



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Evidencia genética y morfológica de especiación críptica en *Hetaerina americana* (Odonata).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

YESENIA MARGARITA VEGA SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS
Y SUSTENTABILIDAD, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. CARLA GUITIÉRREZ RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE ECOLOGÍA A.C.

DR. MAURICIO RICARDO QUESADA AVENDAÑO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD
MORELIA UNAM.

Cd. Mx. MAYO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Evidencia genética y morfológica de especiación críptica en *Hetaerina americana* (Odonata).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

YESENIA MARGARITA VEGA SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL: DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS
Y SUSTENTABILIDAD, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. CARLA GUITIÉRREZ RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE ECOLOGÍA A.C.

DR. MAURICIO RICARDO QUESADA AVENDAÑO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD
MORELIA UNAM.

Cd. Mx. MAYO, 2016.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 08 de Febrero de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Biológicas** de la alumna **Vega Sánchez Yesenia Margarita** con número de cuenta **514012702**, con la tesis titulada "**Evidencia genética y morfológica de especiación críptica en *Hetaerina americana* (Odonata)**", dirigida por el **Dr. Antonio González Rodríguez**.

Presidente: M. en C. Enrique González Soriano.
Vocal: Dr. Eduardo Ruiz Sánchez
Secretario: Dr. Mauricio Ricardo Quesada Avendaño
Suplente: Dr. Jorge Alberto Contreras Garduño
Suplente: Dra. Carla Gutiérrez Rodríguez

Sin otro particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de abril de 2016


Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

En primer lugar, al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por la beca de manutención otorgada, y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El desarrollo de esta tesis contó con el apoyo económico de: el Laboratorio de Ecología de la Conducta de la Facultad de Biología de la UMSNH a cargo del Doctor Luis Mendoza Cuenca, el presupuesto operativo del Laboratorio de Genética de la Conservación del IIES, y los fondos personales del Doctor Antonio González Rodríguez.

A los miembros de mi comité tutor: Doctor Antonio González Rodríguez, Doctora Carla Gutiérrez Rodríguez y al Doctor Mauricio Ricardo Quesada Avendaño.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A cada ser que de manera directa o indirecta aportaron en mi crecimiento tanto personal como profesional en estos años.

A mi familia, mi base: mi mamá Margarita Sánchez, mi hermana Bakola y a mi hermano Bakando, a Hugo; los amo, y gracias por apoyarme, siempre.

A mis amigos, casi hermanos de Laboratorio de Genética de la Conservación: Nando, Marisa, Mariana, Ricardo (Tec), Gonza, Tamara. Y mis amigos del Laboratorio de Ecología de la Conducta, que, a pesar de que ya no estoy allá, siempre estuvieron de alguna manera en este proceso: Luisa, Peter, Eliot, Selene, Mosqui, Iris. A todos, se les quiere.

A Lucho, por seguir compartiendo su saber conmigo y por su apoyo aún después de la licenciatura.

A George Simons y al Dr. Boris C. Kondratieff por las muestras de *Hetaerina americana* que nos enviaron de EUA, sin duda, sin esos datos el trabajo no habría sido igual.

Al técnico del Laboratorio de Ecología Molecular del IIES, el Doctor Víctor Rocha por su ayuda en la secuenciación de los microsátélites.

Al técnico del Laboratorio de Microscopía de la ENES Morelia, el Doctor Orlando Hernández Cristóbal por su ayuda en la toma de las fotografías de los apéndices caudales utilizando microscopía electrónica.

A los miembros del jurado y revisores: Maestro Enrique González Soriano, Doctor Eduardo Ruíz Sánchez, Doctor Jorge Contreras Garduño y al Doctor Luis Mendoza Cuenca.

A mi tutor, el Doctor Antonio González por haberme recibido en su laboratorio, inclusive cuando mi modelo de estudio no da bellotas. Gracias por el apoyo.

DEDICATORIA

A mi familia, mi razón de seguir y creer que algo mejor es posible.

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
I. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Especiación críptica.	6
1.2. Sistema de apareamiento en odonatos.	8
1.2.1. <i>Comportamiento reproductivo.</i>	8
1.2.2. <i>Sistema de reconocimiento intraespecífico mecánico-sensorial en odonatos.</i>	10
II. ANTECEDENTES	13
2.1. Género <i>Hetaerina</i>.	13
2.1.1. <i>Hetaerina americana.</i>	16
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general.	20
4.1.1. <i>Objetivos particulares.</i>	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Muestreo.	21
5.2. Métodos de laboratorio.	23
5.2.1. <i>Extracción de ADN.</i>	23
5.2.2. <i>Amplificación y secuenciación del ADN mitocondrial.</i>	23
5.2.3. <i>Amplificación de microsatélites nucleares.</i>	23
5.3. Análisis de las secuencias del ADN mitocondrial.	24
5.3.1. <i>Estimación de diversidad y diferenciación genética.</i>	24
5.3.2. <i>Relaciones filogenéticas entre los haplotipos.</i>	25
5.3.3. <i>Estimación de tiempos de divergencia.</i>	25
5.4. Análisis de los datos de microsatélites.	26
5.4.1. <i>Estimación de diversidad genética.</i>	26
5.4.2. <i>Análisis de diferenciación genética.</i>	26
5.5. Datos morfológicos.	27
5.5.1. <i>Morfometría geométrica del cercus superior derecho.</i>	27
VI. RESULTADOS	29
6.1. Análisis del ADN mitocondrial.	29
6.1.1. <i>Diversidad genética y pruebas de neutralidad.</i>	29
6.1.2. <i>Relaciones entre los haplotipos.</i>	30
6.1.3. <i>Estructura genética.</i>	32
6.1.4. <i>Tiempos de divergencia.</i>	33
6.2. Análisis de los microsatélites nucleares.	34
6.2.1. <i>Diversidad genética.</i>	34
6.2.2. <i>Diferenciación genética.</i>	36
6.3. Variación morfológica.	39
6.3.1. <i>Forma del cercus superior derecho.</i>	39
VII. DISCUSIÓN	44
7.1. <i>Hetaerina americana</i>: ¿Complejo de especies crípticas?	44
7.2. Proceso de especiación en odonatos.	52
VIII. CONCLUSIONES	57
LITERATURA CITADA	58
ANEXOS	68
Anexo I.	68
Anexo II.	68
Anexo III.	68

RESUMEN

Las especies crípticas son organismos que incluyen dos o más especies que han sido clasificados como una sola debido, principalmente, a que son similares morfológicamente. En las últimas décadas, gracias a los datos moleculares, el descubrimiento de especies crípticas se ha incrementado, incluyendo diferentes grupos como peces, arácnidos, lepidópteros y odonatos. *Hetaerina americana* (Calopterygidae) es una especie de odonato de amplia distribución que se encuentra en una gran variedad de hábitats; además, muestra considerable variación en el tamaño de la mancha alar y en la morfología de los cerci de los machos. Debido a esto, se han descrito varias sinonimias para la especie (e. g. *H. pseudoamericana*, *H. texana*, *H. californica*, *H. basalis*). A pesar de que *H. americana* ha sido utilizada ampliamente como modelo en estudios de conducta, los patrones de variación genética a nivel poblacional de la especie han sido escasamente analizados, ya que sólo existe un trabajo que incluyó únicamente tres poblaciones. En este estudio, caracterizamos genéticamente 220 individuos adultos, entre machos y hembras, de *H. americana*, los cuales provienen de 37 localidades que van desde Guatemala hasta Canadá, usando un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa I y seis loci de microsatélites nucleares. Además, analizamos la morfología de los cerci de 101 machos usando técnicas de morfometría geométrica. Los resultados de los análisis del ADN mitocondrial muestran la presencia de cuatro haplogrupos y una fuerte estructura filogeográfica. Los datos de los microsatélites indican dos grupos genéticos principales altamente diferenciados. La variación en la morfología de los cerci de los machos muestra, al menos, dos morfos claramente distinguibles, que difieren en la forma del lóbulo medio y en la extensión del margen superior. Estos morfos fueron altamente congruentes con los dos grupos genéticos nucleares. *Hetaerina americana* ha sido tratada como una especie única,

principalmente, por la gran variación de los cerci, la cual se solapa a lo largo de la distribución. Sin embargo, al analizar esta variación sistemáticamente con relación a los datos genéticos, los resultados sugieren que un proceso de especiación críptica se ha llevado a cabo en *H. americana*. Por otro lado, la variación del ADN mitocondrial muestra sólo una congruencia parcial con la morfología y con los microsátélites nucleares, lo que podría ser resultado de un sorteo incompleto de linajes, que es común en especies que han divergido recientemente. Debido a que el patrón no es del todo claro, se recomienda el uso de otro datos (geográficos, ecológicos) para determinar precisamente el número de especies que se encuentran en éste complejo. Finalmente, se discuten los mecanismos asociados al proceso de especiación en odonatos y sugerimos aquellos que podrían estar relacionados a la historia evolutiva de *H. americana*.

Palabras clave: diferenciación genética; morfometría geométrica; cerci; especiación críptica; selección sexual.

ABSTRACT

Cryptic species are organisms that include two or more species that have been classified as a single nominal species because, mainly, they are morphologically similar. In recent years, thanks to molecular data, discovery of cryptic species has been expedited, including organisms as odonates; nevertheless, the mechanisms associated to this process have no been summarized. *Hetaerina americana* is a species that has a wide distribution and can colonize a variety of habitats. It also shows considerable variation in the morphology of the male cerci and the red spot on the wings and, for these reasons, several synonyms have been described (e. g. *H. pseudoamericana*, *H. texana*, *H. californica*, *H. basalis*). Although *H. americana* has been widely used as a model system in behavioral studies, the genetic diversity exhibited within this species has been less documented; to date there is only one analysis that include only three populations. For this study we genetically characterized 220 adult individuals (males and females) of *H. americana* from 37 localities from Guatemala to Canada, using the mitochondrial cytochrome oxidase I gene and six nuclear microsatellites. We also analyzed the morphology of the cercus of 101 males with geometric morphometric techniques. Mitochondrial DNA sequences revealed the presence of four haplogroups and strong phylogeographic structure. Microsatellite data indicated two highly differentiated main genetic groups. The variation in the morphology of the male cerci showed, at least, two clearly distinguishable morphs that differ in the shape of the median lobe and in the extension of the superior ridge, and these were strongly congruent with the two nuclear genetic groups. *Hetaerina americana* has been treated as a single species, mainly because there is considerable variation in the male cerci morphology that overlap along the whole distribution, but when this variation is systematically analyzed with relation to the genetic data the results suggest that a cryptic speciation process has occurred in

H. americana. On the other hand, mitochondrial DNA variation did not show congruence with morphological and nuclear DNA differentiation pattern that could be explained as a result of incomplete lineage sorting due to the probably recent divergence of the putative species. Due that the pattern is not very clear, we recommended the use of another data (geographic, ecological) to determinate the number of species in this complex.

Finally, we explored the mechanisms associated to the speciation process in damselflies and which of these could be related to the evolutionary history of the American Rubyspot.

Key words: genetic differentiation; geometric morphometric; cerci; cryptic speciation; sexual selection.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Especiación críptica.

