupo externo que se alejó más de las especies del género *Philidris* fue la especie *Ochetellus clarithorax*, como se muestra en la filogenia de la figura 12.



**Figura 12.** Árbol Máxima verosimilitud (ML) para la estimación de la relación filogenética para diferentes especies del género *Philidris* de diferentes localidades de la región Indo-Australiana basada en datos concatenados de cuatro genes (COI,

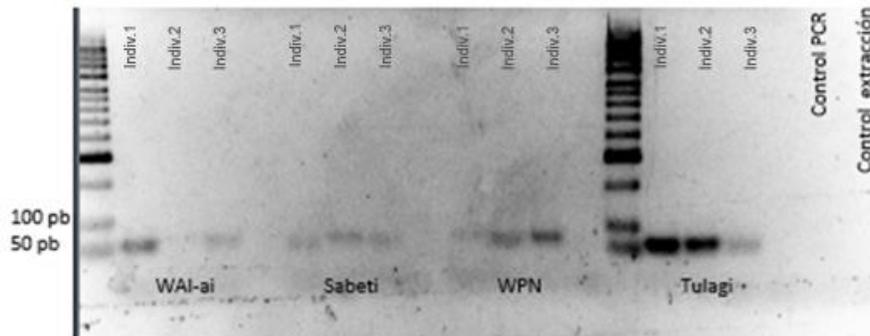
Ef1- $\alpha$ F1; Ef1- $\alpha$ F2 y CAD). Los cuadros en colores representan las diferentes localidades.

### **Comparación de muestras de museo y moderna de la especie *Philidris myrmecodiae nigriventris* de la localidad de las Islas Salomón.**

#### *Obtención de ADN de muestras de museo*

Se llevó a cabo la extracción de ADN de individuos por separado de muestras de museo, de las cuales se realizó una estandarización previa del protocolo de extracción de ADN con un método no destructivo de tejido con muestras modernas, para no hacer uso innecesario de las muestras de museo, así como la amplificación de fragmentos cortos de gen mitocondrial COI. El procedimiento de estandarización se llevó a cabo con muestras modernas en el laboratorio de Genómica Ecológica y Evolutiva del Langebio, esto para evitar posibles contaminaciones de muestras modernas con las de museo.

Para la extracción de ADN de muestras de museo, el procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de aDNA bajo todas las condiciones obligatorias y necesarias para trabajar en el área de soluciones y de extracción. Se implementó un protocolo de extracción de ADN no destructivo descrito anteriormente en los métodos, con el cual se logró obtener ADN de 13 muestras, de las cuales se logró amplificar el fragmento LCO-44R de un tamaño aproximado de 50-70 pb. Corroborando estos resultados con los controles implementados en el método (control de PCR y de extracción, sin ADN). En la electroforesis (Figura 13) se observaron someras bandas del fragmento esperado en las muestras para las 4 localidades de las Islas Salomón.



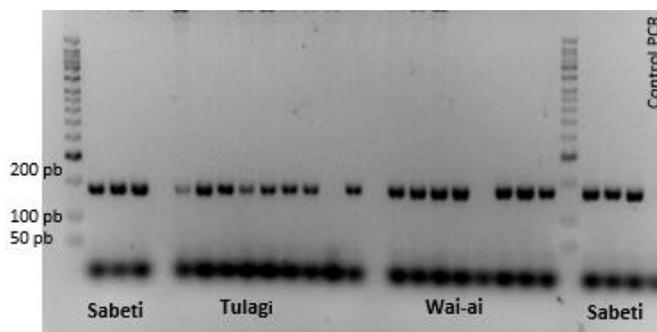
**Figura 13.** Amplificados específicos para fragmento corto LCO-44R del gen COI para 3 individuos diferentes de cuatro localidades de las Islas Salomón. Protocolo de extracción 1, método no destructivo.

Para este procedimiento se implementó un segundo protocolo de extracción de ADN no destructivo, con el cual solo se logró extraer y amplificar una muestra perteneciente a la localidad Tulagi. Todos los resultados se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Total de muestras que fueron amplificadas con el fragmento LCO-44R para los dos protocolos de extracción de ADN.

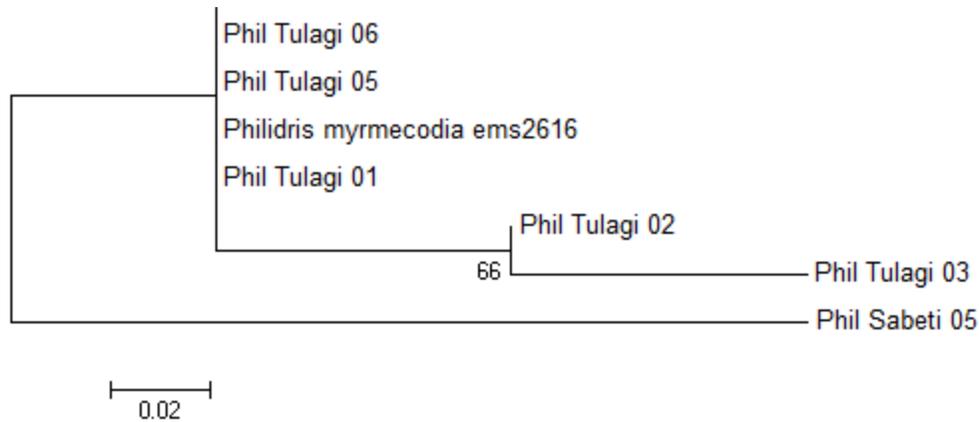
Localidad	Individuos por colonia	LCO-44R protocolo 1	LCO-44R protocolo 2
WAI-AI	3	Si	no
TULAGI	5	si	si
SABETI	3	Si	no
WPN	2	Si	no

Todos los fragmentos que se obtuvieron fueron cuantificados, donde se obtuvo una concentración aproximada para todas las muestras de 15-25 ng/μL. Una vez obtenidos estos fragmentos, fueron clonados en un vector pJET 2.0 (Figura 14). Este procedimiento nos permitió obtener varias clonas de cada fragmento, posteriormente cada clona obtenida fue purificada y secuenciada por el método de Sanger y las secuencias fueron comparadas y analizadas para poder detectar daño molecular, que se refleja en la presencia de cambios aleatorios en las secuencias de distintas clonas, pero que no son compartidos.





individuo Phil\_Sabeti\_05 fue el que se alejó del resto de los individuos, agrupándose de manera independiente (Figura 16).

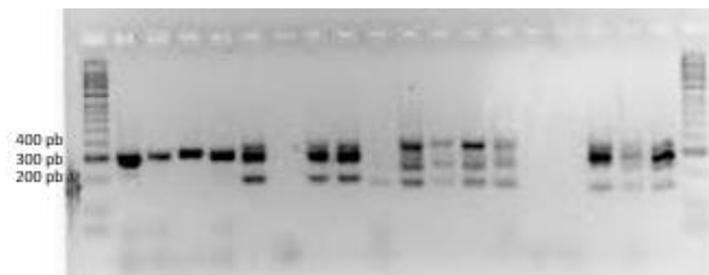


**Figura 16.** Relación entre individuos de museo y moderno (*Philidris myrmecodia\_ems2616*) de la especie *P. myrmecodiae nigriventris*, pertenecientes a la localidad de las Islas Salomón en base al método de ML. Con un valor de bootstrap de 66.

### **Genotipificación microsatélites para las poblaciones de la especie *P. myrmecodiae*.**

#### *Obtención de secuencias microsatélites.*

La electroforesis de los marcadores microsatélites amplificados para las muestras de hormigas de la especie *P. myrmecodiae* de Nueva Guinea. La cual mostró un patrón de bandeo de distinto peso molecular para los diferentes loci encontrados (Figura 17).



**Figura 17.** Amplificación de bandas de microsatélites de diferentes tamaños para *P. myrmecodiae* de la localidad de Yawan, PNG. Gel de agarosa 1.5%.

Después de la amplificación y observación de los bandeos en la electroforesis, se procedió al análisis de los cronogramas con el software GeneMarker (Applied BioSystems Genotyper®) para determinar las tallas alélicas y para genotipificar.

Del total de 20 loci probados, 16 fueron polimórficos para un total de 69 individuos de la especie *P. myrmecodiae* analizados distribuidos en 21 árboles (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resumen del total de 16 loci polimórficos para *Philidris myrmecodiae*, donde se muestra el número de loci, tamaño molecular (pb), flouróforo y numero de alelos por locus.

Loci	Producto PCR (pb)	Flouróforo	N alelos/locus
loc41	220	VIC	11
loc7	290	FAM	10
loc6	360	PET	2
loc5	390	VIC	2
loc40	280	VIC	7
loc20	340	FAM	16
loc30	280	NED	2
loc28	160	VIC	2
loc22	200	FAM	9
loc25	250	PET	17
loc23	300	NED	11
loc13	360	VIC	2
loc9	230	VIC	8
loc4	250	NED	7
loc17	350	FAM	7
loc15	320	PET	13

## **Diversidad genética y estructura poblacional de *P. myrmecodiae***

*Variación genética poblacional, equilibrio de Hardy-Weinberg y análisis de varianza molecular (AMOVA).*

Los índices de diversidad genética por localidad, por árbol (grupo) fueron calculados en el programa GenAEx y se indican en la Tabla 6. El promedio de alelos privados  $N_{PA}$  varió de entre 0 y 4, los grupos con mayor riqueza son T3, T4 y T12; los grupos que presentaron una nula riqueza de alelos privados fueron T1, T13, T17, T18, T20 y T2. El grupo que tuvo un mayor número de alelos diferentes ( $N_e$ ) fue el grupo T1 y los grupos con mayor porcentaje de loci polimórficos fueron T3 y T10 con un 100% y T15, T16 y T19 los grupos con menos loci polimórficos (56.25%).

El cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada grupo (árbol) por locus indicó que 8 de los grupos están en desequilibrio debido a al menos una diferencia de heterocigotos en al menos un locus. Para ninguno de los grupos se detectó desviación en más de 3 loci, siendo los grupos T3 y T7 las que tuvieron más loci en desequilibrio de Hardy-Weinberg. Los loci que estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los grupos (árboles) fueron loc7, loc30, loc22, loc25, loc23, loc13 y loc15 y ninguno de los loci estuvo desviado del equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los grupos, siendo el loci6 el que más desviaciones presentó. El análisis en GenAEx para los valores de heterocigotos observados ( $H_o$ ) y esperados ( $H_e$ ) fueron significativamente diferentes (apéndice 7).

**Tabla 6.** Grupos (plantas), número de individuos analizados (N), número de alelos diferentes (Na), número de alelos efectivos ( $N_e$ ), proporción de heterocigotos observados ( $H_o$ ) y esperados ( $H_e$ ), riqueza de alelos privados (RAP) y porcentaje de loci polimórficos.

<b>Grupos (árboles)</b>	<b>N</b>	<b>Na</b>	<b><math>N_e</math></b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>	<b>F</b>	<b>RAP</b>	<b>% loci polimórficos</b>
<b>T1</b>	5.000	3.188	2.579	0.613	0.518	-0.129	--	87.50%

<b>T2</b>	4.000	3.750	2.922	0.656	0.559	-0.168	2	93.75%
<b>T3</b>	4.000	2.500	2.230	0.844	0.521	-0.600	4	100.00%
<b>T4</b>	3.000	2.063	1.807	0.542	0.347	-0.517	4	75.00%
<b>T5</b>	2.000	1.688	1.688	0.688	0.344	-1.000	1	68.75%
<b>T6</b>	2.000	2.125	2.013	0.875	0.477	-0.831	2	93.75%
<b>T8</b>	5.000	2.188	1.843	0.650	0.395	-0.565	1	87.50%
<b>T9</b>	5.000	3.250	2.357	0.613	0.495	-0.203	3	87.50%
<b>T10</b>	4.000	3.875	3.144	0.672	0.604	-0.118	1	100.00%
<b>T11</b>	6.000	2.688	2.132	0.708	0.452	-0.548	1	81.25%
<b>T12</b>	5.000	2.500	2.126	0.675	0.455	-0.493	4	81.25%
<b>T13</b>	4.938	2.375	1.959	0.716	0.447	-0.550	--	93.75%
<b>T14</b>	2.875	2.063	1.976	0.771	0.435	-0.798	1	81.25%
<b>T15</b>	2.000	1.688	1.596	0.500	0.281	-0.763	1	56.25%
<b>T16</b>	2.000	1.563	1.563	0.563	0.281	-1.000	2	56.25%
<b>T17</b>	3.000	2.438	1.999	0.604	0.420	-0.427	--	87.50%
<b>T18</b>	2.000	1.688	1.688	0.688	0.344	-1.000	--	68.75%
<b>T19</b>	2.000	1.688	1.688	0.563	0.297	-0.926	1	56.25%
<b>T20</b>	2.000	1.688	1.688	0.688	0.344	-1.000	--	68.75%
<b>T21</b>	2.000	1.750	1.750	0.750	0.375	-1.000	--	75.00%

Se encontraron de 2-17 alelos (con una media de 10) por locus microsatélites (Tabla 5) al igual que 28 alelos privados en 16 loci polimórficos para los 69 individuos analizados, resultado del análisis con el programa GenAlEx v.6.

El análisis del AMOVA indicó diferenciación genética entre los individuos pertenecientes a los diferentes grupos (árboles), donde los porcentajes de la variación genética explicados por diferencias entre poblaciones fue de 21% (d.f.= 19; SS= 231.451), entre individuos 0% (d.f.= 48; SS= 119.417) y dentro de individuos 79% (d.f.= 68; SS= 364.000) (ver más detalles en la Tabla 8).

*Estimaciones de diferenciación genética poblacional, estadísticos de F ( $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ ) y análisis de componentes principales (PCA).*

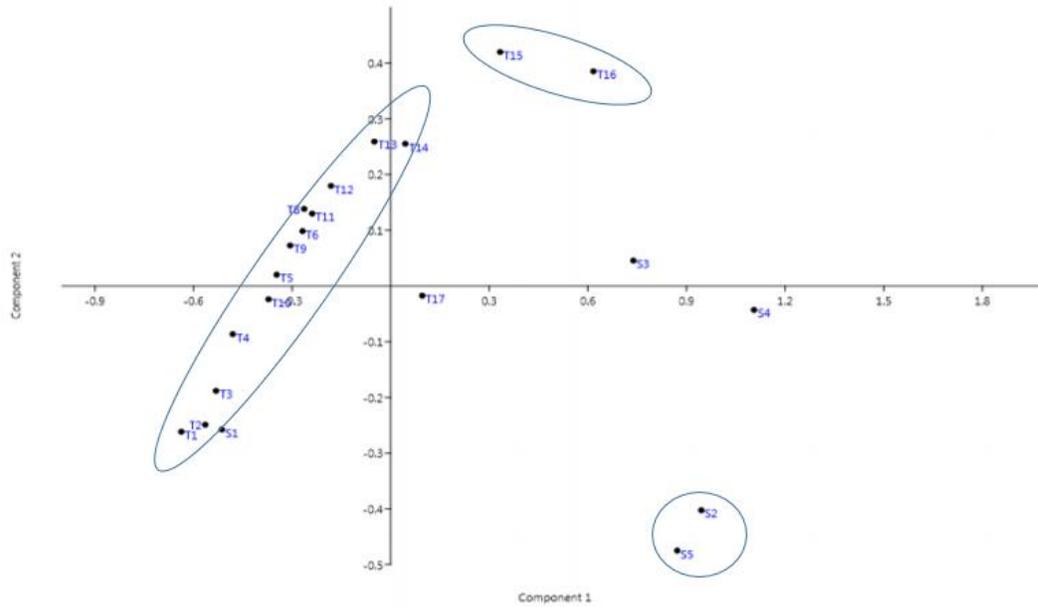
Los estimadores de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{IS}$ ) indicaron diferencias en las frecuencias alélicas entre los individuos pertenecientes a los nidos en diferentes árboles para los 16 loci polimórficos encontrados, estos fueron calculados con el programa GenAlEx (Tabla 7).

El índice de endogamia total ( $F_{IT}$ ) para todos los loci también fue positivo y significativamente diferente de cero ( $F_{IT} = 0.001$ ,  $P < 0.431$ ), para  $F_{IS}$  el valor fue negativo ( $F_{IS} = -0.365$ ,  $P < 1.000$ ) indicando que existe un exceso de heterocigotos (apéndice 8).

**Tabla 7.** Resultados de los análisis de varianza molecular (AMOVA) de los individuos pertenecientes a los diferentes grupos (árboles) comparando la variación genética en 3 niveles.

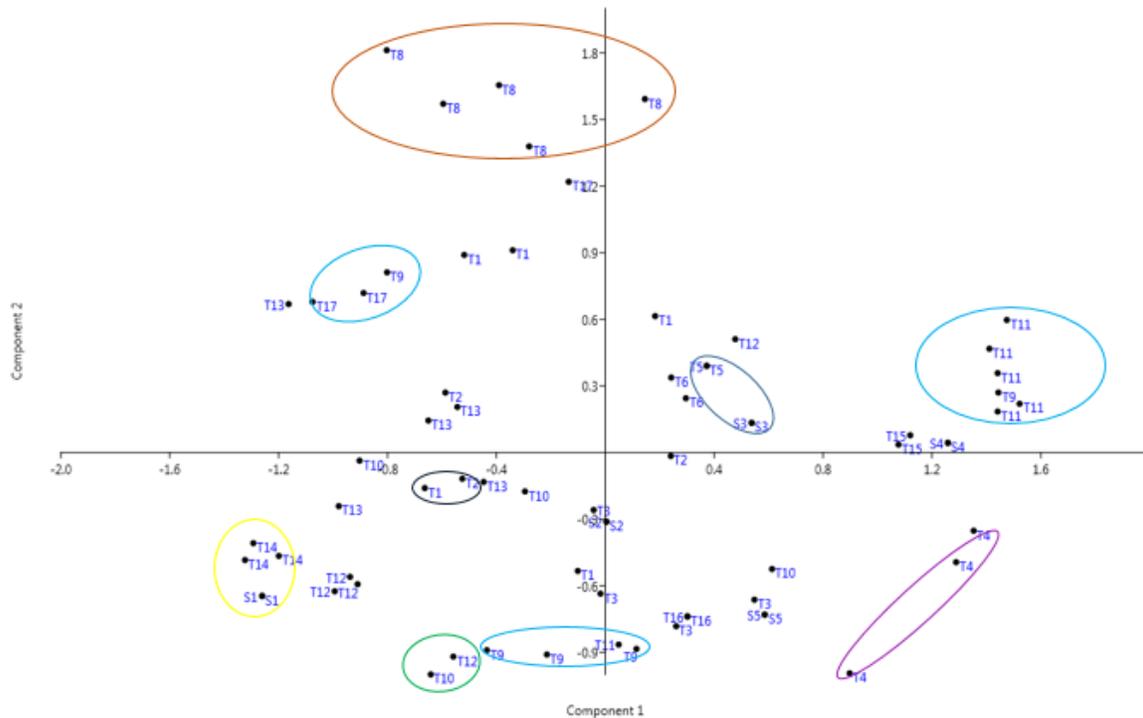
Fuente de variación	df	SS	MS	Variación estadística	% de variación total
Entre poblaciones	19	231.451	12.182	1.438	21
Entre individuos	48	119.417	2.488	0.000	0
Dentro de individuos	68	364.000	5.353.	5.353	79
Total	135	714.868		6.791	100

Para el análisis de componentes principales (PCA) se utilizaron los datos del índice de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) entre individuos por árbol. Se observó que los diferentes árboles se conjuntaban en 3 grupos, los puntos que se encuentran más alejados, pertenecen a los árboles que se encuentran más alejados en los lugares de muestreo en el mapa de Yawan (Figura 18) así como los puntos más cercanos entre sí, son los árboles que se encuentran más cercanos en el mapa.



**Figura 18.** Análisis de componentes principales analizando los genotipos de los individuos por árbol, basado en índices de diferenciación genética  $F_{ST}$ . Los puntos con la letra T son los árboles (grupos) (n=16) y los de letra S son las plantas individuales (n= 5).

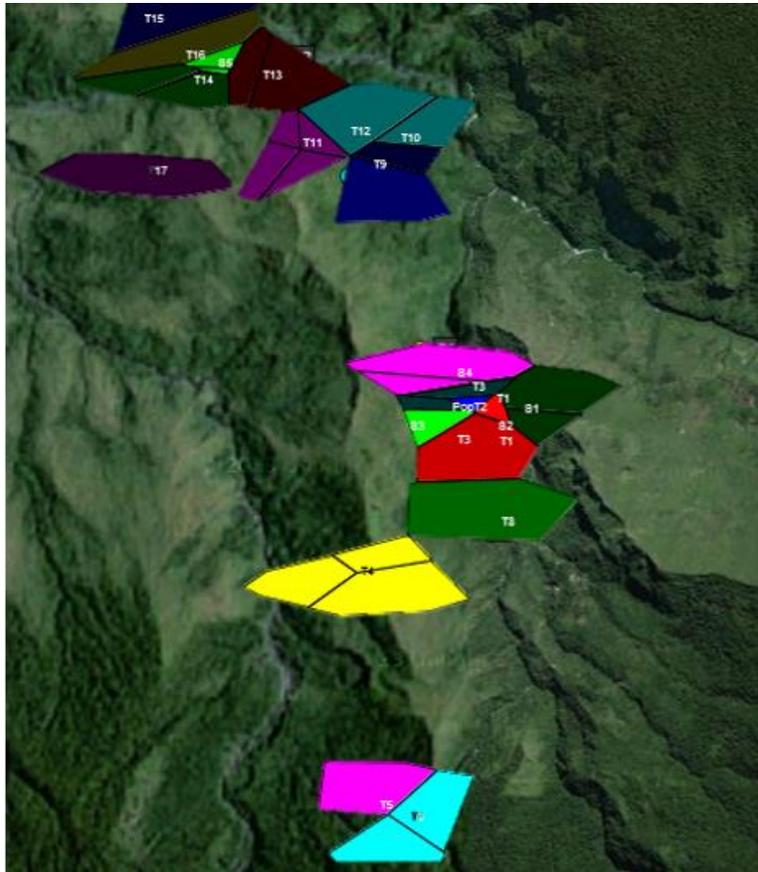
En el segundo PCA corresponde a la relación de parentesco (Queller & Goodnight, 1989) que existe entre los individuos que ocupan diferentes nidos en los árboles. El PCA agrupó a los individuos que se encuentran en los diferentes árboles de la siguiente manera: T10+T12; T11+T9; T9+T17; T5+S3; T14+S1; T1+T2 y como grupos individuales a los individuos pertenecientes a los árboles T8 y T14 (Figura 19). Estos últimos árboles presentaron un nido (planta) encabezado por una reina cada uno y para los árboles que estuvieron agrupados, estos comparten al menos una reina para los nidos que están en estos árboles.



**Figura 19.** Análisis de componentes principales (PCA) basado el coeficiente de parentesco (Queller & Goodnight, 1989) entre los genotipos de todos los individuos pertenecientes a nidos en diferentes árboles.

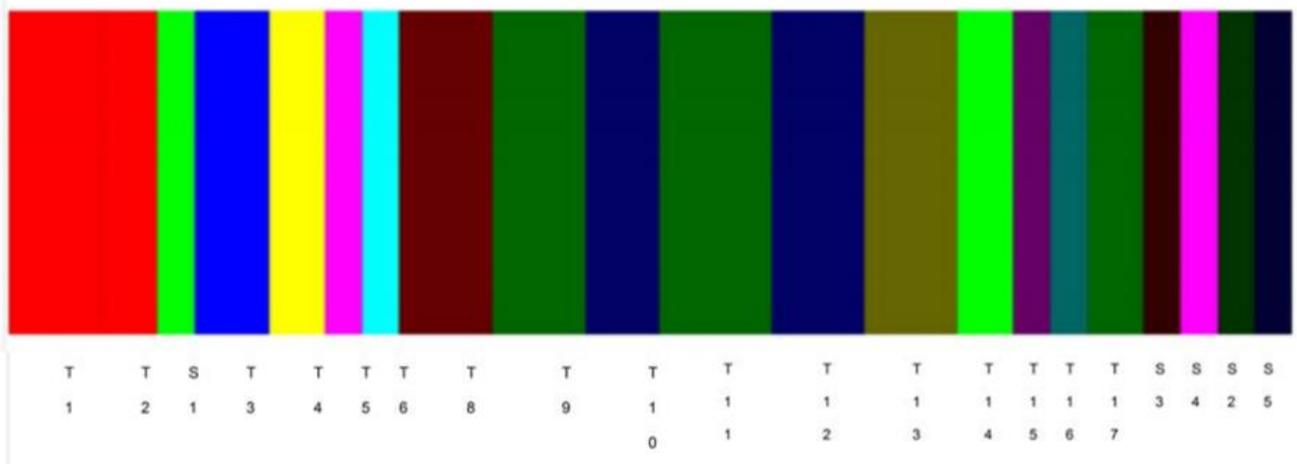
*Análisis BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure).*

Para el análisis de estructura genética espacial de *P. myrmecodiae* con el programa BAPS se analizaron un total de 69 individuos, los cuales están distribuidos en 21 y en la localidad de Yawan. El análisis para la estructura poblacional por individuos con información espacial (datos GPS) fueron identificados 21 clústeres (Log (marginal likelihood) = -2903.5408, Figura 20), para más información de la identificación de clústeres basado en el análisis espacial por individuos, ver apéndice 9.



**Figura 20.** Mapa con los 20 clústeres para los grupos (árboles) usando un análisis bayesiano de estructura genética poblacional de la distribución espacial por individuos, basado en posiciones geográficas para cada sitio (árbol) de la localidad de Yawan, PNG. Cada grupo de polígonos corresponde a un árbol y los grupos que se encuentran en un solo clúster están representados por un mismo color.

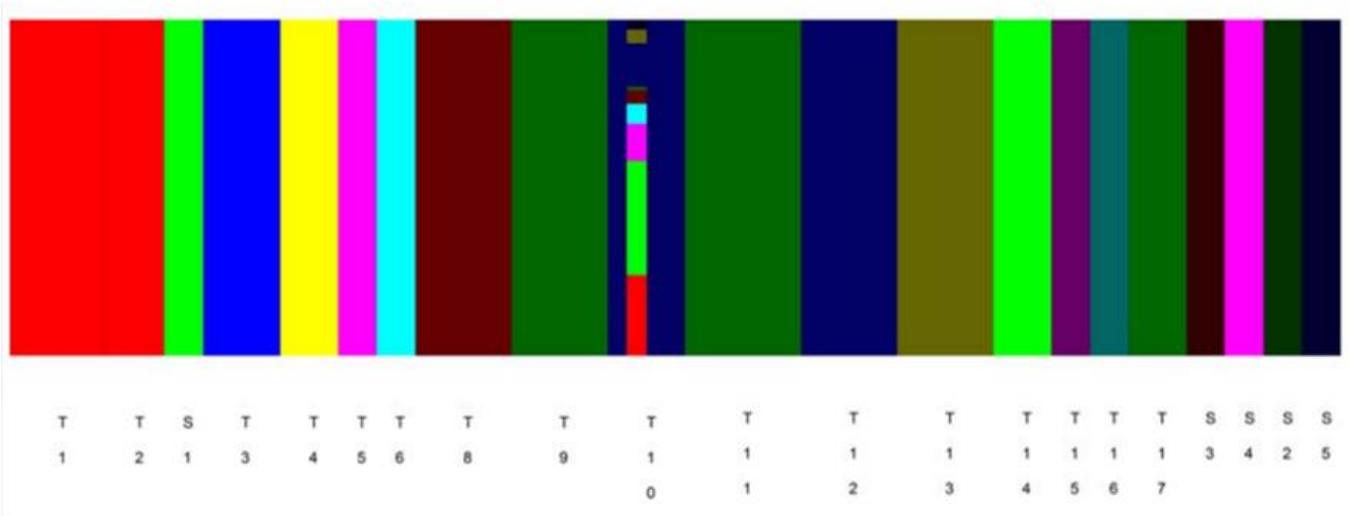
Para el análisis no espacial basado en los 21 árboles y plantas, se agruparon en 15 clústeres (Log (marginal likelihood) = -2947.5981) .Los árboles y plantas (nidos) que fueron agrupados en un clúster fueron los siguientes: T1+T2; T14+S1; T5+S4; T9+T11+T17; T10+T12 (Figura 21).