En las últimas dos décadas, el uso de marcadores genéticos aplicados al análisis de las poblaciones naturales ha tenido varias consecuencias, una de ellas es el reconocimiento de nuevas especies, particularmente de especies crípticas (Bickford et al. 2006), por lo que el número de especies descritas, así como las expectativas en cuanto a la biodiversidad global han crecido de forma importante. Sin embargo, el reconocimiento de especies a partir del uso de marcadores genéticos depende, en parte, de cómo se definan las especies. Por ejemplo, la delimitación de especies putativas con base en únicamente el uso de distancias genéticas ha sido tanto criticado como defendido por diferentes autores (Hebert et al. 2003; Moritz y Cicero 2004; Katz et al. 2015). En este contexto, la combinación de la evidencia genética con otras fuentes de información como son los datos conductuales, morfológicos (caracteres diagnósticos), geográficos y ecológicos, podría permitir realizar de manera más confiable la identificación o descripción de nuevas especies. Por esto, se ha sugerido que la descripción de especies crípticas debe tener un marco integrativo que incluya varios aspectos de las especies putativas y no únicamente datos genéticos (Damm et al. 2010).

Se considera que dos o más especies pueden ser crípticas si éstas son o han sido clasificadas como una única especie nominal, debido a la nula o escasa diferenciación morfológica (Bickford et al. 2006; Pfenninger y Schwenk 2007). Además, estas especies se caracterizan, generalmente, por ocurrir en simpatria, estar aisladas reproductivamente y haber divergido recientemente (Stebbins 1950 en Bickford et al. 2006). Se ha sugerido también que las especies que tienen áreas de distribución muy grandes (e. g. continental, cosmopolita, etc.), suelen ser más ‘susceptibles’ a ser complejos de especies crípticas (Williams et al. 2006; Katz et al. 2015). Sin embargo, el

presentar o no estas características no es una regla para describir a las especies como crípticas.

Se ha sugerido que la especiación críptica está dirigida por mecanismos involucrados en el desarrollo de señales no visuales para el reconocimiento intraespecífico, como pueden ser sonidos, feromonas y señales eléctricas, las cuales no implican cambios morfológicos externos (Bickford et al. 2006). Por ejemplo, Feulner et al. (2006) analizaron genéticamente dos especies simpátricas de peces del género *Campylomormyrus* y encontraron que dentro de *Campylomormyrus numenius* se definieron tres clados con base en marcadores tanto mitocondriales como nucleares, sugiriendo la presencia de tres especies putativas utilizando como criterio las distancias genéticas. Estos tres clados, además, corresponden a tres fenotipos diferentes (coloración y tamaño diferente) en los especímenes adultos (pero indistinguibles en los especímenes juveniles), apoyando la hipótesis de especies diferentes. Por otro lado, estos mismos autores también analizaron las señales eléctricas de estos organismos, que son altamente especie-específicas y que utilizan para comunicarse; y encontraron señales diferentes entre los distintos clados. Por lo tanto, se concluyó que *C. numenius* es un complejo de especies crípticas que están aisladas reproductivamente ya que, aunque son morfológicamente similares en estadios juveniles, presentan señales eléctricas y morfos diferentes en las etapas adultas.

Además de peces, este proceso de especiación se ha registrado en una gran variedad de organismos incluyendo plantas (Grundt et al. 2006), anfibios (Rissler y Apodaca 2007) y una diversidad de invertebrados como tarántulas (Hamilton et al. 2011), efemerópteros (Williams et al. 2006), mariposas (Hebert et al. 2004) y odonatos (Stocks et al. 2005; Damm et al. 2010). Por ejemplo, en odonatos del género *Enallagma*, el estatus taxonómico de varias especies ha sido ampliamente debatido; sin embargo, al

realizar análisis genéticos se encontró congruencia entre los caracteres morfológicos y genéticos, lo que resultó en el reconocimiento de varios complejos de especies crípticas (Stocks et al. 2005; Turgeon et al. 2005). En otro estudio más reciente, realizado por Damm et al. (2010), se analizaron genéticamente varias poblaciones de *Trithemis stictica* en África además de un análisis filogenético de las poblaciones incluyendo otras especies del género. En este caso se encontró que, lo que se creía una especie, es un complejo de especies que además no son especies hermanas (i. e. no tienen un ancestro común) (Fig. 1); lo cual podría implicar un proceso de convergencia morfológica entre las especies crípticas ya que las especies *T. nuptialis* y *T. grouti* que sí son especies hermanas de *T. stictica* son muy diferentes en coloración. Por su parte, los análisis morfológicos mostraron que existen diferencias en las estructuras reproductivas secundarias de los machos (e. g. edeago), por lo que se sugiere que están aisladas reproductivamente (Fig. 1).

El proceso de especiación críptica en odonatos, a pesar de que éstos no presentan métodos de comunicación como sonidos o feromonas, es posible gracias a que estos organismos responden de manera rápida a cambios climáticos además de poseer un sistema de apareamiento complejo lo que puede promover una divergencia de linajes rápida sin cambio morfológico aparente (Turgeon y McPeck 2002; McPeck y Gravilets 2006; Svensson et al. 2006; Damm et al. 2010).

1.2. Sistema de apareamiento en odonatos.

1.2.1. Comportamiento reproductivo.

La biología reproductiva de los odonatos es única y muy compleja, ya que son los únicos insectos en los que, durante la cópula, existen dos puntos de contacto entre hembras y machos. Para esto poseen estructuras reproductivas primarias (apéndices

caudales y placas mesostigmas, protórax) y secundarias (edeago y espermateca, bursa) (Corbet 1962).

En general, se han descrito cuatro etapas para el proceso reproductivo de los odonatos (Fig. 2): 1) El reconocimiento visual (el cual puede ser por cortejo o no), aunque es importante mencionar que esta característica no se presenta en todos los grupos. 2) Formación del tándem. En este paso el macho sujeta a la hembra por el protórax (en los zigópteros) o de la cabeza (en los anisópteros) con ayuda de los apéndices caudales; en esta etapa se lleva a cabo también un reconocimiento que puede ser tanto mecánico como sensorial (ver más adelante) (Robertson y Paterson 1982). 3) En esta etapa, si la hembra acepta copular, y antes de que los genitales tanto femeninos como masculinos se pongan en contacto, el macho transfiere su semen desde el extremo del abdomen hasta la vesícula seminal que está situada en el segundo segmento

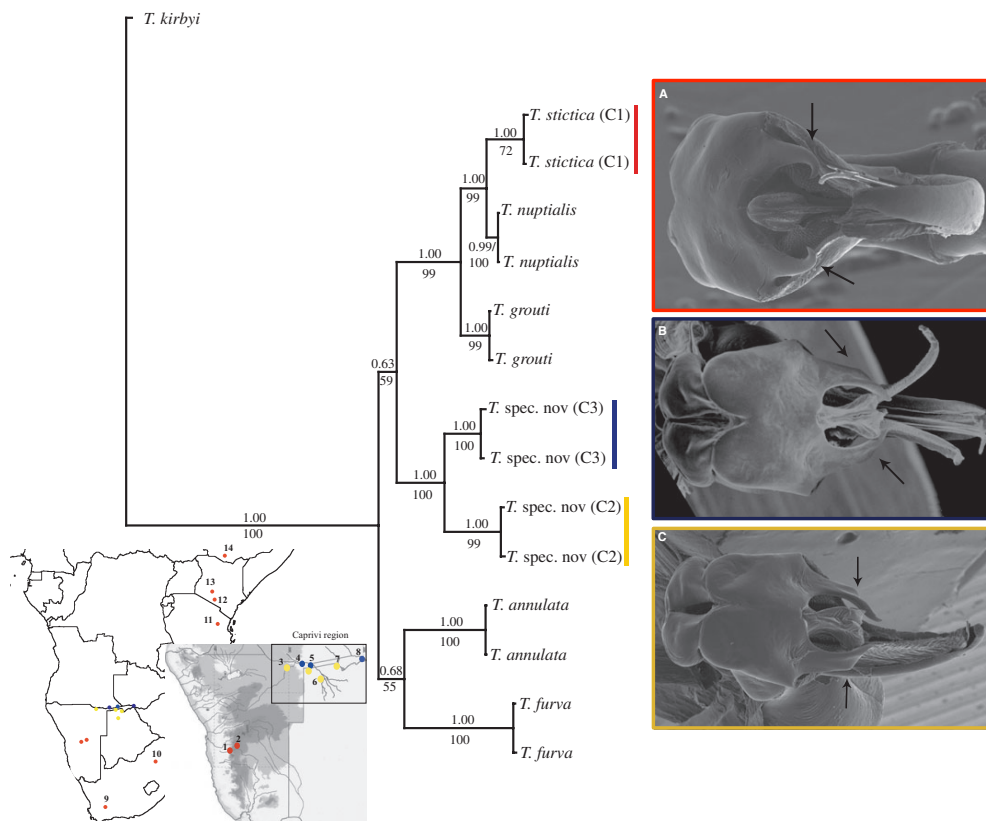


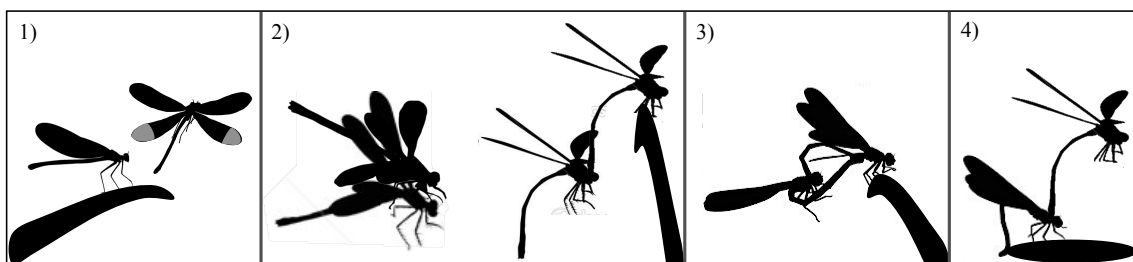
Figura 1. Especiación críptica en *Trithemis stictica*. Se muestran las localidades de colecta así como las relaciones filogenéticas de varias especies del género *Trithemis* con base en un análisis bayesiano de secuencias de Citocromo oxidasa c subunidad I y NADH deshidrogenasa 1. También se muestra la genitalia de cada una de las especies putativas (las flechas señalan las diferencias más importantes). El color rojo representa a *T. stictica* sensu stricto, mientras que los colores azul y amarillo representan a las nuevas especies. Modificado de Damm et al. (2010).

abdominal (translocación espermática). Después, la hembra flexiona el abdomen hacia el segundo segmento abdominal del macho donde se encuentra los genitales secundarios y empieza la cópula per se, la cual tiene dos fases claras (Córdoba-Aguilar y Cordero-Rivera 2005). En la primera, el macho remueve el semen de otros machos mediante movimientos rítmicos (remoción mecánica) y/o por estimulación de las placas vaginales, provocando que la hembra sea la que expulse el semen. La segunda fase de la cópula consiste en la eyaculación del macho. 4) En esta última etapa la pareja viaja, generalmente en tándem, en busca del sitio de oviposición (Fig. 2) (Cobert 1962).

1.2.2. Sistema de reconocimiento intraespecífico mecánico-sensorial en odonatos.

El sistema de reconocimiento de pareja precopulatorio tiene dos funciones principales: primero, identificar una pareja compatible (si es de la misma especie) y, segundo, identificar una pareja de buena calidad (Pfenning 1998).

El sistema de reconocimiento (no visual) en odonatos ha sido atribuido a la compatibilidad estructural y sensorial entre las estructuras reproductivas (primarias y/o secundarias), que concuerdan con la hipótesis de Llave-Cerradura de Dufour (1844 en Masley 2012) y de De Wilde (1964 en Masley 2012). Sin embargo, se ha sugerido que el sistema de reconocimiento mecánico-sensorial relacionado con la forma de los apéndices caudales y de las placas mesostigmas es, si no el más importante, uno de los principales mecanismos implicados en el aislamiento reproductivo precigótico en odonatos que no presentan reconocimiento visual (Paulson 1974; Robertson y Paterson 1982).