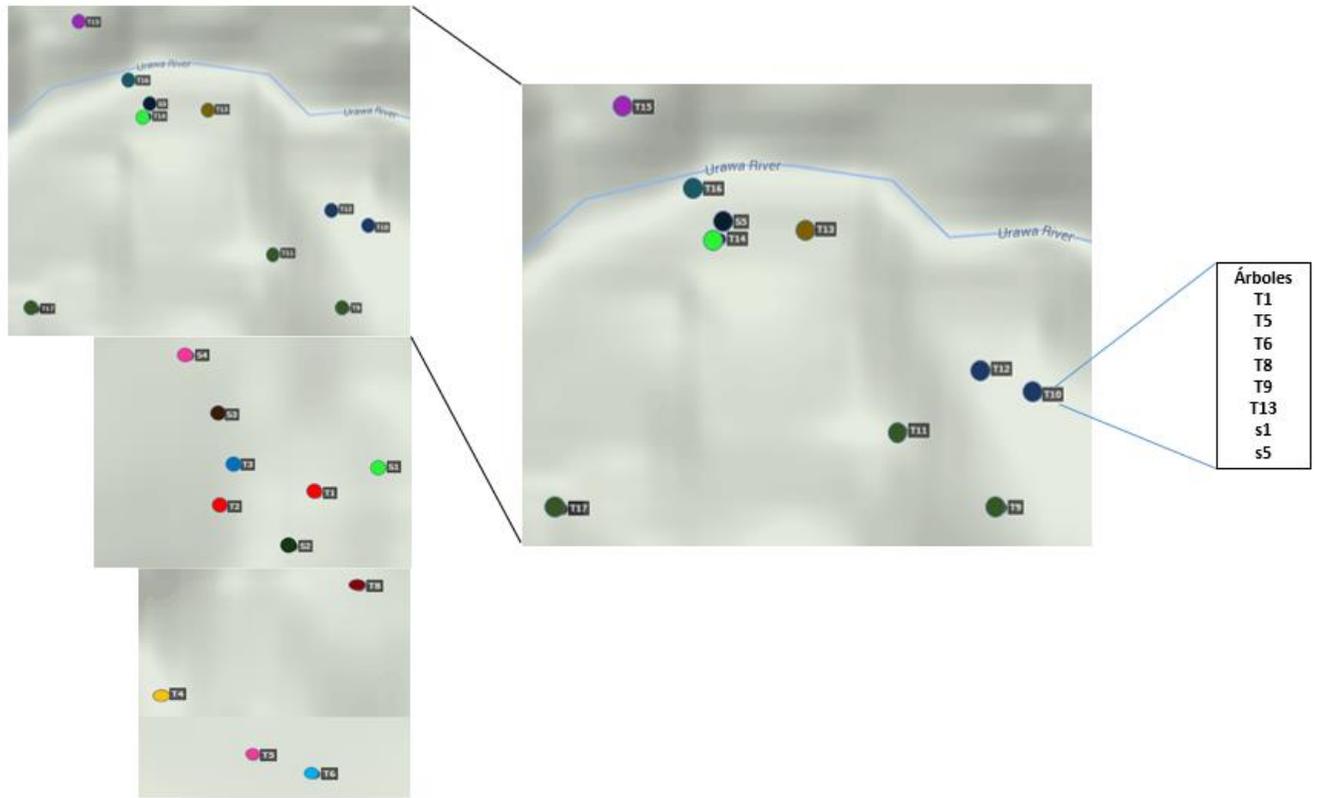
**Figura 21.** Análisis BAPS de distribución no espacial por grupos (árboles (T) y nidos (S)). Cada barra con un color diferente representa los clústeres en los cuales se agruparon datos de los diferentes haplotipos.

Finalmente, basados en los resultados del análisis no espacial (Admixture) por grupos, se adicionó un análisis mezclando los grupos. El análisis sugiere que solo los individuos de los grupos que representan los arboles 10 y 12 están mezclados con haplotipos pertenecientes a otros nidos en diferentes árboles (Figura 23).

Los haplotipos representados en grupos (árboles) resultado del análisis Admixture contienen los elementos de los árboles de grupo T1, T5, T6, T8, T9, T13 s1 y s5, todos mezclados en con el genotipo del grupo T10 (barras en color azul). Estos árboles no se encuentran muy distanciados geográficamente, lo cual indica que los individuos que habitan en estos árboles pudieron haberse desplazado de un sitio a otro (Figura 23). El grupo que se encuentra menos distanciado es el grupo T12 el cual abarca la mayor parte de color azul en las barras; seguidos los grupos T14 y s1, además de los grupos T1 y T2 (Figura 22).



**Figura 22.** Análisis BAPS de distribución no espacial (Admixture) por grupos (árboles y nidos). Cada barra con un color diferente representa los clústeres en los cuales se agruparon datos de los diferentes haplotipos. En la parte posterior se representan los nombres de los grupos (árboles) siendo el árbol T10 el grupo que contiene más colores representando una mezcla entre diferentes grupos de haplotipos.



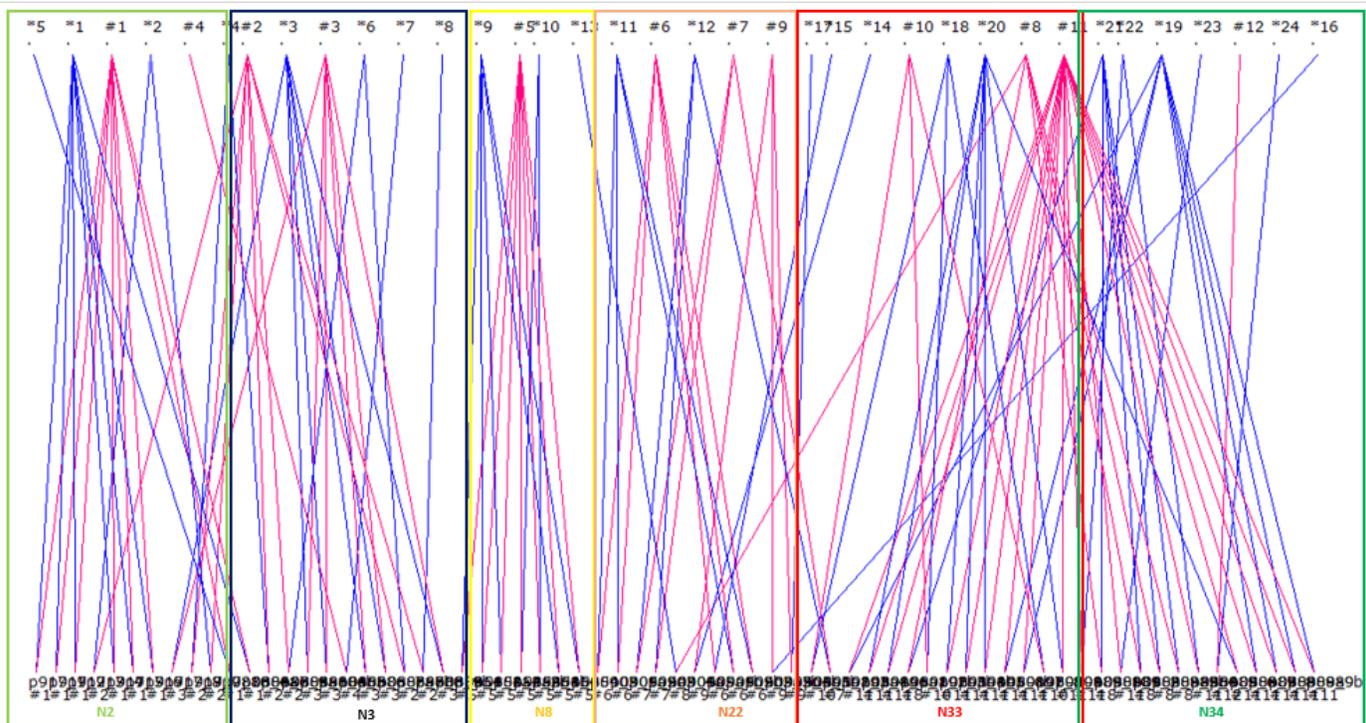
**Figura 23.** Mapa de la localidad de Yawan donde se muestra en colores los clústeres resultado del análisis no espacial (Admixture) de los grupos de haplotipos en el programa BAPS, en la parte superior derecha en el recuadro se muestran los grupos que se encuentran mezclados. Cada color representa un grupo diferente.

### **Estructura social y determinación de pedigrí de *P. myrmecodiae*.**

Para el análisis de la estructura social y la determinación del pedigrí, primero se analizaron los nidos de los cuales se cuenta con datos de más de 5 individuos de la casta obrera por planta hospedera (nido) y así determinar si los individuos analizados por nido tienen la misma línea materna. Mediante análisis estadísticos y construcción de redes, se determinó el parentesco entre los individuos de diferentes nidos basados en datos genéticos multilocus, la tabla del análisis con el total de individuos por planta se encuentra en el apéndice 6. Así como también se infirió el cálculo de reinas presentes por nido (monoginia y poliginia) y número de machos que contribuyeron a la progenie (poliandria).

*Pedigrí de nidos-plantas con más de cinco individuos.*

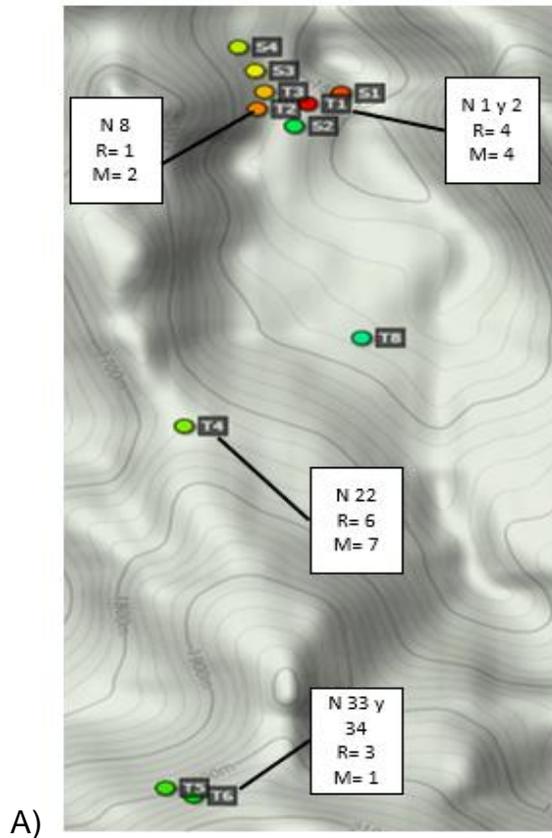
Se realizó el análisis del pedigrí de los nidos que tienen más de 5 individuos, esto para observar cómo se encuentran relacionados individuos de la casta obrera entre ellos y cuál es su posible línea materna y paterna. Se analizaron un total de 6 nidos (plantas), pertenecientes a 4 árboles en diferentes locaciones. Primero se llevó a cabo el análisis total de los individuos presentes en diferentes nidos y tener un panorama amplio sobre cómo pueden estar relacionados con individuos de otros nidos y determinar si estos pertenecen a una misma colonia. El siguiente diagrama de redes resultado del análisis en el programa *Pedigree viewer* (Figura 24) muestra el pedigrí de *P. myrmecodiae* representando en líneas de color azul la línea paterna (\*) y en color rosa la línea materna (#) y el ID de los individuos analizados en la parte inferior en color negro. En los bloques de diferentes colores se representa el número de nido que pertenece cada uno de individuos analizados. Los detalles del análisis (probabilidad, número de clústeres, ID de cada individuo, ID de las plantas/nidos y árboles) se encuentran en el apéndice 6.

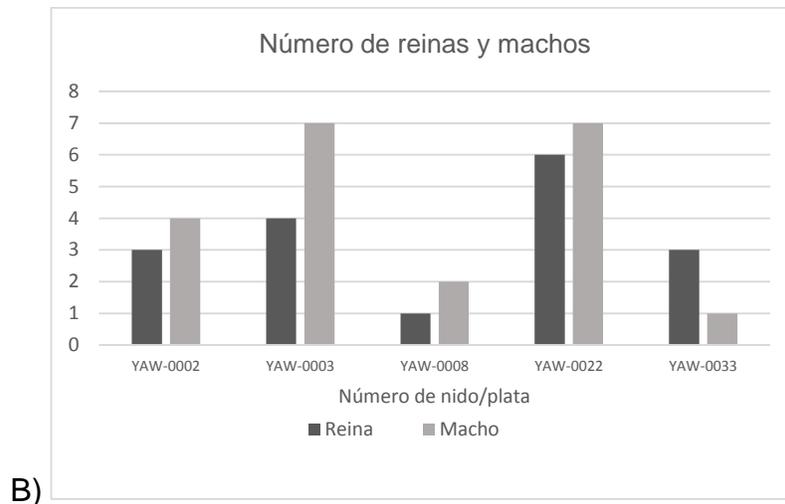


**Figura 24.** Pedigrí de *P. myrmecodiae* analizando el total de individuos pertenecientes a 6 nidos, indicando la línea materna (rosa) y la línea paterna (azul) para cada individuo.

El rango total de reinas encontradas para los nidos fue de 1-6, siendo los nidos 8 y 34 los nidos con solo una reina por nido y el nido número 22 con el número más alto de reinas encontrado (Figura 25).

En este análisis también se determinó el número total de machos relacionados con cada reina (*Mate selection*) para cada planta hospedera. El análisis arrojó un rango de 1-7 machos, siendo los nidos 3 y 22 con un número mayor de machos (tomando en cuenta que estos nidos presentaron un mayor número de reinas) y las reinas del nido 33 con solo un macho (Figura 25). Con los resultados obtenidos se puede inferir que *Philidris* presenta una estructura de tipo poliandria en el que la reina tiene múltiples apareamientos con más de un macho y estos pueden contribuir a la descendencia de la colonia.

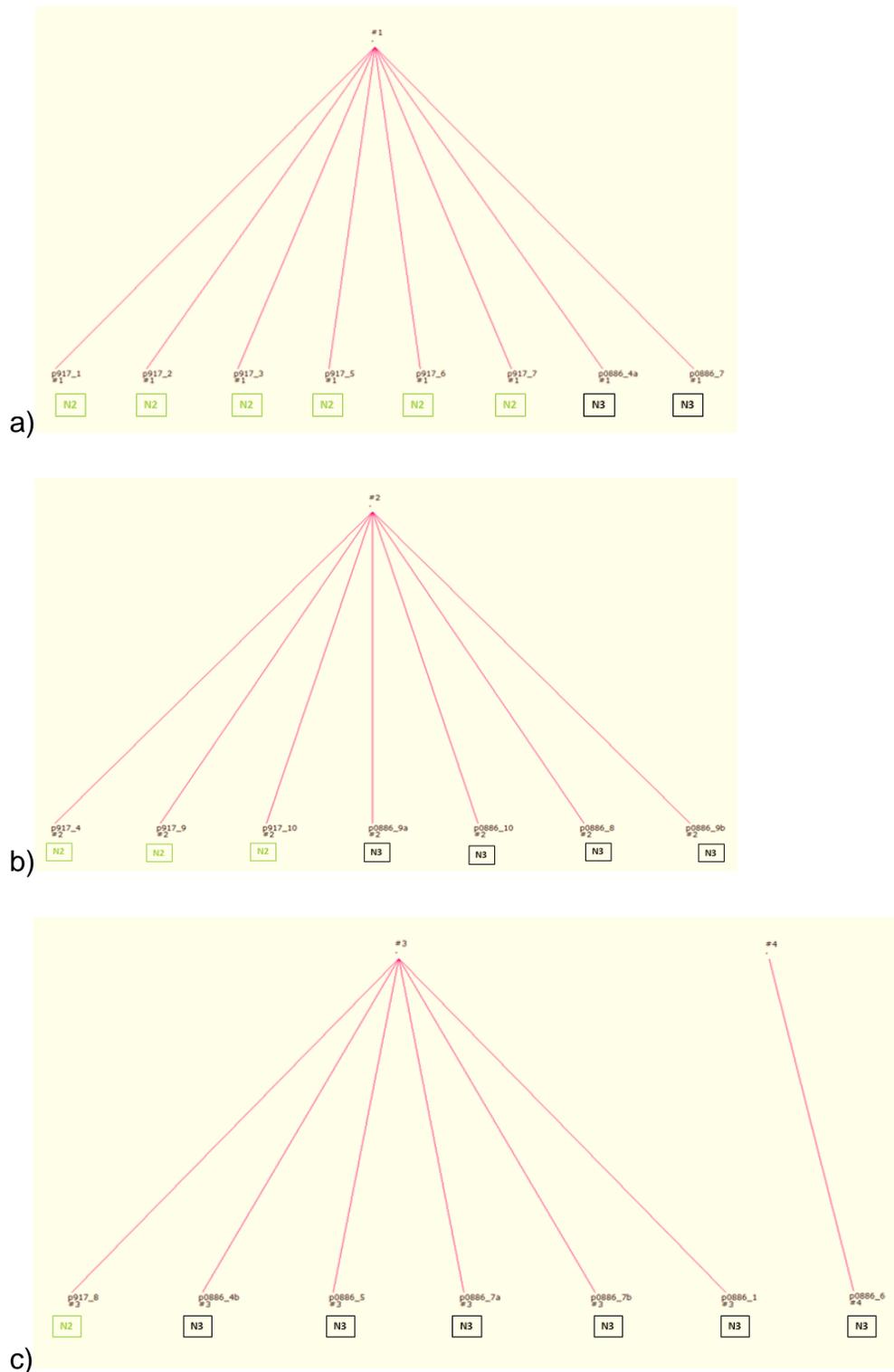




**Figura 25.** A) Mapa con los diferentes sitios de muestreo de la localidad de Yawan, donde se muestra el número de árbol, número de nidos (plantas hospederas), número de reinas y machos encontradas para cada nido analizado (recuadro en el mapa). En la gráfica de la derecha se observa con mayor detalle los datos presentados en el mapa.

En el mismo análisis del pedigrí para el total de reinas por nidos, nos enfocamos en los árboles con más de un nido: árbol 1 y árbol 6, esto para tener un mejor análisis sobre cómo es la estructura de la colonia, para responder la siguiente pregunta ¿los nidos (plantas hospederas) en el mismo árbol forman parte de una misma colonia o son colonias separadas?

Analizando el pedigrí de los individuos de los nidos 2 y 3 del árbol 1 se encontraron en total 4 reinas como línea materna para las obreras de los dos nidos (Figura 26). El análisis mostró que hay 3 reinas para los nidos 2 y 3, y una cuarta reina la cual se encontró únicamente el nido 3.

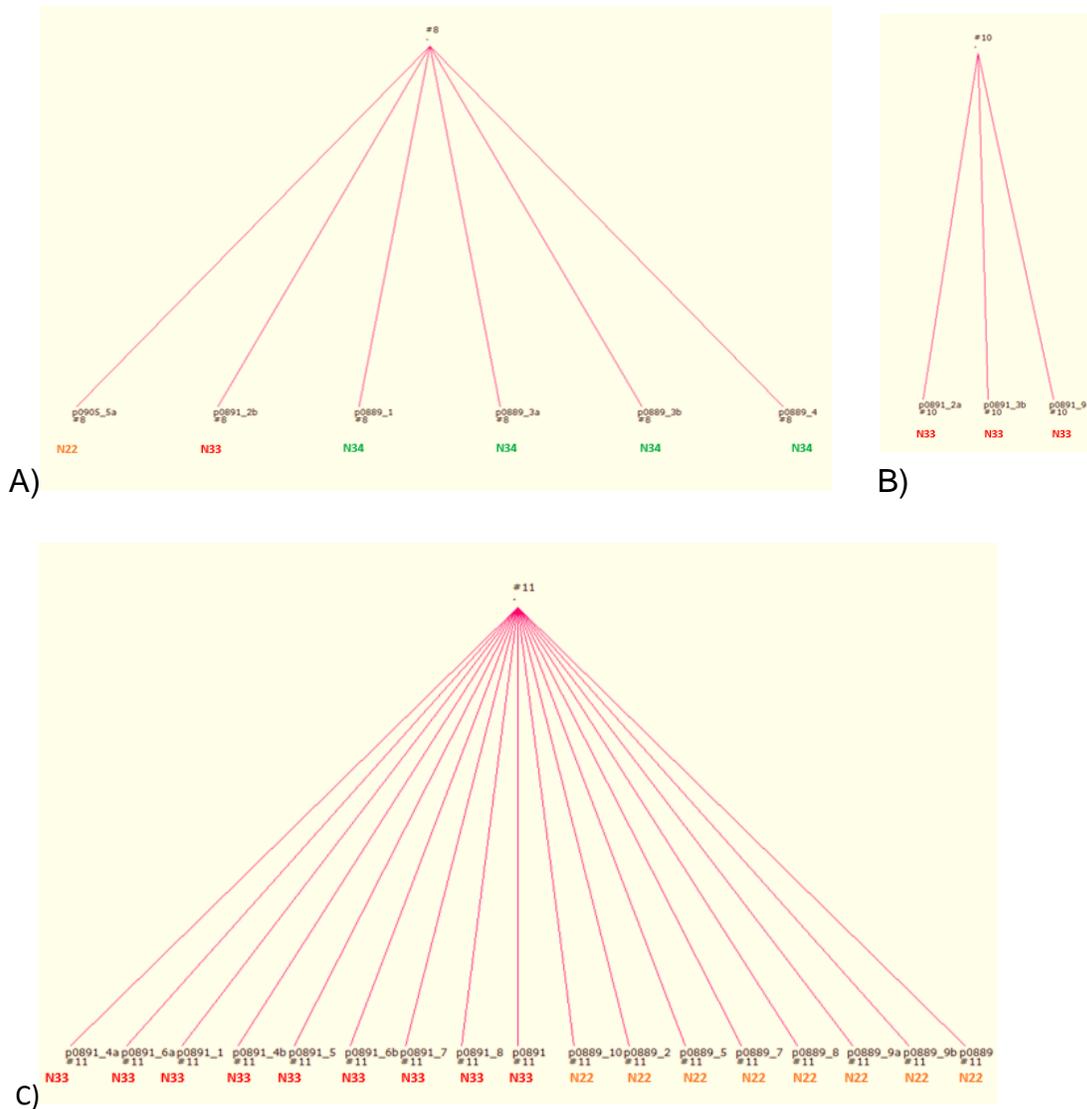


**Figura 26.** Pedigrí de los individuos pertenecientes a los nidos (N) 2 y 3 para el árbol número 1. A) Reina con el ID1 se encontró como línea materna para 6 individuos del nido 2 y dos del nido 3. B) Reina con el ID2 para 3 individuos del nido 2 y 4 para

el nido 3. C) Reina con ID3 solo forma parte de la línea materna para un individuo del nido 2 y 5 individuos para el nido 3. Por último se encontró una reina con el ID4 como línea materna solo para un individuo del nido 3.

El análisis antes detallado muestra que los individuos de los nidos 2 y 3 están genéticamente relacionados, compartiendo la misma línea materna, de lo cual se puede inferir que los nidos 2 y 4 forman parte de una misma colonia en el árbol 1 y presentan más de una reina.

Para el árbol 6 se tienen los nidos 33 y 34 de los cuales se encontraron 3 reinas habitando los dos nidos (Figura 27).



**Figura 27.** Pedigrí de los individuos pertenecientes a los nidos (N) 33 y 34 para el árbol número 6. A) Reina con el ID8 se encontró como línea materna para los individuos los nidos nido 22, 33 y 34. B) Reina con el ID10 para 3 individuos del nido 3. C) Reina con ID11 para 9 individuos del nido 33 y 8 individuos para el nido 22.

En los resultados analizados anteriormente para el árbol 6, se observó que para los nidos 33 y 34 se encontraron 3 reinas como posible línea materna para los individuos pertenecientes a estos nidos, lo cual quiere decir que estos nidos están relacionados entre sí y forman parte de una colonia con más de una reina. La reina con el ID 8 además de estar relacionada con los individuos de la casta obrera de los nidos 33 y 34, también se encuentra como línea materna del nido 22 el cual pertenece al árbol 4, este árbol se encuentra a una distancia no muy grande del árbol 6.

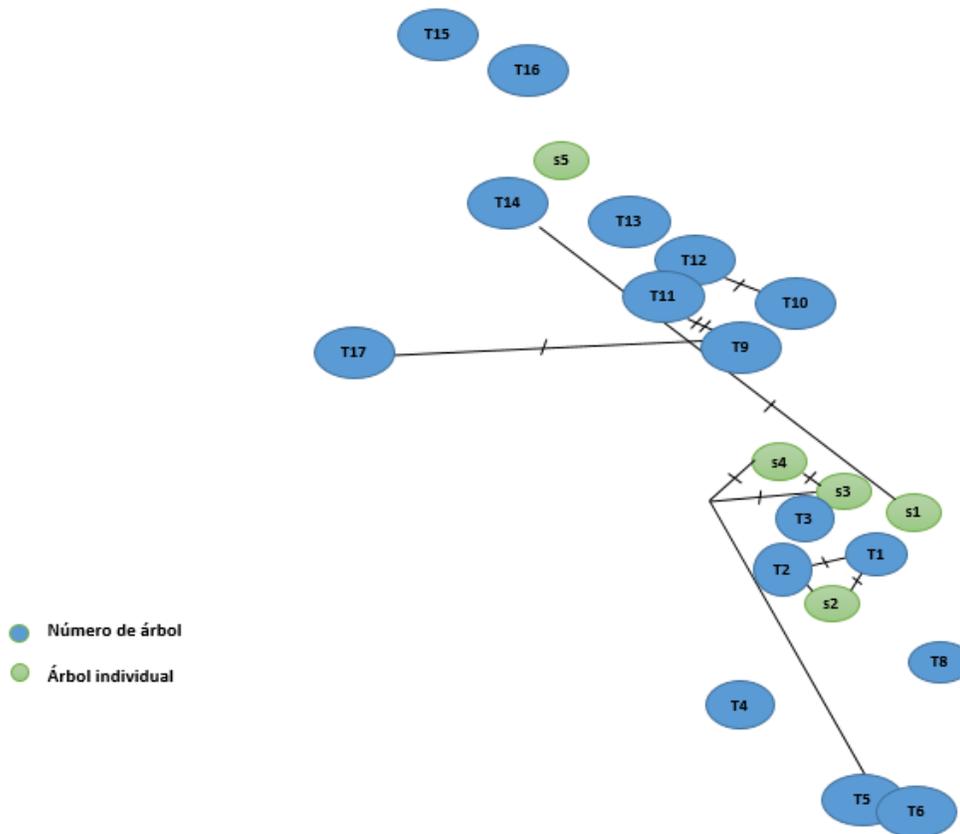
*Pedigrí del total de individuos por nido-planta.*

Para los árboles con solo un nido se tienen el árbol 2 con el nido 8 y el árbol 4 con el nido 22. Se encontró una reina para el nido 8 y seis reinas para el nido 22. Para el nido 22 se encontró que una de las reinas se encuentra presente también como línea materna para los individuos de los nidos 33 y 34. Esto quiere decir que probablemente los individuos de los nidos 22, 33 y 34 pertenecientes a los árboles 4 y 6 consecutivamente, formen parte de la misma colonia (Figura 19).

El conjunto de datos analizados anteriormente para cada uno de los árboles con más de 5 individuos por nido (planta hospedera) nos muestran que *Philidris myrmecodiae* presenta más de una reina por nido, además se observó que las hormigas reina pueden seleccionar más de un macho para formar descendencia.

Finalmente, de los datos obtenidos del análisis en el programa COLONY se analizó el total de reinas encontradas por nido abarcando todos los datos (árboles con un individuo por nido) y se determinó cuáles reinas estaban compartidas con otros nidos de los diferentes puntos de muestreo. En la figura 28 se representa un diagrama con los diferentes sitios de muestreo en la localidad de Yawan, donde se observan 5 colonias. Representando en círculos de color azul cada árbol, en color

verde las plantas individuales, en líneas la conexión que hay entre cada árbol que comparten reinas entre sí y con pequeñas líneas transversales el número de reinas compartidas, se puede observar que los arboles T9, T11 y T17 comparten 3 reinas, las cuales están presentes en los nidos (plantas) de estos árboles, T12 y T10 comparten una reina; T14 y s1 una reina; T5, s4 y s3 tres reinas; T1, T2 y s2 dos reinas. Por lo tanto se puede concluir que la especie *P. myrmecodiae* ocupa más de un nido y que estos pueden estar encabezados por varias reinas, teniendo así una estructura de tipo polidomia y poliginia.