Los apéndices caudales están conformados por dos pares de ‘pinzas’: los cerci y paraproctos, los cuales se encuentran en la parte distal del abdomen (Fig. 3), mientras que en las hembras, las placas mesostigmales se encuentran en la parte del tórax y están cubiertas por estructuras sensoriales como los sensilios (e. g. *Simpecma*, *Lestes*, *Ischnura*, *Enallagma*, *Platycnemis*, *Argia*, *Telebasis*, *Coenagrion*, etc.) (Fig. 3) (Loibl 1958 en Masley 2012, Krieger y Krieger-Loibl 1958 en Masley 2012, Paulson 1974, Robertson y Paterson 1982, Battin 1993, Willkommen et al. 2015).

Se ha reportado que si se realizan modificaciones experimentales en la forma y tamaño de los cerci de los machos, se produce el rechazo por parte de las hembras, incluso si los individuos son de la misma especie (Paulson 1974). Sin embargo, Robertson y Paterson (1982) argumentan que el aislamiento mecánico que encuentra Paulson (1974), es una consecuencia secundaria ya que las placas mesostigmales y los cerci presentan sensilios que dejan de entrar en contacto como consecuencia de la modificación artificial de los cerci, y por lo tanto no se da el reconocimiento sensorial, esta idea apoya la hipótesis de que el reconocimiento interespecífico no sólo es mecánico.

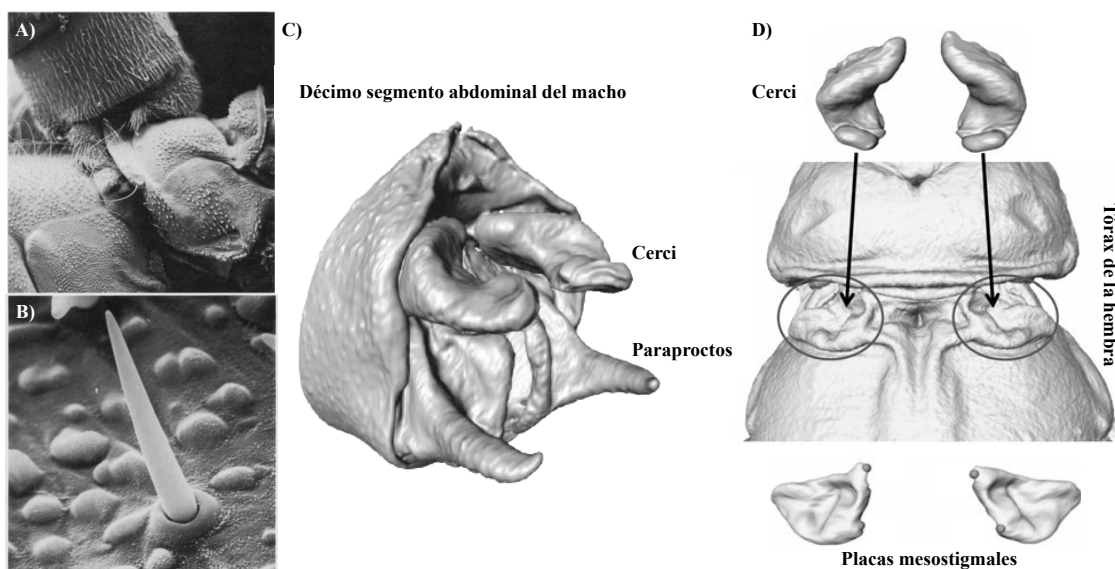


Figura 2. Estructuras del sistema de sujeción en odonatos. A) Acercamiento de la posición de tándem, se aprecia como los apéndices caudales se enganchan entre el tórax y el protórax de la hembra. B) Acercamiento de las estructuras sensoriales que se encuentra en las placas mesostigmales de la hembra (sensilios) con un acercamiento en microscopio electrónico (1700X). C) Estructuras de sujeción de los machos en zygópteros. D) Tórax de una hembra de zigóptero, las flechas indican el lugar donde se ponen en contacto los apéndices caudales con las placas mesostigmales. Tomado y modificado de Robertson y Paterson (1982) y McPeck et al. (2008; 2009).

La evolución de la morfología de los cerci y de las placas mesostigmas está correlacionada en algunas especies, y se sugiere que son uno de los elementos principales en la delimitación de especies tanto taxonómica como biológica (McPeck et al. 2008; 2009; 2010).

Dado que las variaciones de las estructuras reproductivas (primarias y secundarias) en odonatos están relacionadas al aislamiento reproductivo, el analizar especies con una fuerte divergencia en la forma de estas estructuras (pero poca variación en otros rasgos) como las del género *Hetaerina* (Garrison 1990), asociado además a patrones genéticos, podría ayudar a entender el proceso de especiación críptica en este grupo.

II. ANTECEDENTES

2.1. Género *Hetaerina*.

Los odonatos de este género pertenecen a la familia Calopterygidae, la cual se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo (excepto en Australia y la Antártida). *Hetaerina*, está restringido al continente Americano y está conformado por 37 especies. Estos organismos se caracterizan porque los machos presentan conducta territorial así como algún grado de coloración roja y basal en las alas, el cual es un carácter apomórfico y define al género (Fig. 4a) (Garrison 2006).

Las especies de este género son principalmente neotropicales y están ampliamente distribuidas (Garrison 1990, 2006). Sudamérica es el área con mayor riqueza de especies y se ha sugerido que ésta zona es el centro de origen y diversificación del género. Sin embargo, algunos análisis filogenéticos sugieren que las especies que presentan distribuciones más norteñas (e. g. *H. americana*, *H. vulnerata*, *H. cruentata*) son ancestrales con respecto a las especies del sur, lo que sugiere que el género tal vez tenga un origen neártico (Vega-Sánchez et al. en prep). Otro problema interesante dentro del género es la identificación de las especies, debido a que muchas de éstas son muy similares en coloración y distribución. Algunas de las estructuras más importantes para el reconocimiento taxonómico son los apéndices caudales, en el caso de los machos, mientras que para las hembras son los interstenitos, estructuras que se localizan en entre el meso y protórax (Garrison 1990).

En cuanto al sistema de apareamiento, Córdoba-Aguilar et al. (2009) sugieren que *Hetaerina* presenta un sistema de apareamiento tipo lek, es decir, los machos defienden territorios, donde se reúnen, se exhiben y esperan el arribo de las hembras, mientras que éstas sólo llegan a estas áreas con el propósito de copular y no reciben otros recursos de los machos (al menos no previamente a la cópula). Este sistema se ha registrado en

varias especies del género: *H. americana*, *H. vulnerata*, *H. occisa*, *H. miniata* y *H. rosea* (Alcock 1982; Eberhard, 1986; Lefevre y Muehter 2004; Raihani et al. 2008; Peixoto y de Marco 2009).

Cuando los machos establecen territorios tipo leks, éstos exhiben una serie de vuelos ritualizados en los que participan dos o más machos del lek; estos vuelos pueden durar desde segundos hasta horas (Johnson 1962, 1963; Alcock 1982; Lefevre y Muehter 2004; Contreras-Garduño et al. 2008; Peixoto y de Marco 2009). La capacidad de establecer un territorio, el tiempo de permanencia en éste y el éxito reproductivo de los machos se ha relacionado positivamente con las reservas energéticas y el tamaño de los individuos, así como con el tamaño de las manchas alares (las cuales no varían a lo largo de la vida de los organismos) (Grether 1996; 1996b; Switzer 1997; Córdoba-Aguilar et al. 2007; Serrano-Meneses et al. 2007; Contreras-Garduño et al. 2008; Raihani et al. 2008; Guillermo-Ferreira y Del-Claro 2011). Las manchas alares son caracteres secundarios de selección sexual que han evolucionado por interacción macho-macho (durante los vuelos ritualizados) (Córdoba-Aguilar y Cordero-Rivera 2005) y el tamaño de éstas se ha relacionado con la respuesta inmunitaria así como con la capacidad de termorregulación por parte de los machos y por lo tanto con su calidad

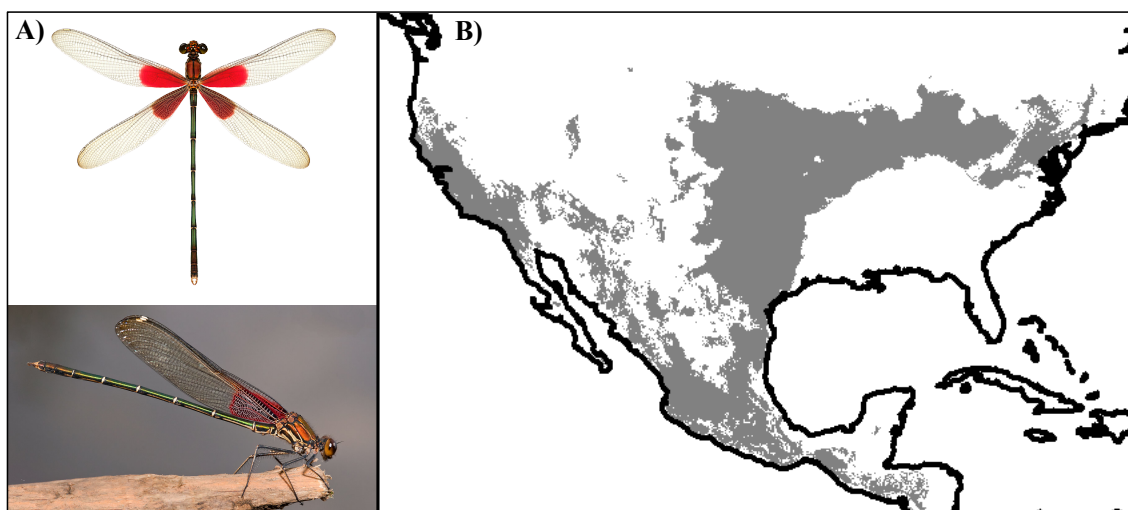


Figura 3. *Hetaerina americana*. A) Individuo macho de *H. americana*, se muestran las manchas alares color rojo que son características del género, además de la coloración del tórax y el abdomen. B) Mapa de distribución potencial para *H. americana* determinado con base a un análisis de modelaje de nicho ecológico (H. Rodríguez-Correa, sin publicar).

(Serrano-Meneses et al. 2007; Contreras-Garduño et al. 2008; Pedraza-Hernández 2010).

A pesar de que existen los vuelos ritualizados, éstos no están asociados al cortejo per se, ya que los vuelos representan interacciones entre machos y no constituyen un despliegue hacia la hembra. Las hembras arriban a los leks y los machos las sujetan, por lo que se ha sugerido que no hay elección de machos por parte de las hembras, sino de territorios (en primera instancia), en relación con que sólo aquellos machos de mayor calidad serán capaces de establecerse en un lek. Una vez que se establece el tándem, si la hembra accede, ocurren las dos fases subsecuentes de la cópula. En la primera, el macho realiza la remoción mecánica del esperma de los machos anteriores, lo que básicamente sucede mediante movimientos rítmicos que retiran el semen de la bursa copulatrix gracias a modificaciones en la cabeza del pene (Alcock 1982; Córdoba-Aguilar 2002). Sin embargo, el semen de la espermateca no puede ser removido (Córdoba-Aguilar 2003). La segunda fase consiste en la eyaculación del macho que generalmente dura unos pocos segundos; en promedio, el proceso total dura de cuatro a cinco minutos (e. g. *H. cruentata* y *H. vulnerata*) (Alcock 1982; Córdoba-Aguilar 1999; 2002; 2003; Córdoba-Aguilar et al. 2003). Al terminar la cópula, el macho y la hembra viajan en tándem fuera del territorio en busca de sitios de oviposición (excepto *H. rosea*, la cual sí defiende territorios que presentan sitios aptos para que la hembra oviposite), para lo cual la hembra se sumerge completamente en el agua y fertiliza los huevos mientras los deposita insertándolos en el tejido de plantas que se encuentran sumergidas. Mientras la hembra oviposita, el macho permanece fuera del agua resguardando a la hembra para evitar que otro macho la capture, copule con ella y remueva su semen. El resguardo post-cópula es común en este género, así como los sitios de oviposición comunales (e. g. *H. americana*, *H. cruentata*, *H. titia*, *H.*

vulnerata) (Bick 1966; Alcock 1982; Córdoba-Aguilar et al. 2007; 2009; Peixoto y de Marco 2009; Guillermo-Ferreira y Del-Claro 2011).

Como parte de este sistema de apareamiento tan complejo, se han descrito además, estrategias alternativas de apareamiento, es decir, que aquellos machos menos capaces de establecer y mantener territorios, ya sea porque presentan baja cantidad de reservas o porque la mancha alar es de menor tamaño, optarán por comportarse como individuos no-territoriales. Se ha sugerido que estas estrategias dependen de las condiciones ambientales, ya sea en función de la calidad y densidad de competidores y/o la cantidad de sitios disponibles para establecerse (Serrano-Meneses et al. 2007; Raihani et al. 2008). Sin embargo, la base genética de estos rasgos nunca se ha analizado.

2.1.1. *Hetaerina americana*.

Hetaerina americana (Fig. 4a) es una de las especies más estudiadas del género y ha sido ampliamente utilizada como modelo en estudios conductuales (Johnson 1962, 1963; Bick y Sulzbach 1966; Grether 1996, b; Contreras-Garduño et al. 2008; Raihani et al. 2008; Córdoba-Aguilar et al. 2009). Esta especie presenta un sistema de apareamiento tipo lek con machos territoriales y no territoriales. Además, en *H. americana* se ha descrito una tercera estrategia que consiste en machos que cambian entre conductas territoriales y no territoriales (switchers); estos organismos presentan condiciones intermedias en cantidad de reservas (Raihani et al. 2008).

Hetaerina americana presenta una de las distribuciones más amplias en el género (Fig. 4b), encontrándose desde Nicaragua hasta el sureste de Canadá, por lo que aparentemente tiene una gran capacidad para colonizar una gran diversidad de hábitats que van desde los bosques de coníferas hasta las selvas tropicales. Se puede encontrar en simpatria con otras especies del género y suele ser la más abundante. *Hetaerina americana* es variable morfológicamente en la forma de los apéndices caudales y en el

tamaño de la mancha alar y debido a esto se han descrito varias sinonimias (e. g. *H. pseudoamericana*, *H. texana*, *H. californica*, etc.) (Garrison 1990).

A pesar de que la información acerca de los aspectos conductuales de esta especie es extensa, hasta la fecha estudios en otros campos, como la genética, son limitados. Vega-Sánchez (2013) realizó el único trabajo previo sobre genética de poblaciones para la especie, en el cual analizó sólo tres poblaciones utilizando como marcador genético tres regiones del ADN ribosomal: el espaciador transcrito interno 1, el gen del ARN ribosomal 5.8S y el espaciador transcrito interno 2 (ITS1-5.8S-ITS2). Las poblaciones estudiadas se encuentran una en Colorado, EUA y dos en México; una en el estado de Veracruz y otra en Oaxaca, con un promedio de nueve individuos cada una. Se encontró que existe una alta diferenciación genética entre las tres poblaciones ($\Phi_{ST} > 0.60$; $P < 0.001$) y se sugiere que esto puede estar dado por la baja dispersión de los organismos como resultado de su conducta territorial. Sin embargo, no se encontró asociación entre las distancias genéticas y geográficas, sugiriendo que además de la conducta territorial, otros factores como las barreras reproductivas, pueden estar influyendo en el aislamiento genético, promoviendo la presencia de especies crípticas (Vega-Sánchez 2013). Además, algunos individuos de una misma población (Veracruz) presentaron distancias genéticas mayores entre ellos que con individuos de otras poblaciones. Con base a lo anterior, se concluyó que es necesario aumentar el muestreo tratando de cubrir la amplia distribución de la especie.

Debido a la variación en los apéndices caudales y a su posible importancia en el proceso de reconocimiento, así como el complejo sistema de apareamiento, y la alta diferenciación genética que existe entre algunas poblaciones, *H. americana* se vuelve un sistema interesante para analizar los patrones de variación genética poblacional y contribuir a esclarecer la historia evolutiva de este grupo. Este es el primer estudio

donde se analizan genética y morfológicamente poblaciones de esta especie a lo largo de toda su distribución.

III. HIPÓTESIS

Dada la alta diferenciación genética previamente encontrada entre algunas poblaciones de *H. americana*, la cual no está asociada con la distancia geográfica, se espera que el aislamiento genético esté asociado con otros aspectos como puede ser la presencia de barreras reproductivas. En este sentido, teniendo en cuenta la variación reportada en la morfología de los apéndices caudales y su importancia en el aislamiento reproductivo, se espera que haya una relación entre las distancias genéticas (y por lo tanto en la diferenciación genética) y la variación morfológica intra e interpoblacional de estas estructuras en la especie. En tal caso, *Hetaerina americana* podría representar un complejo de especies crípticas.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

- Analizar la variación y estructura genética de las poblaciones de *H. americana* mediante marcadores moleculares nucleares y mitocondriales, y evaluar si existe variación morfológica en los cerci y si ésta está asociada a los patrones genéticos.

4.1.1. Objetivos particulares.

- Determinar los valores de diversidad genética dentro de las poblaciones de *H. americana* mediante microsatélites nucleares y secuencias mitocondriales.

- Determinar el nivel de estructuración genética entre las poblaciones de *H. americana* mediante microsatélites nucleares y secuencias mitocondriales.

- Determinar los tiempos de divergencia entre los haplotipos y asociarlos a eventos geológicos-climáticos que pudieron promover la divergencia entre poblaciones/haplotipos.

- Evaluar, mediante morfometría geométrica, si existe variación en la forma de los cerci de los machos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Muestreo.

Se obtuvieron 220 adultos de *H. americana*, los cuales fueron colectados directamente en el campo u obtenidos mediante donación. En total, se obtuvieron muestras de 31 localidades, las cuales se encuentran distribuidas en Guatemala, México y Estados Unidos de América (EUA). Además, se obtuvieron secuencias de la región mitocondrial Citocromo c oxidasa I de la base de datos del Barcode of Life Data (BOLD Systems) o iniciativa de Código de Barras, las cuales provienen de 11 individuos de cinco localidades diferentes ubicadas en EUA y Canadá. En total, 36 poblaciones fueron analizadas, las cuales incluyen de uno a 10 individuos (Fig. 5; Tabla 1).

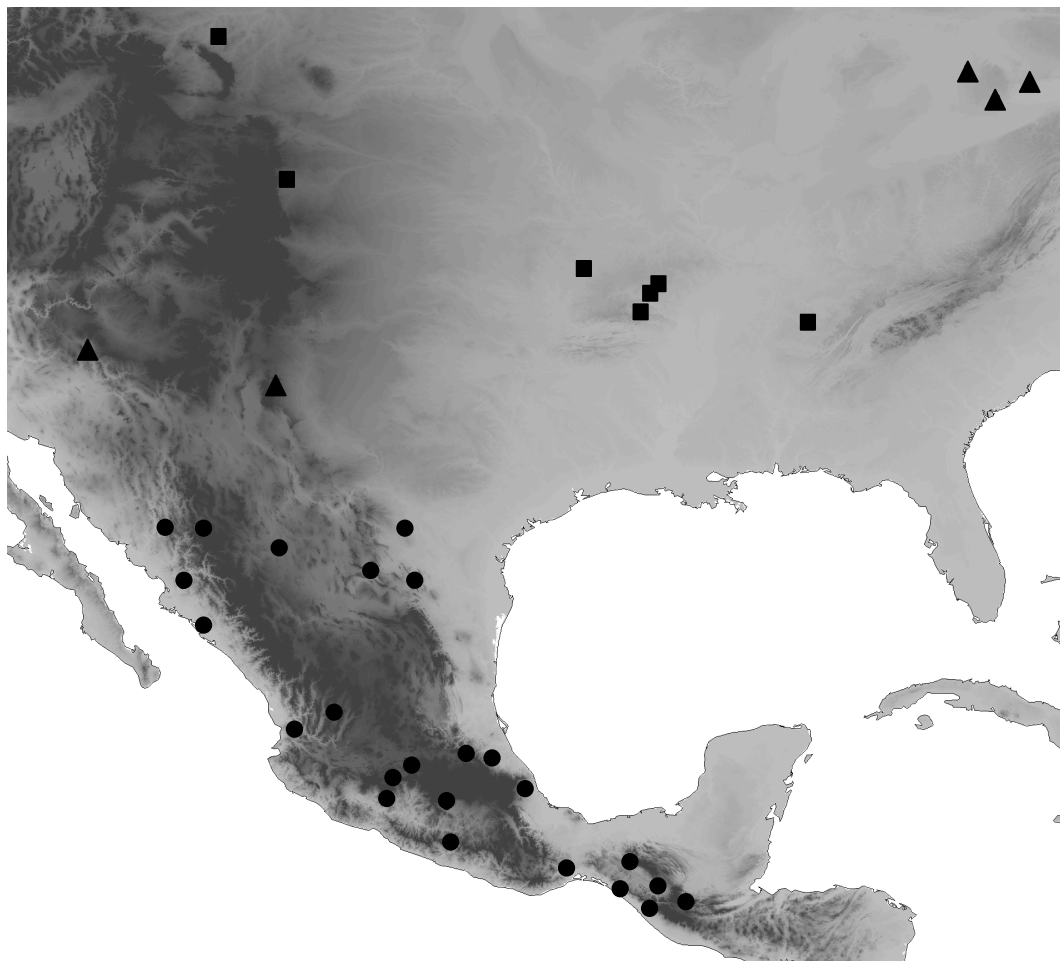


Figura 4. Ubicación de las localidades de muestreo. Referencia geográfica de las 36 localidades utilizadas en este estudio. Los círculos representan localidades muestreadas por nuestro grupo de trabajo, los cuadrados representan las localidades que fueron donadas y, los triángulos representan las localidades a las que pertenecen las secuencias obtenidas de la base de datos de BOLD Systems. En el mapa, la escala de coloración gris representa la altitud, siendo las áreas más oscuras las de mayor altitud.

Para el análisis filogenético, se obtuvieron secuencias de otras especies de *Hetaerina*: *H. laesa*, *H. sanguinea* y *H. titia*, las cuales fueron usadas como grupos externos (Tabla 1).

Tabla 1. Localidades de muestreo y especies utilizadas en este estudio.