**Figura 28.** Diagrama representado los diferentes arboles (con nidos) y plantas individuales, donde se observó qué nidos se encuentran conectados (en líneas largas) con más de una reina presente en varios nidos (número de líneas transversales cortas = número de reinas)

compartidas) (ejemplo: para los árboles T17 y T9 se encontró una reina presente en ambos árboles; para T9 y T11 se compartieron 2 reinas).

## V) Discusión

### *Relaciones filogenéticas de especies del género Philidris.*

Se combinaron datos de secuencias de ADN de genes mitocondriales y genes nucleares de tentativamente 15 especies de hormigas del género *Philidris* de 13 localidades de la región Indo-Australiana. Al hacer el análisis filogenético, la mayoría de las especies de todas las localidades se agruparon en un clado, a diferencia de la especie *P. cordata* perteneciente a Australia, que quedó en un clado aparte como una especie separada del linaje de Melanesia (esta región incluye la isla de Fiyi, Islas Salomón y Papúa Nueva Guinea). En diversos estudios anteriores con enfoques como sistemática y taxonomía la especie *P. cordata* esta reportada para la región de Australia, incluyendo a Nueva Guinea (Shattuck, 1992; Maeyama & Matsumoto, 2000; Fernández & Sendoya, 2004; [www.antweb.org](http://www.antweb.org)).

Por otra parte, las especies que se separaron en clados independientes, fueron *P. nagasau* de Fiyi y *Philidris sp.\_4* de la localidad de Timor ubicado al sur del archipiélago Malayo. Para esta última especie no existen aún registros taxonómicos para definirla como una especie independiente (datos tomados de la base de datos en línea [www.antweb.org](http://www.antweb.org)), pero en la filogenia de este estudio se situó cerca de las especies de Nueva Guinea, indicando que puede tratarse de la misma especie o de una especie hermana.

Según datos reportados por la base de datos mundial de hormigas [www.antweb.org](http://www.antweb.org), la especie *P. nagasau* se encuentra reportada únicamente para Fiyi. Los resultados en este estudio confirmaron que esta especie es endémica de Fiyi el análisis filogenético confirma que este linaje es único para esta isla mostrándose como un clado separado, además, este análisis indicó que puede tratarse de un linaje hermano de las especies de Australia y Nueva Guinea (Figura 12).

No existen registros de la especie que pertenece a la localidad de Borneo situada al sudeste de Asia. Los individuos de esta localidad han sido clasificados únicamente hasta el nivel de género. Pero en la filogenia resultado de este estudio,

se sitúan en un clado hermano con la especie *P. myrmecodiae nigriventris* perteneciente a la localidad de las Islas Salomón e implica que la especie *P. myrmecodiae nigriventris* está cercanamente relacionada con esta especie (clados hermanos). Este análisis sugiere que las especies de las Islas Salomón provienen de un antepasado originario de NG y que posteriormente fueron colonizando nuevos ambientes. Se sugiere que es necesaria una revisión taxonómica del género completo, para resolver la situación de cada una de las especies.

*Obtención de ADN de muestras de museo y construcción de filogenia de la especie Philidris myrmecodiae nigriventris de la localidad de las Islas Salomón.*

El análisis de ADN proveniente de muestras antiguas o de museo es muy útil para contestar preguntas acerca de la filogenia, filogeografía e historia poblacional de especies o poblaciones extintas (Rohland *et al.* 2004). En este estudio se utilizó un protocolo no destructivo de extracción de ADN para muestras de museo, que anteriormente había sido probado en escarabajos pertenecientes a una colección entomológica (Gilbert *et al.*, 2007). Este trabajo es pionero en implementar y modificar un protocolo de extracción de ADN no destructivo para muestras de hormigas preservadas en etanol pertenecientes a colecciones entomológicas.

Implementando el protocolo de extracción (ver sección de materiales y métodos), se logró obtener ADN de 13 individuos que fueron colectados hace más de 100 años preservando la muestra original. Estos fueron secuenciados y usados para hacer la reconstrucción de la filogenia de la especie *P. myrmecodiae nigriventris* basada en el gen uniparental COI. Al analizar las secuencias de los individuos de la especie *P. myrmecodiae nigriventris* no se observaron muchos cambios en los nucleótidos, comparándolos con la secuencia moderna. El individuo que presentó más cambios nucleotídicos en tres posiciones fue *Phil\_Sabeti\_05* de la localidad de Sabeti y éste se situó en un clado separado en la filogenia, alejado de la secuencia de un individuo moderno. Además los individuos de la localidad de Tulagi *Phil\_Tulagi\_02* y *Phil\_Tulagi\_03*, se encontraron juntos pero en un clado separado del clado donde se encuentra la secuencia moderna, presentando también un cambio de nucleótidos en dos posiciones. Los individuos que no presentaron cambios nucleotídicos, fueron

los de la localidad de Tulagi, tales fueron los casos de los individuos *Phil\_Tulagi 08*, 06, 05 y 01, los cuales se situaron dentro de un clado hermano con el individuo moderno.

En base a estos resultados aún no se puede inferir que los individuos de museo colectados hace poco más de 100 años presenten cambios en las frecuencias alélicas, debido a que en un periodo de 100 años no es suficiente para definir cambios mutacionales y evolutivos ya que el tiempo generacional de las hormigas es de una generación cada tres años aproximadamente, pero esto depende de varios factores bióticos y abióticos como la especie y la edad de la colonia que pudieran estar afectando la vida y distribución de ésta (Hölldobler & Wilson, 2009). Se puede inferir que los cambios observados se deben a algunos factores como movimiento poblacional, migración y extinción local, por mencionar algunos, debido a cambios en su lugar de hábitat, ya que la mayoría de las Islas Salomón depende de la agricultura, principalmente plantaciones de árboles de coco y extracción forestal como parte de sustento económico, (<http://www.everyculture.com/Sa-Th/Solomon-Islands.html>, consultado el 11 de Enero del 2015; Sarnat *et al.*, 2013), teniendo como consecuencia un cambio de los ambientes pasando de bosque a sitios de agricultura. Se piensa que estos cambios en el ambiente, pudieran estar afectando de alguna manera a las especies que viven en estos lugares incluyendo a las poblaciones de hormigas pero consideramos que es necesario hacer más estudios sobre los factores genéticos, geográficos y ecológicos que pueden estar actuando sobre las poblaciones de *P. myrmecodiae nigriventris*. Se sugiere que para completar este estudio se utilice una mayor cantidad de individuos de museo pertenecientes a las colecciones entomológicas ya establecidas, además de muestras de individuos colectados recientemente.

#### *Diversidad genética y estructura poblacional*

La diversidad genética estimada con el número promedio de alelos, fue alta en la mayoría de los loci ( $F_{ST}= 0.26$ ), así como la riqueza alélica comparada con la de otras especies de hormigas, tal es el caso de *Formica exsecta* en la que se obtuvo un valor de  $F_{ST}= 0.11$  usando seis loci de marcadores microsatélites

(Goropashnaya, *et al.* 2007). Comparando estos valores con algunos que se han obtenido en otros estudios empleando ADN mitocondrial en otras especies de hormigas, tales son los casos de las especies *Solenopsis invicta* ( $F_{ST}= 0.03$ ,  $\Phi_{ST}= 0.21$ , Ross *et al.* 1997) y *Lepthothorax rugatus* ( $F_{ST}=0.00$ ,  $\Phi_{ST} = 0.25$ , Ruppell *et al.* 2003), dos especies de hormigas que presentan ambos tipos de estructura de la colonia monoginia y poliginia, *Formica lugubris* ( $F_{ST}= 0.03$ ,  $\Phi_{ST} = 0.72$ ; Gyllenstrand y Seppa, 2003), *Diacamma cyaneiventre* ( $F_{ST}= 0.26$ ,  $\Phi_{ST}= 0.97$ ; Doums *et al.* 2002), estos valores de  $F_{ST}$  tuvieron un valor más bajo con respecto a los obtenidos con microsatélites.

La mayor fuente de variación genética para *P. myrmecodiae* obtenida en el AMOVA fue entre los individuos, con un 79 %, sugiriendo así una alta diversidad genética entre los individuos pertenecientes a diferentes nidos y la variación entre grupos-árboles fue de 21%, comparada con otras poblaciones de hormigas de la especie *Pseudomyrmex peperi* que forman súper colonias y presentan una estructura de tipo poliginia, de las cuales se reportó un 43.92% de variación genética entre poblaciones (Kautz *et al.*, 2009) y en este estudio para *P. myrmecodiae* la variación fue menor.

Los datos de los índices de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) para los individuos pertenecientes a diferentes nidos, fueron visualizados en un PCA en el cual se agruparon en tres grupos (Figura 18) poniendo a los individuos de los árboles T15 y T16 en un grupo. En base a los sitios de muestreo, el árbol T16 es el que se encuentra más cercano al árbol T15, ya que este último se encuentra separado del resto por una barrera geográfica (río) y comparando estos datos con el análisis espacial mostrado en la figura 20, estos árboles se mostraron en clústeres independientes. En un segundo grupo se encontraron la mayoría de los árboles, además de la planta individual S1. Comparando estos datos con los datos obtenidos en el análisis de Admixture (Figura 22), la asignación de los grupos genéticos para los individuos pertenecientes a estos árboles también se encuentran agrupados en un clúster. En un tercer grupo se observaron a los individuos que se encuentran en las plantas individuales S2 y S5, y dispersados a los individuos de las plantas S3 y

S4. Estos nidos-plantas al ser considerados como nidos recientemente fundados, se podría inferir que son nidos independientes, pero analizando los datos en base al coeficiente de parentesco (Figura 19) y análisis del pedigrí de los individuos (Figura 28), estos nidos-plantas individuales se encontraron relacionados con otros árboles donde ya estaban establecidas algunas colonias de hormigas.

En base a los resultados obtenidos en el PCA basado en el coeficiente de parentesco (Queller & Goodnight, 1989) en la figura 19 y comparando estos datos con los observados en el análisis del pedigrí del total de individuos por nido (Figura 28), se observó que entre individuos pertenecientes a diferentes nidos, donde se observan grupos bien definidos, tal es el caso de los árboles: T9, T11 y T17; arboles T10 y T12; árboles T1, T2 y S2; árboles S2; T5, S3 y S4; T14 y S1. Cada uno de estos grupos pertenece a una colonia, aun no se puede inferir en cuál de estos árboles se encuentra el nido principal o nido materno donde se encuentran las reinas o cómo se encuentran distribuidas. Se considera que es necesario hacer más observaciones en campo, sobre la distribución y comportamiento de estas colonias.

Estudios realizados por Maeyama y Matsumoto en el año 2000, indican que las hormigas del género *Philidris* son muy dominantes, además de que en ese estudio se sugirió que la fauna mirmecófila arbórea reveló una distribución de mosaico en los árboles de un manglar en Papúa Nueva Guinea, al observar que estas hormigas llegaban a ocupar hasta 4 árboles por colonia y su distribución estaba muy definida. Comparando los resultados obtenidos en este estudio con los ya reportados en el año 2000 se confirmó que las colonias de *Philidris myrmecodiae* tiene una estructura de tipo mosaico, abarcando la mayor parte de las copas de los árboles del bosque, pero también pueden abarcar otras áreas e incluso parches de vegetación, como se observó en el muestreo en campo. Este concepto de mosaico de hormigas arbóreas, fue descrito también para otras especies de hormigas dominantes en América, Papúa y Australia, así como para plantaciones de árboles de cultivo (Leston, 1978; Paulson *et al.*, 1978; Ambrecht *et al.*, 2001).

### *Estructura social*

Aunque hay muy pocos estudios reportados sobre la estructura social de *Philidris myrmecodiae*, basado en estudios anteriores realizados por Maeyama y Matsumoto (2000), se demostró que las especies del género *Philidris* son muy territoriales y altamente agresivas, teniendo bien definida el área que abarca cada colonia. Estas hormigas a menudo se encontraron dominando los árboles donde se encontraron los nidos-plantas o los parches de vegetación cerca de estos (M. Janda, observación personal).

El número de reinas y nidos por colonia es uno de los aspectos más importantes de la estructura social que influye en muchos aspectos de la vida de la colonia (Bourke & Franks 1995; Crozier & Pamilo 1996). La extrema poliginia y polidomia es algunas veces característica de hormigas invasivas (Holway *et al.*, 2002), pero también ha sido encontrado en muchas otras especies de hormigas, incluyendo hormigas que viven en plantas (Higashi & Yamauchi, 1979).

En base al análisis de 16 loci polimórficos, se analizó el número de reinas presentes por nido-planta en un bosque de la localidad de Yawan, PNG. Analizando el pedigrí de más de 5 individuos pertenecientes al mismo nido y estos nidos distribuidos en cuatro árboles diferentes, se observó que los individuos que se encontraron en nidos en el mismo árbol tienen la misma línea materna, formando una colonia. De los árboles analizados se observaron un total de cuatro colonias y cada una está encabezada por más de una reina, con un rango de 1-6 reinas por colonia; siendo el nido perteneciente al árbol 4 el que presentó el mayor número de reinas, seguido de los nidos en el árbol 1 con 4 reinas; árbol 6 con 3 reinas y árbol 2 con 1 reina.

De igual manera que el análisis que se realizó para 5 o más individuos por nido, se llevó a cabo el análisis de individuos totales pertenecientes a los 69 nidos (un individuo por nido), se encontró que en el total de 69 nidos-plantas están distribuidas 22 reinas y la descendencia de 9 de estas reinas se encontró habitando en plantas de diferentes árboles. Analizando estos resultados se lograron identificar 5 colonias, los cuales se encuentran en árboles muy cercanos con respecto a los sitios de muestreo (ver Figura 28). Estas colonias también estuvieron conformadas por nidos-plantas individuales (representados por la letra S), estos nidos se consideran

colonias fundadas recientemente ya que fueron las únicas que se encontraron habitadas por hormigas en el área de muestreo (M. Janda, observación personal); tomando en cuenta estas observaciones se puede inferir que el nido materno de las reinas reportadas para los nidos en plantas individuales está en un árbol previamente colonizado y que esta reina se dispersó a un nuevo sitio para fundar un nuevo nido, tal es el caso de los nidos en los árboles T14 y S1.

Los dos análisis implementados en este estudio para determinar la estructura social de *Philidris myrmecodiae* permitieron hacer una comparación genética entre individuos pertenecientes al mismo nido (nidos con más de cinco individuos) y entre individuos pertenecientes a diferentes nidos (un individuo por planta) (ver resultados), este último análisis fue menos preciso ya que solo se cuenta con un individuo por colonia.