Especie	Localidad (abreviación)	País	N	Longitud	Latitud	Número de acceso de GenBank/BOLD
<i>H. americana</i>	Apazapan, Veracruz (Ve)	México	9	-96.721044	19.327447	
	Arroyo Frío, Michoacán (AF)	México	1	-101.45799	19.163265	
	Big Horn County, Montana (BHC)	EUA	2	-107.45367	45.568608	
	Camichines, Nayarit (Ny)	México	10	-104.688813	21.345635	
	Carretera Culiacán-Guamuchil, Sinaloa (Cu)	México	1	-107.855344	25.048578	
	Chiapa de Corzo, Chiapas (CC)	México	10	-93.013803	16.715415	
	Chupicuaro, Guanajuato (Cp)	México	10	-100.687669	20.072121	
	Cocoyotla, Morelos (Co)	México	10	-99.46094	18.75354	
	Comitancillo, Oaxaca (Cm)	México	10	-95.167071	16.490491	
	Crawford County, Kansas (CrC)	EUA	1	-94.65174	37.46924	
	Cuatro Ciénegas, Coahuila (Ct)	México	10	-102.12426	26.92852	
	Douglas County, Misuri (DC)	EUA	2	-92.18117	36.8493	
	El Borbollón, Guerrero (Bo)	México	10	-99.21634	17.412114	
	El Fuerte, Sinaloa (EF)	México	10	-108.621821	26.424746	
	Grand River, Ontario (GR)	Canadá	1	-80.348093	43.382217	TZBCA527
	La Mintzita, Michoacán (Mn)	México	10	-101.274796	19.645084	
	Larimer County, Colorado (LC)	EUA	9	-105.019276	40.557465	
	Lincoln County, Nuevo México (NM)	EUA	2	-105.439	33.526	BBODO017-018
	Maury County, Tennessee (MC)	EUA	2	-86.87155	35.571	
	Momax, Zacatecas (Mo)	México	10	-103.31071	21.94449	
	Nuevo Recuerdo, Chiapas (NR)	México	10	-91.99499	15.90103	
	Ozark County, Misuri (OC)	EUA	2	-92.28699	36.73524	
	Puente Madera, Chiapas (PM)	México	2	-93.33325	15.76587	
	Río Chonchos, Chihuahua (RCh)	México	8	-105.187726	27.71242	
	Río Cuyamiapa, Chiapas (RC)	México	1	-92.437407	15.117529	
	Sacapulas, Quiché (SG)	Guatemala	10	-91.089086	15.290081	
	San Agustín, Hidalgo (SA)	México	4	-98.6425	20.52911	
	San Marcos, Puebla (SM)	México	10	-97.87192	20.39233	
	San Nicolás, Sonora (SN)	México	10	-109.191303	28.429343	
	Saugeen River, Ontario (SR)	Canadá	1	-81.353847	44.41793	ODRMA006
	Searcy County, Arkansas (SC)	México	2	-92.74495	35.98511	
	Tomochic, Chihuahua (To)	México	2	-107.853641	28.353155	
Urban Park, Ontario (UP)	Canadá	4	-79.183184	43.83428	RBINA5564	
Villaldama, Nuevo León (Vi)	México	10	-100.43224	26.49984		
Yavapai County, Arizona (Ar)	EUA	6	-112.024376	34.527138	13622634, 678, 730, 770, 824,866	
Zaragoza, Coahuila (Za)	México	10	-100.91071	28.48658		
<i>H. titia</i>	Puente Madera, Chiapas (PM)	México	2	-93.33325	15.76587	
<i>H. sanguinea</i>	Reserva Tanshiyacu-Tahuayo	Perú	1	-73.402	-4.57	KF369395.1
<i>H. laesa</i>	Sipaliwini (Su)	Surinam	1			KF369394

5.2. Métodos de laboratorio.

5.2.1. Extracción de ADN.

El ADN fue extraído a partir de fibras de músculo torácico (2 mm) utilizando el kit Pure Link Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), siguiendo el protocolo de fábrica. Se corroboró la extracción visualizando 2 µl de ADN diluido en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Syber Safe (Invitrogen), el cual se corrió a 120 volts durante 20 minutos utilizando como buffer TBE al 0.5%.

5.2.2. Amplificación y secuenciación del ADN mitocondrial.

Se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases (pb) del gen mitocondrial Citocromo c oxidasa I (COI) utilizando los oligonucleótidos ODO_LCO1490d y ODO_HCO2198d (Dijkstra et al. 2014). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl usando Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones: tres minutos a una temperatura de 94 °C, seguido de 30-35 ciclos de un minuto a 94 °C, un minuto a 50-58 °C y un minuto a 72 °C, con una extensión final de tres minutos a 72°C. Las temperaturas de alineamiento así como el número de ciclos variaron de acuerdo a la calidad de ADN utilizado. La secuenciación se realizó en la empresa Macrogen (Rockville, MD, EUA).

5.2.3. Amplificación de microsatélites nucleares.

Se amplificaron seis loci de microsatélites (H3, H8, H11, H15, H17 y H22) previamente descritos para *H. americana* (Anderson y Grether 2013). Las PCR se realizaron con Platinum Multiplex PCR Master Mix (Applied Biosystems) con un volumen final de 10 µl. Se hicieron tres grupos de oligonucleótidos dependiendo del

tamaño de los fragmentos amplificados y el tipo de marca fluorescente. El primer grupo estuvo conformado por los loci H8, H11 y H22; el segundo grupo por H15 y H17; y el locus H3 se amplificó por separado. La amplificación se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: tres minutos a 94°C, seguido de 30-35 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 54-58°C, y un minuto a 72°C; con una extensión final a 72°C por tres minutos. Las temperaturas de alineamiento y el número de ciclos variaron dependiendo de la especificidad de cada par de oligonucleótidos así como a la calidad del ADN utilizado. Una vez obtenidos los productos de PCR de cada individuo, se preparó una mezcla de 9 µl de formamida altamente desionizada (Hi-Di) más 0.3 µl de Liz GeneScan 600 (Qiagen) como marcador de peso molecular y 1 µl de producto de PCR. La mezcla se analizó en un secuenciador ABI-PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems). El tamaño de los fragmentos fue asignado en el software Peak Scanner v.2.0 (Applied Biosystems).

5.3. Análisis de las secuencias del ADN mitocondrial.

Se realizaron alineamientos manuales por población usando el software MEGA v.6.0 (Tamura et al. 2013); después se realizó un alineamiento general que incluía todas las secuencias. Se determinaron los modelos de evolución molecular para los diferentes conjuntos de datos, es decir, para las secuencias de *H. americana*, y para el alineamiento que incluía a los grupos externos, esto se realizó con la ayuda del programa jModelTest v.2 (Darriba et al. 2012) tomando en cuenta el criterio de Akaike (AIC) para seleccionar el modelo de evolución.

5.3.1. Estimación de diversidad y diferenciación genética.

Se estimaron los valores de diversidad genética calculando el número de haplotipos (h), la diversidad nucleotídica (π) y la diversidad haplotípica (Hd) (Nei 1987). Además, se realizaron pruebas de neutralidad mediante la *D* de Tajima (Tajima 1989) y el *F_s* de

Fu (Fu 1997), utilizando el programa DNAsp v.5 (Librado y Rozas 2009). Estos análisis fueron realizados para todo el conjunto de datos, por población y para los haplogrupos (ver más adelante).

Se realizaron análisis de diferenciación genética mediante análisis de varianza molecular (AMOVA) con el software Arlequin v.3.5 (Excoffier y Lischer 2010) tomando en cuenta las diferencias pareadas para generar la matriz y realizando 1000 permutaciones. Estos análisis se realizaron para todos los datos, entre poblaciones y entre los haplogrupos (ver más adelante).

5.3.2. Relaciones filogenéticas entre los haplotipos.

Se realizó una red de haplotipos con base en parsimonia estadística con un 95% de probabilidad de conexión, en el programa TCS v.1.2.1 (Clement et al. 2000).

Además, se estimaron las relaciones filogenéticas entre los haplotipos en el programa MrBayes v.3.2 (Ronquist et al. 2012), utilizando tres especies de *Hetaerina* como grupos externos (*H. laesa*, *H. sanguinea* y *H. titia*). Se realizaron dos análisis independientes empleando cuatro cadenas, una fría y tres calientes. Se corrieron 50 millones de generaciones muestreando cada 1000 generaciones con base en el modelo de evolución molecular GTR+G+I, resultante del análisis realizado en jMoldeTest. La convergencia de los valores de probabilidad se evaluó, hasta alcanzar el valor de convergencia menor a 0.01 y se descartó el 25% de las corridas (burn-in) para obtener el árbol consenso de mayoría; el árbol fue visualizado en FigTree v.1.4.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

5.3.3. Estimación de tiempos de divergencia.

Para determinar el tiempo de divergencia entre los diferentes haplotipos se utilizó el programa Beast v.1.8.2 (Drummond et al. 2012). Se realizaron tres corridas independientes de 50 millones de generaciones cada una, muestreando cada 5000

generaciones, con base en un modelo de reloj relajado lognormal no correlacionado, bajo el modelo de especiación Yule Process y el modelo de mutación TrN93+G+I.

Se utilizó un punto de calibración secundario, el cual representa el tiempo estimado de divergencia del género *Hetaerina* (61.1 ± 1.2 millones de años; Ma) (Dumont et al. 2005), usando una distribución normal en estos datos. Además, se usó una tasa de mutación de 2.0-3.1% de divergencia por linaje por millón de años para COI previamente reportada para odonatos, con una distribución uniforme (Kiyoshi y Sota 2006; Papadopoulou et al. 2010). Estos análisis se corrieron en el servidor del CIPRES Gateway (Miller et al. 2010) y los resultados fueron combinados en el programa LogCombiner v.1.8.1 (Drummond et al. 2012). Los valores de ESS (tamaño efectivo de la muestra) fueron revisados en el programa Tracer v.1.6 (Rambaut y Drummond 2007) para analizar la robustez de las tres corridas independientes y combinadas. El árbol fue obtenido en el programa TreeAnnotator v.1.8.1 (Drummond et al. 2012) y visualizado en FigTree v.1.4.2.

5.4. Análisis de los datos de microsatélites.

5.4.1. Estimación de diversidad genética.

Para cada población se estimó el promedio del número de alelos y de la heterocigocidad esperada (H_e) y observada (H_o), así como el coeficiente de endogamia (F), con el programa GenAlEx (Peakall y Smouse 2012), utilizando todos los loci. Además, se estimó la riqueza alélica (AR) rarefaccionada al número de muestra de cada población, esto se realizó en el programa SPAGeDi v.1.4 (Hardy y Vekemans 2002).

5.4.2. Análisis de diferenciación genética.

Se realizó un análisis bayesiano de agrupamiento en el programa STRUCTURE v.2.3.4 (Falush et al. 2003) con base en los modelos ‘admixture’ y ‘correlated frequencies’, sin utilizar la información sobre la población de origen de los individuos.

Se hicieron diez corridas para cada valor de K, con 10 iteraciones cada una y un burn-in de 10000 pasos y cadenas de un tamaño de 100000 pasos. El número más probable de grupos genéticos se determinó usando el método de Evanno (ΔK) (Evanno et al. 2005) y fue calculado en la página de internet de STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt 2012) (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>). Con el fin de determinar subestructuración adicional, para cada uno de los grupos genéticos detectados (ver resultados), se hizo otro análisis de agrupamiento usando los parámetros descritos arriba.

Por otro lado, se realizaron varios análisis de varianza molecular (AMOVA) para determinar la variación y diferenciación genética (Φ_{ST}) entre las poblaciones así como entre los subgrupos genéticos obtenidos con el programa STRUCTURE, estos análisis se realizaron en el programa Arlequin v.3.5 (Excoffier y Lischer 2010).

5.5. Datos morfológicos.

5.5.1. Morfometría geométrica del cercus superior derecho.

Se tomaron fotografías de los cerci superiores, de 101 machos con ayuda de un microscopio estereoscópico con una referencia de escala. En cada imagen, se sobrepuso un ‘abanico’ sobre el cercus superior derecho para tener una referencia al colocar los semilandmarks (ver más adelante), mediante el programa MakeFan v.6 (Zelditch et al. 2012). Después, se digitalizaron coordenadas x , y en seis puntos homólogos del cercus superior derecho (i. e. landmarks *sensu* Bookstein 1991) y 22 semilandmarks usando el programa TpsDig v.2 (Rohlf 2004). Estas marcas anatómicas (i. e. landmarks y semilandmarks), describen la forma del contorno del cercus superior derecho en una vista dorsal (Fig. 6). Una vez que los landmarks y semilandmarks fueron colocados, se realizó una superimposición tipo Procrustes usando el programa CoorGen v.7 (Zelditch et al. 2012).

Una vez obtenidas las coordenadas, éstas se utilizaron como variables morfológicas, las cuales se sometieron a un análisis canónico discriminante en el programa JMP® v.9 (SAS Institute Inc) usando como criterios de agrupamiento los grupos genéticos obtenidos tanto con los marcadores nucleares como con los mitocondriales.

Para visualizar la variación de la forma de los cerci tomando como referencia los grupos genéticos nucleares, realizamos un análisis de placas delgadas en Tgroup v.7 (Zelditch et al. 2012), lo cual permite visualizar gráficamente, a través de una gradilla de deformación, la dirección y magnitud de los cambios morfológicos entre los grupos.

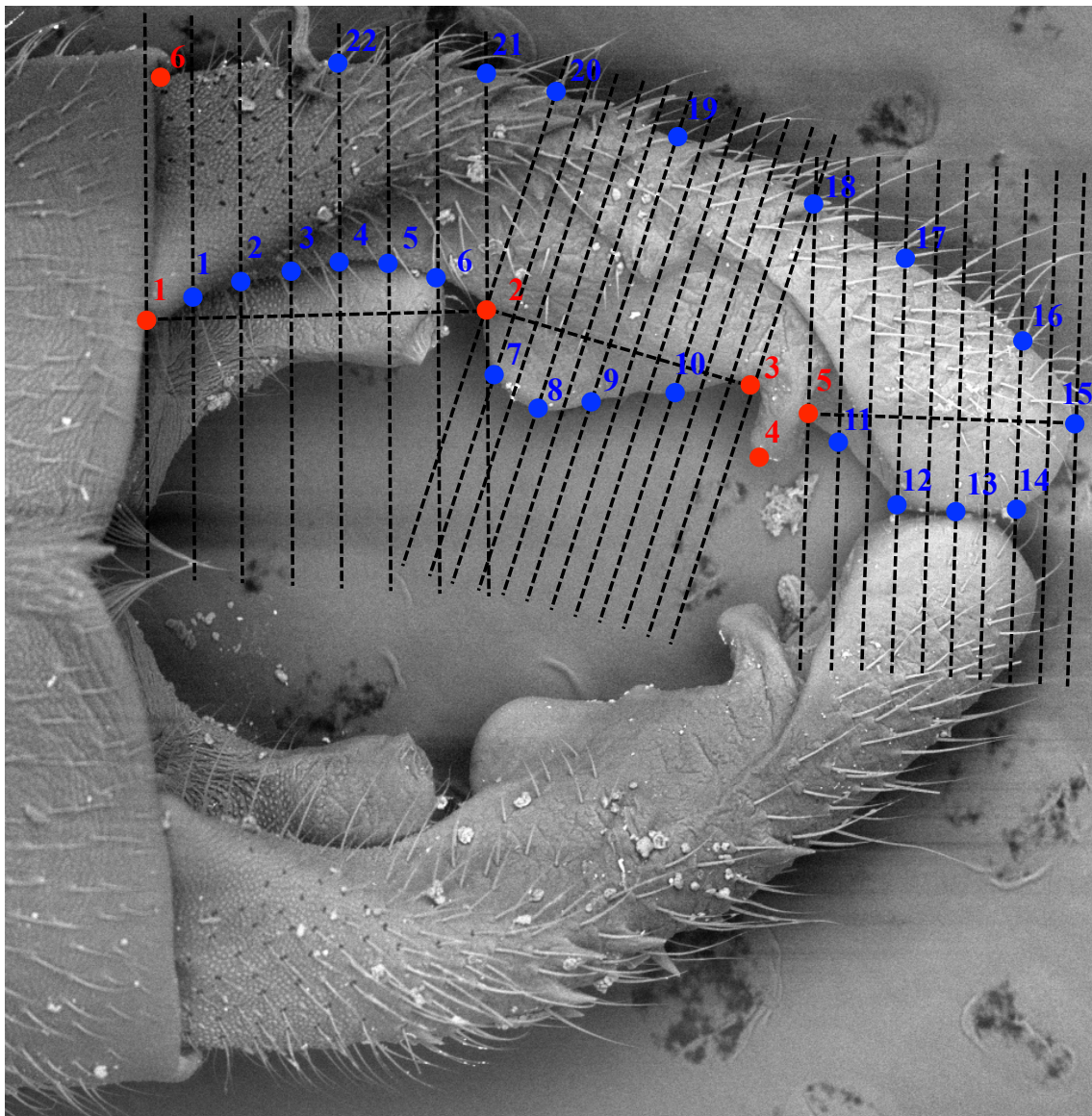


Figura 5. Morfometría geométrica de los cerci. Posición del ‘abanico’ así como de los landmarks (círculos rojos) y semilandmarks (círculos azules) en el apéndice caudal superior derecho.

VI. RESULTADOS

6.1. Análisis del ADN mitocondrial.

6.1.1. Diversidad genética y pruebas de neutralidad.

Se obtuvieron 216 secuencias para 31 poblaciones, con una longitud de 631 pares de bases alineadas del gen COI. El número total de haplotipos fue de 61 con una diversidad haplotípica promedio (H_d) de 0.82 (DE 0.02), siendo la población de Comitancillo la cual presentó el valor más alto (0.97, DE= 0.06) mientras que las poblaciones de Apazapan, Canadá, Norte de Centroamérica y San Marcos presentaron los valores menores (0, DE=0). Por otro lado, la diversidad nucleotídica promedio (π) fue de 0.015, siendo la población de Zaragoza la que presentó el valor mayor (0.018257, DE= 0.010), mientras que las poblaciones de Apazapan, Canadá, Norte de Centroamérica y San Marcos presentaron los valores menores (0, DE=0).

Las pruebas de neutralidad muestran que sólo las poblaciones de Cocoyotla y Momax presentan valores negativos y significativos para ambas pruebas (D de Tajima y F_s de Fu), por lo que se sugiere que éstas han pasado por un proceso selectivo, mientras que en el resto de las poblaciones la variación observada no se desvía de la neutralidad. Los valores de diversidad así como los resultados de las pruebas de neutralidad por población se presentan en la tabla 2; cabe mencionar que algunas poblaciones fueron agrupadas con base a la distancia entre las poblaciones al realizar los análisis, esto debido al tamaño de muestra (ver tabla 2).

Tabla 2. Diversidad genética del ADN mitocondrial y pruebas de neutralidad.

Localidad	N	h	Hd (DE)	π (DE)	D de Tajima	Fs de Fu
Apazapan, Veracruz	9	1	0 (0)	0 (0)	0	0
El Borbollón, Guerrero	10	1.76	0.76 (0.13)	0.006921 (0.004)	-1.81742**	1.07182
Camichines, Nayarit	10	1.53	0.53 (0.18)	0.002357 (0.002)	-1.83913**	-0.17467
Canadá	6	1	0 (0)	0 (0)	0	0
Chiapa de Corzo, Chiapas	10	1.73	0.73 (0.10)	0.015638 (0.009)	2.14702	5.25295
Chihuahua	10	1.32	0.53 (0.18)	0.002020 (0.002)	-1.79631**	-0.49677
Chupicuaro, Guanajuato	8	1.64	0.64 (0.18)	0.002044 (0.002)	0.20364	-0.84351

Cocoyotla, Morelos	10	1.78	0.78 (0.14)	0.001684 (0.001)	-1.74110*	-3.8770**
Comitancillo, Oaxaca	9	1.97	0.97 (0.06)	0.008698 (0.005)	-1.78825**	-2.62984
Cuatro Ciénegas, Coahuila	10	1.38	0.38 (0.18)	0.000673 (0.001)	-1.40085	-1.16394*
Michoacán	11	1.6	0.60 (0.15)	0.001592 (0.001)	-0.26331	-0.85694
Momax, Zacatecas	10	1.67	0.67 (0.16)	0.001684 (0.001)	-1.74110**	-2.2598**
Norte de Centroamérica	12	1	0 (0)	0 (0)	0	0
Nuevo Recuerdo, Chiapas	10	1.76	0.76 (0.13)	0.014366 (0.008)	0.9732	3.11897
San Agustín, Hidalgo	4	1	0.83 (0.22)	0.002806 (0.002)	0.16766	-0.13331
San Marcos, Puebla	10	1.83	0 (0)	0 (0)	0	0
San Nicolás, Sonora	10	1.67	0.67 (0.16)	0.002020 (0.002)	-1.79631**	-1.8027*
Sinaloa	11	1.62	0.62 (0.10)	0.013590 (0.008)	1.75048	7.53769
EUACE	9	1.26	0.69 (0.15)	0.004022 (0.003)	-0.32331	0.7754
EUACN	10	1.305	0.51 (0.16)	0.000935 (0.00)	-0.69098	-0.59381
EUASO	8	1.4	0.64 (0.18)	0.001684 (0.001)	-1.53470*	-1.23563
Villaldama, Nuevo León	10	1.93	0.93 (0.06)	0.013618 (0.008)	0.67767	0.38293
Zaragoza, Coahuila	10	1.96	0.96 (0.06)	0.018257 (0.010)	-0.04985	-0.13057
Haplogrupo amarillo	2	2	1.00 (0.50)	0.001684 (0.001)	0	0
Haplogrupo azul	22	9	0.77 (0.08)	0.002128 (0.001)	-1.63566*	-5.11524**
Haplogrupo rojo	70	23	0.67 (0.06)	0.004612 (0.002)	-1.54153*	-12.7535**
Haplogrupo verde	122	27	0.56 (0.06)	0.001504 (0.001)	-2.35310*	-340.200**

N= Tamaño de la muestra; h= Riqueza de haplotipos rarefaccionada; Hd= Diversidad haplotípica; π = Diversidad nucleotídica. * P < 0.05, **P < 0.02. Canadá= incluye las poblaciones GR, SR y UP. Chihuahua= incluye las poblaciones To y RCh. Michoacán= incluye las poblaciones de Mn y AF. Sinaloa= incluye las poblaciones EF y Cu. EUACE= incluye las poblaciones SC, CrC, MC, DC y OC. EUACN= incluye las poblaciones LC y BHC. EUASO= Incluye las poblaciones Ar y NM.

6.1.2. Relaciones entre los haplotipos.

La red de haplotipos basada en parsimonia estadística muestra cuatro haplogrupos principales (de ahora en adelante me referiré a ellos de acuerdo al color: amarillo, azul, rojo y verde) (Fig. 7). El haplogrupo representado en color verde incluye al haplotipo H9 el cual presenta la frecuencia más alta (81 individuos). Este haplogrupo además incluye 26 haplotipos los cuales en su mayoría sólo se presentan en un individuo y están separados por uno a cuatro pasos mutacionales del haplotipo H9. Este haplogrupo está distribuido desde el norte de México hasta Guatemala y está representado en 20 de las poblaciones analizadas. El segundo haplogrupo representado en color rojo, se conecta al primer haplogrupo a través de 10 pasos mutacionales (Fig. 7). En este haplogrupo también existe un haplotipo con una frecuencia muy alta (H2, presente en 40 individuos), además de varios haplotipos únicos. La distribución geográfica de este haplogrupo va desde Canadá hasta el norte de México y se encuentra representado en 19

poblaciones. Este haplogrupo se encuentra relacionado con un tercer haplogrupo, representado en azul, el cual se encuentra distribuido exclusivamente en tres poblaciones del sur de México (Oaxaca y Chiapas). Finalmente, se encontró un cuarto haplogrupo, representado en color amarillo, el cual sólo estuvo representado por dos individuos de la población de Zaragoza en Coahuila, México. Este grupo no se conecta con la red principal.