El número de reinas observado para cada nido reveló que *P. myrmecodiae* tiene una estructura de tipo poliginia con más de una reina por colonia. Esta característica está presente en varias especies de hormigas, tal es el caso de *Pseudomyrmex peperi*, una especie de hormiga que habita plantas mirmecófagas del género *Acacia* (Kautz *et al.*, 2009) y de otras especies como *Hypoponera bondroiti*, *Cardiocondyla wroughtonii*, *Technomyrmex albipes* (Yamauchi & Ogata, 1995), *Cataglyphis niger* y *Formica rufa* (Lenoir *et al.*, 2009), por mencionar algunas. Esta característica promueve la supervivencia de la colonia, al asociarse varias reinas en una misma colonia, todas pueden contribuir a la descendencia, reduciendo el grado de parentesco entre los descendientes, y con ello el aumento del altruismo reproductivo entre parientes con un alto parentesco (Hamilton, 1964). Mientras que la monoginia (presencia de una reina por nido) está asociada con la fundación de una colonia de forma independiente, vuelos nupciales y formación de nuevos nidos lejos del nido materno, manteniendo una mayor dispersión; la poliginia se asocia con la fundación colonial dependiente, en la que la nueva reina se desplaza caminando con un grupo de obreras y crías para fundar una nueva colonia cerca del nido de origen (Higashi & Yamauchi, 1979).

Recordando que *P. myrmecodiae* habita en plantas epifitas en diferentes árboles y el tamaño de estas plantas es muy variante de acuerdo a la edad de éstas, algunas

son realmente grandes (llegando a medir hasta 1 metro; Huxley, 1978) donde pueden vivir hasta cientos de miles de hormigas. El espacio es un factor muy limitante en el caso de plantas pequeñas y colonias muy grandes (Maeyama & Matsumoto, 2000). Estas hormigas rara vez dejan la planta hospedera del género *Myrmecodia* e *Hydnophytum* ya que su vida se completa dentro de esta, pero el espacio es muy reducido a diferencia de otros árboles tropicales mirmecófitos como *Macaranga* que alberga la especie de hormiga *Crematogaster* (Heil *et al.*, 2012). Esta planta tiene mucho espacio en sus lagos troncos y ramas; otra es la planta *Cecropia* que alberga hormigas del género *Azteca* (Dejean *et al.*, 2009), la cual también cuenta con ramas muy largas donde las hormigas pueden desplazarse libremente. Por lo tanto *P. myrmecodiae* puede necesitar varias plantas para mantener el tamaño de la gran colonia, además de que existe una alta competitividad entre ellas por el espacio, recursos de alimentación y refugio.

Por otro lado, la poliandria en hormigas también juega un papel muy importante dentro de la estructura social. Las reinas al tener múltiples apareamientos, aumentan la heterogeneidad genética dentro de la colonia (López & Ramón, 2010). Lamentablemente no se cuenta con antecedentes sobre poliandria en hormigas del género *Philidris*. En los resultados obtenidos en este análisis, se encontró que *Philidris* tiene un rango de 1-7 machos por apareamiento. Comparando estos resultados con estudios realizados por Pamilo (1993), que mediante el análisis de 6 loci polimórficos para determinar la paternidad de hormigas de la casta obrera de la especie *Formica aquilonia*, reportó que el nivel de poliandria en hormigas es de 1-6 machos por apareamiento, los resultados obtenidos en este estudio resultaron similares. La poliandria es relativamente común en algunos grupos de hormigas y está reportada en hormigas pertenecientes a los géneros *Formicidae*, *Myrmicinae* y algunos géneros de las subfamilias *Ecitoninae* y *Dorylinae* (Franks *et al.*, 1991; Pamilo 1993; Pfeiffer *et al.*, 2003; Kronauer *et al.*, 2007,) y en las especies con organización altamente especializada, tal es el caso de la hormiga cortadora de hojas de los géneros *Acromyrmex* y *Atta* (Kronauer *et al.*, 2007).

Las observaciones obtenidas sobre la estructura social de *Philidris myrmecodiae* en este análisis permitió completar el único estudio sobre el sistema colonial de *Philidris sp.* que vive en plantas del género *Hydnophytum* (*Rubiacea: Hydnophytinae*) de un manglar en Papúa Nueva Guinea, mediante test de agresividad, en el cual sugieren que *Philidris sp.* ocupó varias plantas en varios árboles del manglar y que las colonias solo estuvieron encabezadas por una reina, teniendo una estructura de tipo monoginia. A diferencia de los resultados reportados en el año 2000, en el presente estudio se obtuvo que *Philidris* mantiene una estructura de tipo poliginia, manteniendo más de una reina por colonia, por lo tanto es necesario hacer más análisis basados en datos moleculares y de comportamiento para corroborar ambos resultados y poder tener un estudio más completo.

## VI) Conclusiones

- La filogenia que se obtuvo de las secuencias de individuos de género *Philidris*, nos mostró que la especie *P. cordata* se separa del linaje de Melanesia. La especie *P. nagasau* únicamente se encuentra reportada para la localidad de Fiyi y la filogenia confirmó que este linaje es único para esta isla.

En base a esta filogenia pudimos identificar que la especie *P. myrmecodiae nigriventris* perteneciente a las Islas Salomón proviene de un antepasado originario de Nueva Guinea, pero aún faltan muchos datos por revisar sobre la distribución de estas hormigas; por lo tanto sugerimos que es necesario hacer una revisión taxonómica para complementar resultados en esta primera filogenia del género *Philidris*.

- En el análisis de las secuencias de ADN de muestras de museo de la especie *P. myrmecodiae nigriventris*, se encontró que solo tres individuos presentan polimorfismos con respecto a la secuencia del individuo moderno; se puede inferir que estos cambios fueron causados por movimiento poblacional, extinción local o algún otro factor que pueda estar afectando estas poblaciones. Se sugiere hacer un análisis con un mayor número de secuencias modernas y de museo para tener un mayor soporte en el análisis.
- Analizando la estructura social de las colonias de *Philidris myrmecodiae*, se obtuvo que presenta una estructura de tipo poliginia al presentar más de una reina por colonia y de tipo polidomia, encontrado que una colonia ocupa más de un nido-planta. Además de que una reina puede tener múltiples apareamientos teniendo como ventaja el aumento de la variabilidad genética de la descendencia.

## VII) Perspectivas

- Para completar la historia filogenética del género *Philidris*, sugerimos hacer una revisión taxonómica más a fondo de las especies que aún no se encuentran bien descritas para la región Indo-Australiana.
- El protocolo de extracción de ADN para muestras de museo descrito en este proyecto puede ser de mucha ayuda para complementar algunos de los estudios filogenéticos, taxonómicos y de genética poblacional que se están realizando actualmente.
- Sugerimos hacer una comparación de las secuencias obtenidas de muestras de museo con un mayor número de secuencias de individuos modernos, con el fin de identificar si los SNP encontrados están presentes en otros individuos.
- Debido a que no existen muchos trabajos sobre la estructura social y poblacional de la especie *P. myrmecodiae*, sería de gran interés complementar los resultados obtenidos en este proyecto con observaciones realizadas en campo con el fin de contribuir al entendimiento del modo de vida de ésta y otras especies del género *Philidris*.
- Sería de gran interés identificar si la estructura social que presenta *P. myrmecodiae* varía a lo largo de un gradiente altitudinal, lo cual nos puede proporcionar información sobre las condiciones ecológicas que favorecen a estas sociedades de insectos.

## VIII) Literatura citada

Armbrecht, I., E. Jiménez, G. Álvarez, P. Chacón y H. Armbrecht. 2001. An ant mosaic in the Colombian rain forest of Chocó (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 37:491-509.

Baccini Jr. M., Solomon S. Mueller G. Martins V., Carvalho A. Vierira L. Silva-Pinhati A. 2009. Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta Fabricius* (Formica:Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 427-437.

Balloux, F. y N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol.* 11(2):155–65.

Beheregaray, L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol.* 17:3754–3774.

Bourke, A.F.G. and Franks, N.R. 1995. Social evolution in ants. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Butler IA, Siletti K, Oxley PR, Kronauer DJC. (2014). Conserved Microsatellites in Ants Enable Population Genetic and Colony Pedigree Studies across a Wide Range of Species. *PLoS ONE* 9(9): e107334. doi:10.1371/journal.pone.0107334.

Cann Rebecca L., Stoneking Mark y Wilson Allan. 1987. El AND mitochondrial y la Evolución Humana, *Nature.* 325:31-36.

Charruau, P., C. Fernandes, P. Orozco-Terwengel, J. Peters, L. Hunter, H. Ziaie, A. Jourabchian, H. Jowkar, G. Schaller, S. Ostrowski, P. Vercammen, T. Grange, C. Schlötterer, A. Kotze, E.-M. Geigl, C. Walzer, y P.A. Burger. 2011. Phylogeography, genetic structure and population divergence time of cheetahs in Africa and Asia: evidence for long-term geographic isolates. *Mol Ecol.* 20(4):706–24

Crozier RH and Pamilo P. 1996. Evolution of social insect colonies. Oxford University Press, Oxford.

Davidson DW, McKey D. 1993. The evolutionary ecology of symbiotic ant–plant relationships. *Journal of Hymenoptera. Research*, 2, 13–83.

Debout G, Schatz B, Elias M, McKey D. 2007. Polydomy in ants: what we know, what we think we know, and what remains to be done. *Biological Journal of the Linnean Society*, 90, 319–348.

Deneuborg, J. L. and S. Goss. 1989. Collective patterns and decision-making. *Ethology Ecology and Evolution*, 1: 295-311.

Dejean, A., Grangier, J y col. 2009. Predation and aggressiveness in host plant protection: a generalization using ants from the genus *Azteca*. *Naturwissenschaften*. 96 (1); 57 – 63.

Domínguez Domínguez, O. & Vázquez–Domínguez, E., 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32.1: 59–70.

Duffy, J.E. 2003. *The ecology and evolution of eusociality in spongedwelling shrimp*. In *Genes, Behavior, and Evolution in Social Insects*. University of Hokkaido Press, Sapporo, Japan, 217-254.

Éstoup A, Solignac M, Cornuet JM. 1994. Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proceedings of the Royal Society London, Series B*, 258: 1-7.

Feldhaar H, Fiala B, bin Hashim R, Maschwitz U .2000. *Maintaining an ant–plant symbiosis: secondary polygyny in the Macaranga triloba-Crematogaster sp. association*. *Naturwissenschaften*, 87, 408–411.

Fernández F. & Sendoya. 2004. List of Neotropical ants (Hymenoptera: Formicidae). *Biota colombiana*, 5 (1): 3-93.

Fernández E. Ignacio. 1999. Evolucion de la euscialidad en los insectos. EBC, Department of Conservation Biology and Genetics, Uppsala University. *Bol. S.E.A.*, 26: 713-726.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R.C., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3, 294–299

Franks R., Gomez N., Goss J., Deneubourg L. 1991. The blind leading the blind in army ant raid patterns: Testing a model of self-organization (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Behaviour.* 5: 583-607.

Freeland, J.R. 2005. Molecular Ecology. John Wiley and Sons, Inc. Gran Bretaña. 373p.

Goropashnaya A. Fedorov V. Seifert B. y Pamilo P. 2007. Phylogeography and population structure in the ant *Formica exsecta* (Hymenoptera: Formicidae) across Eurasia as reflected by mitochondrial DNA variation and microsatellites. *Annales Zoologici Fennici.* 2450: 462-474.

Hall Thomas.1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Department of Microbiology, North Carolina State University. *Nucleic Acids Symposium Series* No. 41, 95-98.

Hamilton, W. D.1964. The genetical evolution of social behavior. *I. J. Theor. Biol.* 7: 17-32.

Heil M, Hilpert A, Fiala B, bin Hashim R, Strohm E, Zotz G, Linsenmair KE. 2002. Nutrient allocation of *Macaranga triloba* ant plants to growth, photosynthesis, and indirect defence. *Funct. Ecol.* 16: 475-483.

Heil M.,Orona D.,Eilmus S.,Kautz S.,Gonzalez M. (2009). Chemical communication and coevolution in an ant–plant mutualism. Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV-Irapuato. *Review Paper. Chemeology* 20:63–74 DOI 10.1007/s00049-009-0036-4.

Hebert P., A. Cywinska, S. Ball & J. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 313–322.

Higashi S, Yamauchi K. 1979. Influence of a supercolonial ant *Formica* (*Formica*) *yessensis* Forel on the distribution of other ants in Ishikari coast. *Japanese Journal of Ecology*, 29, 257–264.

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.

Hölldobler Bert & Wilson Edward O. 2009. The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies. Recuperado de [https://books.google.com.mx/books?id=W66DAwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=W66DAwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

Huxley Camilla R. 1978. The ant-plant *Myrmecodia* and *Hydnophytum* (Rubiaceae), and the relationships between their morphology, ant occupants, physiology and ecology. *New Phytol.* 80, 231-268.

Janzen DH .1975. *Pseudomyrmex nigropilosa*: a parasite of a mutualism. *Science*, 188, 936–937.

Jaffé C. Klaus. 1993. El Mundo de las Hormigas. Universidad Simon Bolivar, editorial Equinoccio.

Jones Owen R. and Wang Jinliang. 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. Institute of Zoology, Zoological Society of London, London. *Molecular Ecology*, 10,551-555.

Katsusuke Yamauchi and Kazuo Ogata. 1995. Social Structure and Reproductive Systems of Tramp Versus Endemic Ants (Hymenoptera: Formicidae) of the Ryukyu Islands. *Pacific science*, 49, 1: 55-58.

Kautz S., Pauls S.U. Ballhorn D.J., Lumbsch H.T. & Heil M. 2009. Polygynous supercolonies of the acacia-ant *Pseudomyrmex peperi*, an inferior Colony founder. *Molecular Ecology* 18, 5180-5194.

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas, Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer C., Ashton B., Meintjes P., and Drummond A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, vol. 28 no. 12 2012, pages 1647–1649.

Kingman J.F.C. 1982. On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability* 19A:27-43.

Kronauer D.J.C., Johnson R.A. and Boomsma J.J. 2007. The evolution of multiple mating in army ants. *Evolution* 61: 413-422.

Kumar, Masatoshi Nei, Joel Dudley and Koichiro Tamura. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics*. 9: 4. 299-306.