En cuanto a las relaciones filogenéticas de los 61 haplotipos, el árbol consenso (Fig. 8) muestra baja resolución y aunque se pueden separar los diferentes haplogrupos encontrados en la red de haplotipos, sólo los haplogrupos representados en verde y amarillo son monofiléticos (Fig. 8), mientras que los haplogrupos representados en rojo y azul no se recuperan como monofiléticos.

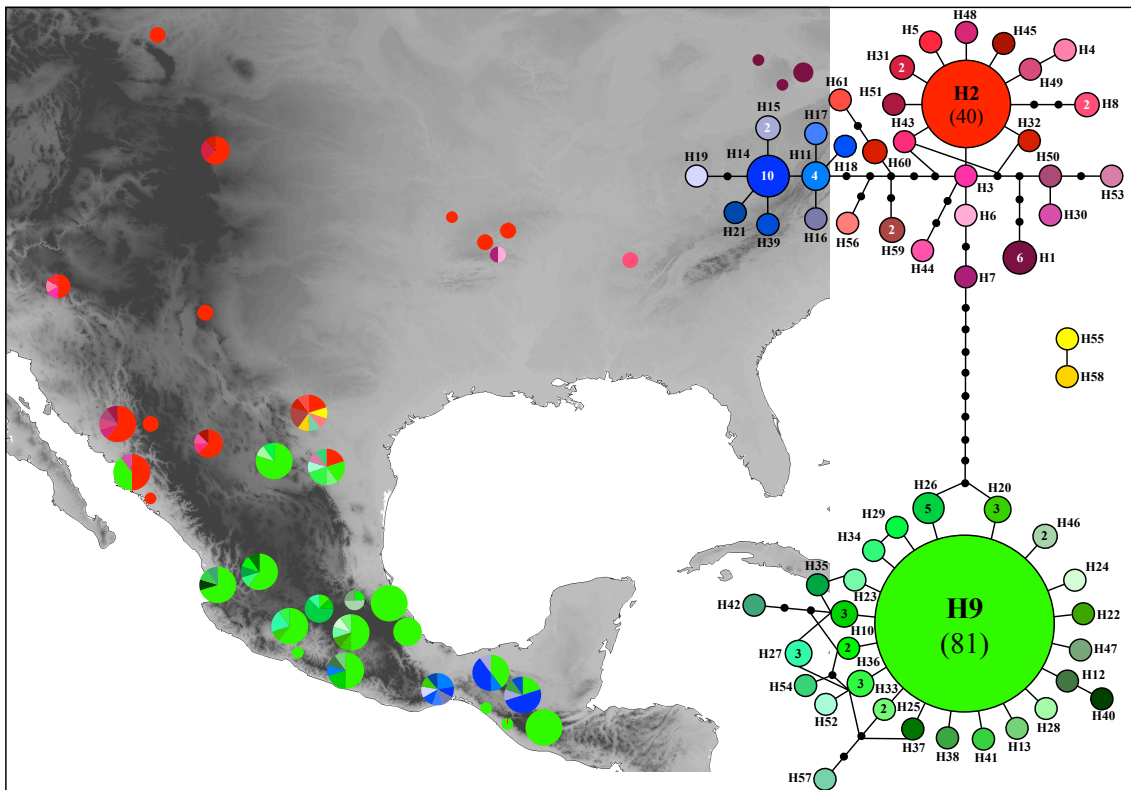


Figura 6. Red de haplotipos. Red con base a parsimonia estadística y distribución geográfica de los 61 haplotipos encontrados en *H. americana*. En la red se señala el nombre del haplotipo así como su frecuencia; los haplotipos que no presentan número tienen frecuencia de uno, cada línea representan un paso mutacional de distancia y el punto negro representa un haplotipo no muestreado. Las gráficas de pastel representan la frecuencia de los haplotipos en cada población y el tamaño de la gráfica es proporcional al tamaño de muestra. En el mapa, la escala de coloración gris representa la altitud, siendo las áreas más oscuras las de mayor altitud.

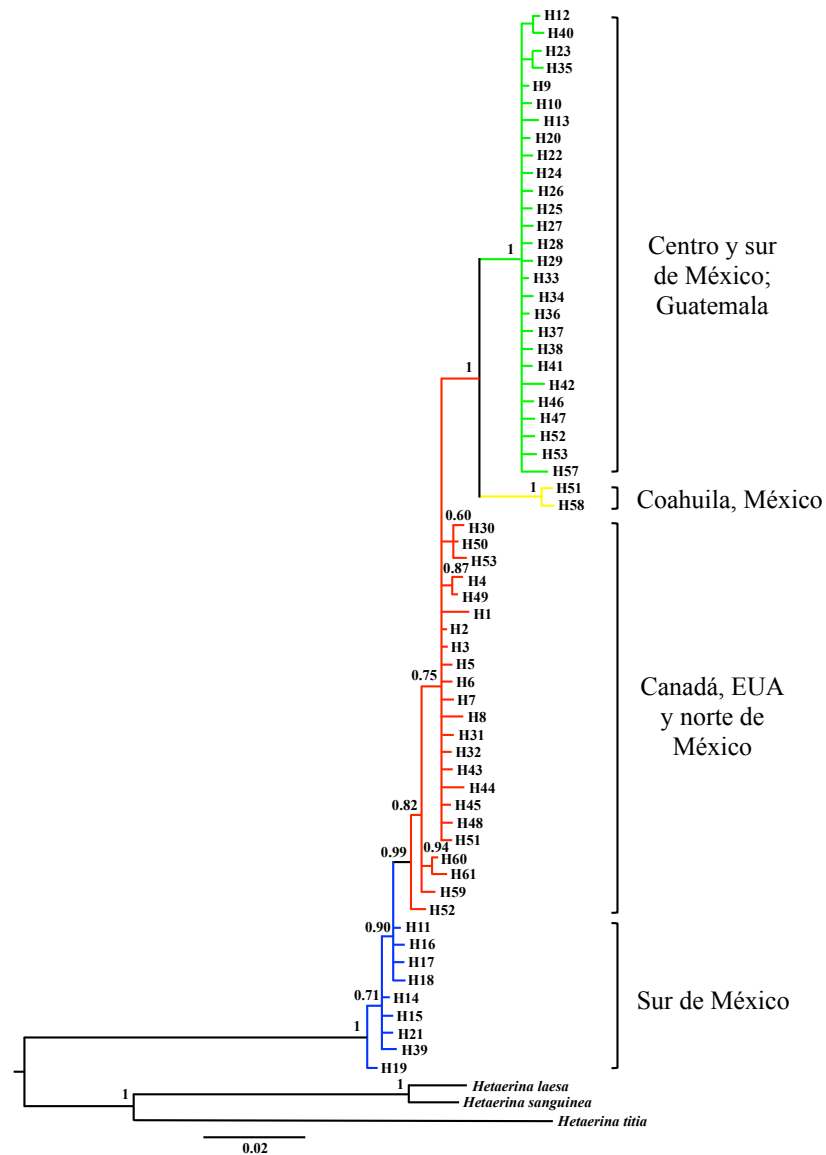


Figura 7. Relaciones filogenéticas de los haplotipos. Análisis bayesiano de las relaciones entre los haplotipos, se muestran los valores de probabilidad posterior superiores a 0.5. El color de los haplotipos representa al haplogrupo al cual corresponden.

6.1.3. Estructura genética.

La diferenciación genética global fue alta y significativa ($\Phi_{ST} = 0.65$, $P < 0.001$), encontrándose el mayor porcentaje de variación entre poblaciones. Por otro lado, al agrupar a los individuos de acuerdo con los diferentes haplogrupos que se recuperaron en la red de haplotipos, también se encontró una estructura genética muy alta ($\Phi_{CT} = 0.89$, $P < 0.0001$) con el mayor porcentaje de variación entre grupos (Tabla 3).

Tabla 3. Diferenciación genética con base al ADN mitocondrial.

Grupos	Fuente de variación	d. f.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	
Global	Entre poblaciones	35	682.75	3.02	65.34	$\Phi_{ST}=0.65^*$
	Dentro de las poblaciones	180	288.38	1.60	34.66	
	Total	215	971.12	4.62		$\Phi_{ST}=0.65^*$
Haplogrupos	Entre grupos	3	762.37	6.55	88.91	$\Phi_{CT}=0.89^*$
	Entre poblaciones dentro de los grupos	25	64.29	0.28	3.87	$\Phi_{SC}=0.35^*$
	Dentro de poblaciones	176	93.60	0.53	7.22	
	Total	204	920.25	7.37		$\Phi_{ST}= 0.93^*$

d.f. = grados de libertad. * P < 0.0001.

6.1.4. Tiempos de divergencia.

Los tiempos de divergencia de los diferentes haplotipos se muestran en la figura 9. Este árbol difiere al obtenido con MrBayes (Fig. 8; no datado) debido a que el análisis en el programa BEAST necesita obtener un árbol resuelto para poder hacer la estimación del tiempo de divergencia, por lo que la monofilia entre los haplotipos es obligada, sin embargo aunque estos árboles difieren, se recuperan los mismos haplogrupos. La divergencia de los dos clados principales (verde/amarillo-rojo-azul; Fig. 9) fue estimada en 3.03 Ma. El proceso de diversificación del haplogrupo representado por el color verde se estimó en 1.03 Ma. Por otro lado, el clado que incluye los haplogrupos representados en rojo, azul y amarillo, empezó a diversificarse hace 1.67 Ma.