Leston, D. 1978. A Neotropical ant mosaic. *Annals of the Entomological Society of America*. 71:649-653.

Lenoir A, Aron S, Cerda X and Hefetz A. 2009. Cataglyphis desert ants: a good model for evolutionary biology in Darwin's anniversary year. A review. *Israel Journal of Entomology* 39: 1-32.

Libbrecht Romain & Kronauer J.C. Daniel. 2014. Convergent evolution: The genetics of queen number in ants. Laboratory of Insect Social Evolution, The Rockefeller University, New York, USA. *Current Biology* ISSN: 0960-9822.

Lohaman David J., Mark de Bruyn, Page Timothy, Von Rintelen Kristina, Hall Robert, K. L. Peter, Shig His-Te, Carvalho Gary R. and von Rintelen Thomas. 2011. Biogeography of the Indo-Australian Archipelago. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 42:205-226.

López R. Germán O., Ramón F. 2010. El mundo feliz de las hormigas. Laboratorio de Socioneurobiología; Division de Investigacion, Facultad de medicina. *Revista Especializada en Ciencias Quimico-Biologicas*, 13(1):35-48.

Lush J. 1969. Bases para la selección animal. Buenos Aires: *Ed. Agropecuarias Peri*. 673 p.

Maeyama T. & Matsumoto T. 2000. Colonial system of *Philidris* ants (Formicidae; Dolichoderinae) occupying epiphytic myrmecophytes in a tropical mangrove forest. Department of Biology, Tokyo, Japan. *Tropical Ecology* 41 (2): 209-216.

Nordborg, M., 2000. Coalescent theory. In: Handbook of statistical genetics: 1–37 (D. J. Balding, M. J. Bishop & C. Cannings, Eds). *John Wiley & Sons*, London.

Paulson, G. S. y R. D. Akre. 1991. Behavioral interactions among formicid species in the ant mosaic of an organic pear orchard. *Pan-Pacific Entomologist*.

Peakall, R. and Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.

Pfeiffer M. Chimedregzen L., Ulykpan K. 2003. Community organization and species richness of ants (Hymenoptera-Formicidae) in Mogolia along an ecological gradient from steppe to Gobi desert. *Journal of Biogeography*. 30: 1921-1935.

Pfeiffer I, Volkel I, Taubert H, Brenig B. 2004. Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Sci Int*. 141: 149–151.

Rohland N., Siedel H., Hofreiter M. 2004. Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analysis of museum specimens. *Short Technical reports*. Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Germany.

Rodríguez, F., T. Pérez, S.E. Hammer, J. Albornoz, y A. Domínguez 2010. Integrating phylogeographic patterns of microsatellite and mtDNA divergence to infer the evolutionary history of chamois (genus *Rupicapra*). *BMC evolutionary biology*. 10:222.

Sarnat M. Eli, Blanchard B., Guénard B., Fasi J., Economo P. Evan. 2013. Checklist of the ants (Hymenoptera, Formicidae) of the Solomon Islands and a new survey of Makira Island. *Zookeys* 257:47-88.

Sirvent P, Esteras Gómez C. 2011. Marcadores moleculares basados en PCR: SSR o STR, microsátélites. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, España.

Shattuck O. Steven. 1992. Review of the Dolichoderine and genus *Iridomyrmex mayr* with descriptions of three new genera (Hymenoptera: Formicidae). *J. Aust.*

Shanyi Zhou & Zhemin Zheng. 1977. *Philidris* (Hymenoptera: Formicidae), a genus new to China, with description of a new species. Department of Biology, Guangxi Normal University, China. *Entomologia Sinica* Vol. 5, 136-138.

Sherman Paul W. Jarvis Jennifer U.M., Alexander 1991. The biology of naked-mole rat. *Princeton University Press*.

Wang J. 2004. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics*, 166, 1963–1979.

Wang J, Santure A. 2009. Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics*, 181, 1–16.

Ward Philip S., Brady Sean G., Fisher Brian L. and Schultz Ted R. 2010. *Phyogeny and Biogeography of Dolichoderine Ants: Effects of Data Partitioning and Relict Taxa on Historical Inference*. Oxford University Press. *Society of Systematic Biologist*. 59(3):342-362.

Weir BS & Cockerham CC. (1984). Estimating  $F$ - statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

Wilson, E.O. 1971. The insect societies. *Harvard University Press*.

Wright, S. 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. *The American Naturalist* 56:330-338.

Páginas web

<http://www.alexanderwild.com/Ants/Taxonomic-List-of-Ant-Genera/Philidris>

Ant Web .2015. Familia Formicidae. [http:// www.antweb.org/descripcion.do?family=Formicidae&Rank=family&Project=allanwebants](http://www.antweb.org/descripcion.do?family=Formicidae&Rank=family&Project=allanwebants).

Consultado el 15 Junio del año 2015.

## Apéndices

### Apéndice 1

Número de individuos por planta/ nido. Se indica el nombre de la muestra, árbol al que pertenece, número de planta, latitud y longitud en decimales del sitio de colecta, así como la altitud (metros).

Individuo por planta	Árbol	Planta	Latitud decimales	Longitud decimales	Altitud (m)
EY-YAW12/0917_10	T1	MY-YAW-12/0002	-6.31194444	147.061667	1524
EY-YAW12/0886_4	T1	MY-YAW-12/0003	-6.31194444	147.061667	1524
EY-YAW12/0846	T1	MY-YAW-12/0001	-6.31194444	147.061667	1524
EY-YAW12/0912	T1	MY-YAW-12/0004	-6.31194444	147.061667	1524
EY-YAW12/0921	T1	MY-YAW-12/0005	-6.31194444	147.061667	1524
EY-YAW12/0854_1	T2	MY-YAW-12/0008	-6.315	147.042222	1558
EY-YAW12/0853	T2	MY-YAW-12/0012	-6.315	147.042222	1558
EY-YAW12/0851	T2	MY-YAW-12/0011	-6.315	147.042222	1558
EY-YAW12/0856a	S1	MY-YAW-12/0006	-6.30611111	147.074722	1534
EY-YAW12/0856b	S1	MY-YAW-12/0006	-6.30611111	147.074722	1534
EY-YAW12/0866	T3	MY-YAW-12/0016	-6.30555556	147.045	1567
EY-YAW12/0843	T3	MY-YAW-12/0014	-6.30555556	147.045	1567
EY-YAW12/0913	T3	MY-YAW-12/0015	-6.30555556	147.045	1567
EY-YAW12/0899	T3	MY-YAW-12/0017	-6.30555556	147.045	1567
EY-YAW12/0905_2a	T4	MY-YAW-12/0022	-6.225	147.014444	1761
EY-YAW12/0844_3	T4	MY-YAW-12/0020	-6.225	147.014444	1761
EY-YAW12/0857	T4	MY-YAW-12/0024	-6.225	147.014444	1761
EY-YAW12/0888a	T5	MY-YAW-12/0029a	-6.42083333	147.007222	1743
EY-YAW12/0888b	T5	MY-YAW-12/0029b	-6.42083333	147.007222	1743
EY-YAW12/0889	T6	MY-YAW-12/0034	-6.425	147.017778	1696
EY-YAW12/0891_4a	T6	MY-YAW-12/0033	-6.425	147.017778	1696
EY-YAW12/1028	T8	MY-YAW-12/0040	-6.1775	147.0825	1593
EY-YAW12/0701	T8	MY-YAW-12/0038	-6.1775	147.0825	1593
EY-YAW12/1025	T8	MY-YAW-12/0039	-6.1775	147.0825	1593
EY-YAW12/0914	T8	MY-YAW-12/0042	-6.1775	147.0825	1593
EY-YAW12/0909	T8	MY-YAW-12/0041	-6.1775	147.0825	1593
EY-YAW12/1048	T9	MY-YAW-12/0047	-6.39111111	146.973611	1445
EY-YAW12/0998	T9	MY-YAW-12/0046	-6.39111111	146.973611	1445
EY-YAW12/1026	T9	MY-YAW-12/0045	-6.39111111	146.973611	1445
EY-YAW12/1031	T9	MY-YAW-12/0044	-6.39111111	146.973611	1445
EY-YAW12/1046	T9	MY-YAW-12/0093	-6.39138889	147.085833	1497
EY-YAW12/1052	T10	MY-YAW-12/0049	-6.34888889	146.986667	1415

EY-YAW12/1029	T10	MY-YAW-12/0048	-6.34888889	146.986667	1415
EY-YAW12/1033	T10	MY-YAW-12/0051	-6.34888889	146.986667	1415
EY-YAW12/1040_1	T10	MY-YAW-12/0052	-6.34888889	146.986667	1415
EY-YAW12/0897	T11	MY-YAW-12/0054	-6.36222222	146.936111	1490
EY-YAW12/1030	T11	MY-YAW-12/0056	-6.36222222	146.936111	1490
EY-YAW12/1015	T11	MY-YAW-12/0057	-6.36222222	146.936111	1490
EY-YAW12/1056	T11	MY-YAW-12/0059	-6.36222222	146.936111	1490
EY-YAW12/0908	T11	MY-YAW-12/0055	-6.36222222	146.936111	1490
EY-YAW12/1047	T11	MY-YAW-12/0058	-6.36222222	146.936111	1490
EY-YAW12/1019	T12	MY-YAW-12/0065	-6.33916667	146.967222	1384
EY-YAW12/0968	T12	MY-YAW-12/0064	-6.33916667	146.967222	1384
EY-YAW12/0939	T12	MY-YAW-12/0061	-6.33916667	146.967222	1384
EY-YAW12/1003	T12	MY-YAW-12/0060	-6.33916667	146.967222	1384
EY-YAW12/0977	T12	MY-YAW-12/0063	-6.33916667	146.967222	1384
EY-YAW12/0929	T13	MY-YAW-12/0071	-6.28694444	146.895556	1309
EY-YAW12/0958	T13	MY-YAW-12/0067	-6.28694444	146.895556	1309
EY-YAW12/0979	T13	MY-YAW-12/0069	-6.28694444	146.895556	1309
EY-YAW12/0903	T13	MY-YAW-12/0070	-6.28694444	146.895556	1309
EY-YAW12/0931	T13	MY-YAW-12/0068	-6.28694444	146.895556	1309
EY-YAW12/0865_8	T14	MY-YAW-12/0078	-6.29055556	146.867778	1246
EY-YAW12/0936	T14	MY-YAW-12/0077	-6.29055556	146.867778	1246
EY-YAW12/1013	T14	MY-YAW-12/0074	-6.29055556	146.867778	1246
EY-YAW12/0919	T15	MY-YAW-12/0081	-6.24111111	147.093611	1300
EY-YAW12/1051	T15	MY-YAW-12/0083	-6.24111111	147.093611	1300
EY-YAW12/1032a	T16	MY-YAW-12/0087a	-6.27166667	146.858889	1138
EY-YAW12/1032b	T16	MY-YAW-12/0087b	-6.27166667	146.858889	1138
EY-YAW12/1042	T17	MY-YAW-12/0094	-6.39138889	147.069167	1497
EY-YAW12/0671	T17	MY-YAW-12/0090	-6.39138889	147.069167	1497
EY-YAW12/0686	T17	MY-YAW-12/0091	-6.39138889	147.069167	1497
EY-YAW12/0864a	S3	MY-YAW-12/0018a	-6.29444444	147.041667	1555
EY-YAW12/0864b	S3	MY-YAW-12/0018b	-6.29444444	147.041667	1555
EY-YAW12/0877a	S4	MY-YAW-12/0019a	-6.28111111	147.035556	1556
EY-YAW12/0877b	S4	MY-YAW-12/0019b	-6.28111111	147.035556	1556
EY-YAW12/0885a	S2	MY-YAW-12/0007a	-6.32388889	147.056667	1535
EY-YAW12/0885b	S2	MY-YAW-12/0007b	-6.32388889	147.056667	1535
EY-YAW12/1012a	S5	MY-YAW-12/0072a	-6.28388889	146.870278	1224
EY-YAW12/1012b	S5	MY-YAW-12/0072b	-6.28388889	146.870278	1224

## Apéndice 2

Secuencias de oligos nucleares y mitocondriales para muestras modernas.

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia</b>
Ron_T7	TAATACGACTCACTATAGGGGGATCACCTGATATAGCATTCCC
Nancy_T3	ATTAACCCTCACTAAAGCCTGGTAAAATTAATAAATAAACTTC
LCO_T7	TAATACGACTCACTATAGGGGGTCAACAAATCATAAAGATATTG G
HCO_T3	ATTAACCCTCACTAAAGTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
Ef1αf1_T7	TAATACGACTCACTATAGGGGGCGCCKGCGGCTCTCACCACCGA GG
Ef1αF1_T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGAAGGCCTCGACGCACATMGG
Ef1αF2_T7	TAATACGACTCACTATAGGGGAACGTGAACGTGGTATYACSAT
Ef1αF2_T3	ATTAACCCTCACTAAAGTTACCTGAAGGGGAAGACGRAG
CAD_T7	TAATACGACTCACTATAGGGGGYACCGGRCGTTGYTAYATGAC
CAD_T3	ATTAACCCTCACTAAAGGCCGCARTTNAGRRCRGTGTGYCC

### Apéndice 3

*Reactivos para preparación de buffer para extracción 1 de ADN de muestras de museo.*

*Soluciones stock*

TRIS HCl 1M pH= 8.0

NaCl 1M

CaCl<sub>2</sub> 0.5M

Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%

Ditiotreitol (DTT) 40mM

Proteinasa K 250 mg/ml

Concentraciones finales de reactivos para la preparación del *buffer* de digestión.

<b>Reactivo</b>	<b>Para 5 muestras (200µl)</b>	<b>300µl</b>	<b>4 muestras</b>
SDS 2 %	40µl	60µl	240µl
CaCl <sub>2</sub> 3 mM	1.2µl	1.8µl	7.2µl
NaCl 1 M	2µl	3µl	12µl

TRIS HCL 1M pH 8	20µl	30µl	120µl
DTT 40Mm	1.25mg	1.87µl	7.48µl
Proteinasa K 250 mg/ml	50 mg	75µl	300µl
Volumen total	136.8 µl	128.3µl	513.3µl

#### Apéndice 4

Secuencias de oligos del gen mitocondrial para muestras de museo.

Oligos	Secuencias
LCO-44R	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG- 3'
LCO-84R	5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG- 3'
116-190R	5'ACTCTATCGTAACTAGTCATGCCT- 3'

#### Apéndice 5

Secuencias de oligos utilizados para la amplificación de microsatélites para el género *Philidris*.

Locus	Secuencia del primer (5'-3')	Numero de set	Género <i>Philidris</i>
Loc5	F-AAGTGTCAAGGGCGACTGAG R-CGGGGACAATGGAGCAATCA	1	si
Loc6	F-CGGGTGYTAGTCGTCGCCAT R-GATCAATGCCGCAACGCTAA	1	si
Loc7	F-TCCCGGAGCAGCAATTATCC R-TAGGACAAAATGGAGCCCGC	1	si
Loc41	F-TACGCGGAGAAACGTCTGGT R-GTGATCTAACTTCGATGAAC	1	si
Loc20	F-CAGGCTCGGRACGTTAATGC R-GGTGCCGACGTCTAGCTAGC	2	si
Loc30	F-AGCGTGTGCGACCGTGTAGC R-GCCATATATCATGGCTTGCCAG	2	si
Loc40	F-AGCAGAGACCAATCAACGGA R-GGCAATTATCGGACCGGGTT	2	si
Loc13	F-GACCCACTTTGCCCTCGTAA R-CTCTCGATTAGTCAGGGTGGC	3	si

Loc22	F-TCGGTCCCGTGCCTTCGATT R-GRGGGCGCGTCAAATTTGCT	3	si
Loc23	F-ACTACCCCAATGACGACACG R-CTATGCAGGTGCGGGTGTAT	3	si
Loc25	F-TGGTGTGCGTGTTCGCRAGG R-GACTGCCAACCTACGGACTC	3	si
Loc28	F-AGAATCTCTTGAGCCCGTCG R-GGCGATACACTTCACCTGAGAC	3	si
Loc4	F-CAACCACTTTGGGGCGCGAG RCGAACCTCTTAATGAAATTCTCACC C	4	si
Loc9	FTCATAATGCAGATGATGGAACCTCT R-GGCGAGTAACACAATGGCAC	4	si
Loc15	F-GGGGGATCCGGTAATCCTCT R-TCGCCCTGCAGTTAATGTGT	4	si
Loc17	F-CTCCTGGTCCTGGATCTCCA R-TAACACCATGCCCTCTGTCTG	4	si

### Apéndice 6

Análisis estadístico del pedigrí de los individuos analizados en el programa COLONY. Numero de clústeres encontrados, probabilidad, ID de cada individuo, ID de la línea paterna y materna, número de árbol y nido (planta hospedera).

Clúster	Probabilidad	ID individuo	ID padre	ID madre	Árbol	Nido/Planta
1	0.9948	p917_1	* 1	#1	1	MY-YAW-12/0002
1	0.9948	p917_2	* 1	#1	1	MY-YAW-12/0002
1	0.9948	p917_3	* 1	#1	1	MY-YAW-12/0002
1	0.9948	p917_5	* 1	#1	1	MY-YAW-12/0002
1	0.9948	p917_6	* 1	#1	1	MY-YAW-12/0002
1	0.9948	p917_7	* 1	#1	1	MY-YAW-12/0002
1	0.9948	p0886_4a	*5	#1	1	MY-YAW-12/0003
1	0.9948	p0886_7	*1	#1	1	MY-YAW-12/0003
2	0.9652	p917_4	*2	#2	1	MY-YAW-12/0002
2	0.9652	p917_9	*4	#2	1	MY-YAW-12/0002
2	0.9652	p917_10	*2	#2	1	MY-YAW-12/0002

2	0.9652	p0886_9a	*4	#2	1	MY-YAW-12/0003
2	0.9652	p0886_10	*6	#2	1	MY-YAW-12/0003
2	0.9652	p0886_8	*6	#2	1	MY-YAW-12/0003
2	0.9652	p0886_9b	*8	#2	1	MY-YAW-12/0003
3	0.9672	p917_8	*3	#3	1	MY-YAW-12/0002
3	0.9672	p0886_4b	*3	#3	1	MY-YAW-12/0003
3	0.9672	p0886_5	*3	#3	1	MY-YAW-12/0003
3	0.9672	p0886_7a	*3	#3	1	MY-YAW-12/0003
3	0.9672	p0886_7	*3	#3	1	MY-YAW-12/0003
3	0.9672	p0886_1	*3	#3	1	MY-YAW-12/0003
4	0.9874	p0886_6	*7	#4	1	MY-YAW-12/0003
5	1	p0854_1a	*9	#5	2	MY-YAW-12/0008
5	1	p0854_1b	*9	#5	2	MY-YAW-12/0008
5	1	p0854_2b	*9	#5	2	MY-YAW-12/0008
5	1	p0854_1b	*10	#5	2	MY-YAW-12/0008
5	1	p0854_1	*10	#5	2	MY-YAW-12/0008
5	1	p0854	*9	#5	2	MY-YAW-12/0008
5	1	p0854_3	*9	#5	2	MY-YAW-12/0008
6	0.9996	p0905_1a	*11	#6	4	MY-YAW-12/0022
6	0.9996	p0905_2a	*11	#6	4	MY-YAW-12/0022
6	0.9996	p0905_2b	*15	#6	4	MY-YAW-12/0022
6	0.9996	p0905_3a	*11	#6	4	MY-YAW-12/0022
6	0.9996	p0905_3b	*11	#6	4	MY-YAW-12/0022
7	0.9989	p0905_3	*12	#7	4	MY-YAW-12/0022
7	0.9989	p0905_4a	*12	#7	4	MY-YAW-12/0022
7	0.9989	p0891_3a	*12	#7	4	MY-YAW-12/0022
9	0.9414	p0905_1b	*14	#9	4	MY-YAW-12/0022
9	0.9414	p0905_4b	*16	#9	4	MY-YAW-12/0022
9	0.9414	p0905_5b	*17	#9	4	MY-YAW-12/0022
10	0.7858	p0891_2a	*18	#10	6	MY-YAW-12/0033
10	0.7858	p0891_3b	*18	#10	6	MY-YAW-12/0033

10	0.7858	p0891_9	*19	#10	6	MY-YAW-12/0033
12	0.7385	p0889_6	*24	#12	4	MY-YAW-12/0022

## Apéndice 7

Valores de heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) para los sitios de muestreo en cada uno de los loci. Los valores en negrita indican desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0.05$ ).

	loc41	loc7	loc6	loc5	loc40	loc20	loc30	loc28	loc22	loc25	loc23	loc13	loc9	loc4	loc17	loc15
	<b>Ho</b>	<b>1.000</b>	1.000	<b>0.000</b>	0.000	0.800	1.000	0.000	0.200	0.600	0.800	0.400	0.600	0.600	0.800	1.000
op1	<b>He</b>	<b>0.660</b>	0.760	<b>0.320</b>	0.000	0.760	0.660	0.000	0.180	0.580	0.640	0.480	0.500	0.620	0.760	0.740
	<b>Ho</b>	0.500	0.750	0.250	0.000	1.000	1.000	0.250	0.500	1.000	0.500	1.000	0.250	1.000	1.000	1.000
op2-1	<b>He</b>	0.625	0.750	0.219	0.000	0.750	0.781	0.219	0.375	0.781	0.688	0.688	0.219	0.688	0.750	0.750
	<b>Ho</b>	1.000	1.000	<b>0.250</b>	1.000	1.000	1.000	0.750	0.500	1.000	1.000	0.750	0.500	0.750	1.000	1.000
op3-3	<b>He</b>	0.625	0.625	<b>0.219</b>	0.500	0.500	0.625	0.469	0.375	0.625	0.625	0.469	0.375	0.469	0.500	0.625
	<b>Ho</b>	1.000	1.000	0.000	<b>0.000</b>	<b>1.000</b>	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	0.000	<b>1.000</b>	1.000
op4	<b>He</b>	0.500	0.500	0.000	<b>0.000</b>	<b>0.500</b>	0.500	0.000	0.500	0.500	0.500	0.000	0.500	0.000	<b>0.500</b>	0.500
	<b>Ho</b>	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	1.000
op5	<b>He</b>	0.500	0.500	0.000	0.000	0.500	0.500	0.000	0.500	0.500	0.500	0.000	0.500	0.000	0.500	0.500
	<b>Ho</b>	1.000	1.000	0.500	0.500	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
op6	<b>He</b>	0.500	0.625	0.375	0.375	0.500	0.500	0.000	0.500	0.500	0.625	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
	<b>Ho</b>	1.000	0.600	0.600	0.000	1.000	0.000	0.200	1.000	0.600	1.000	1.000	0.200	1.000	1.000	0.200
op7	<b>He</b>	0.500	0.420	0.420	0.000	0.580	0.000	0.180	0.500	0.420	0.620	0.620	0.180	0.620	0.500	0.180
	<b>Ho</b>	<b>0.800</b>	1.000	0.800	0.000	0.800	0.600	0.000	<b>0.400</b>	1.000	1.000	0.800	0.400	0.200	<b>0.800</b>	0.200
op8	<b>He</b>	<b>0.720</b>	0.660	0.480	0.000	0.640	0.660	0.000	<b>0.320</b>	0.720	0.680	0.640	0.320	0.340	<b>0.640</b>	0.420
	<b>Ho</b>	1.000	1.000	0.500	0.250	0.750	0.250	0.500	0.750	1.000	0.750	0.750	0.500	<b>1.000</b>	0.750	0.250
op9	<b>He</b>	0.813	0.844	0.500	0.219	0.688	0.406	0.375	0.469	0.688	0.781	0.656	0.375	<b>0.813</b>	0.688	0.656
	<b>Ho</b>	1.000	1.000	0.833	0.000	1.000	<b>0.500</b>	0.000	0.167	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.833
op10	<b>He</b>	0.569	0.611	0.486	0.000	0.569	<b>0.597</b>	0.000	0.153	0.569	0.694	0.625	0.000	0.653	0.569	0.486
	<b>Ho</b>	1.000	1.000	0.600	0.000	0.800	0.400	0.000	0.800	1.000	0.800	0.400	0.000	<b>1.000</b>	1.000	<b>1.000</b>
op11	<b>He</b>	0.580	0.580	0.500	0.000	0.700	0.560	0.000	0.480	0.580	0.720	0.340	0.000	<b>0.500</b>	0.620	<b>0.500</b>
	<b>Ho</b>	0.400	1.000	<b>1.000</b>	0.400	1.000	0.600	0.000	<b>1.000</b>	0.800	1.000	0.250	0.400	1.000	1.000	1.000
op12	<b>He</b>	0.320	0.580	<b>0.500</b>	0.320	0.620	0.420	0.000	<b>0.500</b>	0.540	0.580	0.219	0.320	0.580	0.620	0.620
	<b>Ho</b>	0.667	1.000	0.000	0.667	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000
op13	<b>He</b>	0.667	0.500	0.000	0.444	0.500	0.500	0.500	0.000	0.611	0.625	0.500	0.500	0.000	0.500	0.500
	<b>Ho</b>	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.500	0.000	0.000
op14	<b>He</b>	0.625	0.500	0.000	0.000	0.000	0.375	0.000	0.500	0.500	0.625	0.500	0.500	0.375	0.000	0.000
	<b>Ho</b>	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000
op15	<b>He</b>	0.000	0.500	0.000	0.000	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.000	0.000	0.500	0.000

	Ho	0.667	0.333	1.000	0.000	0.667	1.000	0.333	0.333	1.000	1.000	1.000	0.000	0.667	0.667	0.333	0.667
op16	He	0.611	0.278	0.500	0.000	0.500	0.778	0.278	0.278	0.500	0.611	0.500	0.000	0.444	0.500	0.278	0.611
	Ho	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000
op17	He	0.500	0.500	0.000	0.000	0.500	0.500	0.500	0.000	0.000	0.500	0.500	0.000	0.500	0.500	0.500	0.500
	Ho	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000
op18	He	0.500	0.500	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.500	0.750	0.500	0.500	0.000	0.000	0.500	0.500
	Ho	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000
op19	He	0.500	0.000	0.500	0.000	0.500	0.500	0.500	0.000	0.000	0.500	0.500	0.000	0.500	0.500	0.500	0.500
	Ho	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000
op20	He	0.500	0.500	0.500	0.000	0.500	0.500	0.000	0.000	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.000	0.500

## Apéndice 8

Valores de  $F_{IS}$ , y  $F_{IT}$  para el total de individuos pertenecientes a los grupos (árboles) para cada locus y combinando todos los loci.

Locus	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
loc41	-0.559	-0.029	0.34
loc7	-0.619	-0.086	0.329
loc6	-0.495	0.053	0.366
loc5	-0.516	0.433	0.626
loc40	-0.608	-0.043	0.351
loc20	-0.497	0	0.332
loc30	-0.714	-0.178	0.313
loc28	-0.738	-0.098	0.368
loc22	-0.681	-0.102	0.345
loc25	-0.51	-0.055	0.301
loc23	-0.662	0.032	0.418
Loc13	-0.65	-0.005	0.391
Loc9	-0.558	0.067	0.401
Loc4	-0.653	-0.052	0.364

Loc17	-0.578	0.073	0.413
Loc15	-0.546	-0.008	0.348

## Apéndice 9

Resultados del análisis BAPS, asignación de clústeres para el análisis espacial por individuos

- Cluster 1: {1, 2, 4, 5, 33}
- Cluster 2: {3, 6, 8}
- Cluster 3: {11, 12, 13, 14}
- Cluster 4: {15, 16, 17}
- Cluster 5: {18, 19, 64, 65}
- Cluster 6: {20, 21}
- Cluster 7: {7}
- Cluster 8: {22, 23, 24, 25, 26}
- Cluster 9: {27, 28, 30, 39}
- Cluster 10: {35}
- Cluster 11: {29, 36, 37, 38, 40, 41}
- Cluster 12: {34, 42, 43, 44, 46}
- Cluster 13: {47, 48, 49, 50, 51}
- Cluster 14: {9, 10, 52, 53, 54}
- Cluster 15: {32, 45, 55, 56}
- Cluster 16: {57, 58}
- Cluster 17: {31, 59, 60, 61}
- Cluster 18: {62, 63}
- Cluster 19: {66, 67}
- Cluster 20: {68, 69}

## APROBACION DE EXAMEN FINAL DE GRADO

Asesores

Nombre

Firma

Dr. Rafael Montiel Duarte

---

Dr. Milan Janda

---

Comité evaluador

Dr. Martin Heil

---

Dr. Andrés Moreno Estrada

---