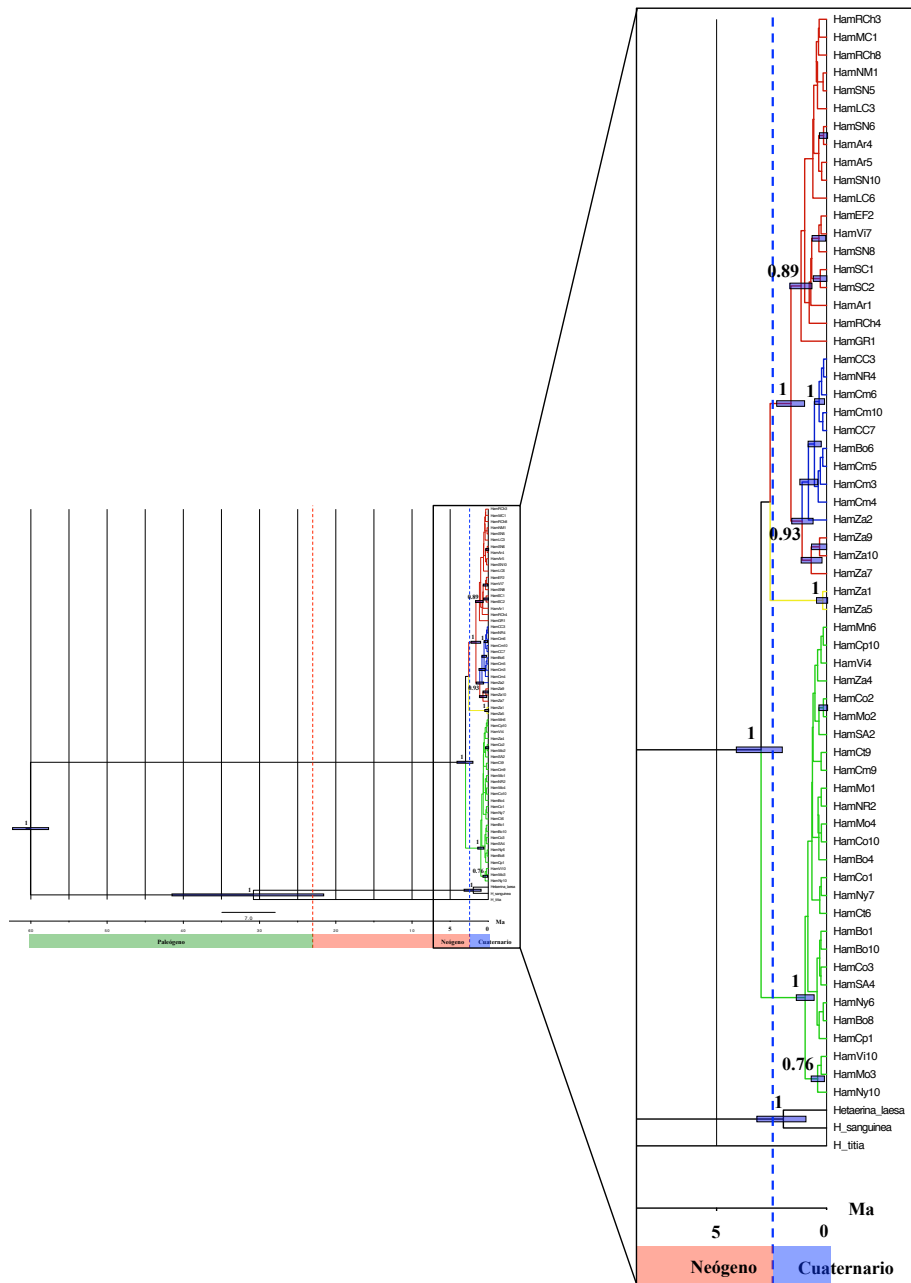


Figura 8. Tiempos de divergencia entre los haplotipos. Se muestran los tiempos de divergencia entre los diferentes haplogrupos. Se muestran los valores de probabilidad posterior mayores a 0.50. Las barras azules representan el intervalo de tiempo de cada nodo. Se muestra una escala de tiempo con líneas que dividen el árbol cada 10 millones de años, además se señalan los diferentes periodos geológicos.

6.2. Análisis de los microsatélites nucleares.

6.2.1. Diversidad genética.

Los microsatélites revelaron baja diversidad genética: en promedio 1.3 alelos por locus. Las poblaciones de Cocoyotla y Zaragoza presentaron los valores más altos de diversidad en cuanto al número de alelos (3.00, DE= 0.62; 3.00, DE= 0.37 respectivamente), mientras que las poblaciones de Sacapulas y Tomochic presentaron

los valores más bajos (1.00, DE=0 para ambas poblaciones). Los valores de diversidad para cada población se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Diversidad genética estimada mediante seis loci de microsatélites nucleares.

Localidad	N	NA (EE)	NAE (DE)	AR (K=2)	He (DE)	Ho (DE)	F (DE)
Apazapan, Veracruz	9	2.67 (0.49)	2.02 (0.33)	1.45	0.45 (0.11)	0.15 (0.09)	0.72 (0.14)
El Borbollón, Guerrero	10	2.33 (0.49)	1.58 (0.26)	1.3	0.30 (0.11)	0.25 (0.09)	0.08 (0.05)
Camichines, Nayarit	10	2.67 (0.56)	1.58 (0.27)	1.3	0.30 (0.11)	0.10 (0.05)	0.56 (0.13)
Chiapa de Corzo, Chiapas	10	2.83 (0.40)	1.86 (0.21)	1.45	0.45 (0.06)	0.25 (0.08)	0.33 (0.20)
Chupícuaro, Guanajuato	10	2.17 (0.31)	1.42 (0.17)	1.26	0.27 (0.08)	0.07 (0.03)	0.59 (0.18)
Cocoyotla, Morelos	10	3.00 (0.62)	1.90 (0.39)	1.36	0.36 (0.14)	0.37 (0.14)	-0.07 (0.08)
Costa de Chiapas Cuatro Ciénegas, Coahuila	2	1.50 (0.22)	1.37 (0.17)	1.28	0.28 (0.13)	0.33 (0.18)	-0.56 (0.16)
	10	1.50 (0.22)	1.36 (0.20)	1.2	0.20 (0.10)	0.27 (0.18)	-0.08 (0.41)
Maury County	2	1.16 (0.17)	1.10 (0.10)	1.08	0.08 (0.08)	0.08 (0.08)	-0.33 (0.08)
Michoacán	11	2.33 (0.49)	1.55 (0.24)	1.29	0.29 (0.11)	0.31 (0.13)	-0.01 (0.17)
Momax, Zacatecas Nuevo Recuerdo, Chiapas	10	2.50 (0.43)	1.58 (0.30)	1.29	0.29 (0.11)	0.19 (0.07)	0.21 (0.11)
	10	2.67 (0.49)	1.65 (0.20)	1.36	0.36 (0.10)	0.24 (0.12)	0.28 (0.23)
Oaxaca Río Chonchos, Chihuahua	11	2.83 (0.48)	1.50 (0.21)	1.29	0.29 (0.09)	0.26 (0.13)	0.26 (0.22)
	8	1.17 (0.17)	1.02 (0.02)	1.02	0.02 (0.02)	0.02 (0.02)	-0.07 (0.02)
Sacapulas, Guatemala	10	1.00 (0.26)	0.85 (0.17)		0.02 (0.02)	0.02 (0.02)	-0.05 (0.02)
San Agustín, Hidalgo	4	1.83 (0.40)	1.47 (0.22)	1.27	0.27 (0.12)	0.21 (0.10)	0.10 (0.16)
San Marcos, Puebla	10	1.83 (0.40)	1.27 (0.16)	1.17	0.17 (0.09)	0.25 (0.16)	-0.40 (0.21)
San Nicolás, Sonora	10	1.67 (0.56)	1.09 (0.26)		0.16 (0.09)	0.12 (0.07)	0.12 (0.16)
Sinaloa	11	2.67 (0.42)	1.84 (0.23)	1.42	0.42 (0.11)	0.30 (0.11)	0.25 (0.19)
Tomochic, Chihuahua	2	1.00 (0)	1.00 (0)	1	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	
EUACE	7	1.16 (0.17)	1.05 (0.05)	1.04	0.04 (0.04)	0.00 (0.00)	1.00 (0.04)
EUACN	11	2.33 (0.33)	1.19 (0.06)	1.16	0.16 (0.04)	0.17 (0.05)	-0.09 (0.03)
Villaldama, Nuevo León	10	1.33 (0.21)	1.12 (0.80)	1.09	0.09 (0.06)	0.03 (0.03)	0.44 (0.32)
Zaragoza, Coahuila	10	3.00 (0.37)	2.22 (0.23)	1.55	0.55 (0.05)	0.25 (0.07)	0.49 (0.18)

N= Tamaño de la muestra NA= Número de alelos; NAE= Número efectivo de alelos; AR= Riqueza de alelos corregida por el tamaño de muestra; Ho= Heterocigocidad observada; He= Heterocigocidad esperada corregida por el tamaño de muestra; F= Coeficiente de endogamia. Costa de Chiapas= incluye las poblaciones PM y RC. Michoacán= incluye las poblaciones Mn y AF. Oaxaca= incluye las poblaciones de Cy y Cm. EUACE= incluye las poblaciones de CrC, SC, DC y OC. EUACN= incluye las poblaciones de LC y BHC.

Para algunas poblaciones se encontraron coeficientes de endogamia positivos y significativos para más de dos locus (Zaragoza, Momax, Chupícuaro, Camichines, Veracruz y Oaxaca) lo que indica un exceso de homócigos en la población y por lo

tanto desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg. Por otro lado, no se encontró desequilibrio de ligamiento entre ningún par de loci.

6.2.2. Diferenciación genética.

Los análisis de variación genética (AMOVA) mostraron que existe mayor variación entre las poblaciones que dentro de éstas, encontrándose un valor general de Φ_{ST} de 0.51 (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de estructura genética con base a los microsatélites nucleares.

Grupos	Fuente de variación	d. f.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	
Global	Entre poblaciones	23	181.61	0.43	51.16	$\Phi_{ST}=0.51^{**}$
	Dentro de las poblaciones	392	162.32	0.42	48.54	
	Total	415	343.94	0.85		$\Phi_{ST}=0.51^{**}$
Entre grupos asignados por STRUCTURE (K=2) para toda la muestra.	Entre grupos	1	90.97	0.53	45.36	$\Phi_{CT}=0.45^{**}$
	Entre poblaciones dentro de los grupos	30	137.44	0.34	28.77	$\Phi_{SC}=0.53^{**}$
	Dentro de poblaciones	384	115.52	0.30	26.86	
	Total	415	343.94	1.16		$\Phi_{ST}= 0.74^{**}$
Entre grupos asignados por STRUCTURE (K=2) para GG1	Entre grupos	1	74.90	0.50	50.40	$\Phi_{CT}=0.50^{**}$
	Entre poblaciones dentro de los grupos	24	24.56	0.05	5.19	$\Phi_{SC}=0.10^{**}$
	Dentro de poblaciones	282	122.95	0.44	44.41	
	Total	307	222.41	0.98		$\Phi_{ST}= 0.56^{**}$
Entre grupos asignados por STRUCTURE (K=2) para GG2	Entre grupos	1	20.58	0.30	26.95	$\Phi_{CT}=0.27^*$
	Entre poblaciones dentro de los grupos	11	29.95	0.30	27.24	$\Phi_{SC}=0.38^{**}$
	Dentro de poblaciones	95	47.88	0.50	45.63	
	Total	107	98.41	1.10		$\Phi_{ST}= 0.54^{**}$

d. f.= grados de libertad. *P <0.01; **P <0.0001.

Por otro lado, el análisis bayesiano realizado en STRUCTURE identificó dos grupos genéticos principales (K=2) (Fig. 10), los cuales tienen una alta diferenciación genética ($\Phi_{CT} = 0.45$, P <0.001) (Tabla 5). El primer grupo genético (GG1 de ahora en adelante, representado en color azul) se encuentra distribuido principalmente desde EUA hasta el

Sur de México en Chiapas, mientras que el segundo grupo (GG2, representado en color verde) se encuentra en la población de Guatemala (población que se encuentra más al sur), en dos poblaciones de Chiapas, en las poblaciones que se distribuyen en la planicie costera del Golfo de México (Veracruz, San Marcos), en las poblaciones más norteñas de México (Cuatro Ciénegas y Zaragoza), así como la población de la costa pacífico en el norte de México (El Fuerte). Es importante mencionar que hay seis poblaciones cuyos individuos tienen proporciones similares de pertenencia a cada uno de los grupos genéticos, indicando que estas poblaciones están mezcladas (Nuevo Recuerdo, Chiapa de Corzo, Oaxaca, Veracruz, Zaragoza y Sinaloa).

Al analizar la subestructura genética en cada uno de estos dos grupos principales, se detectaron otros dos subgrupos dentro de cada grupo principal (K=2). Dentro del GG1

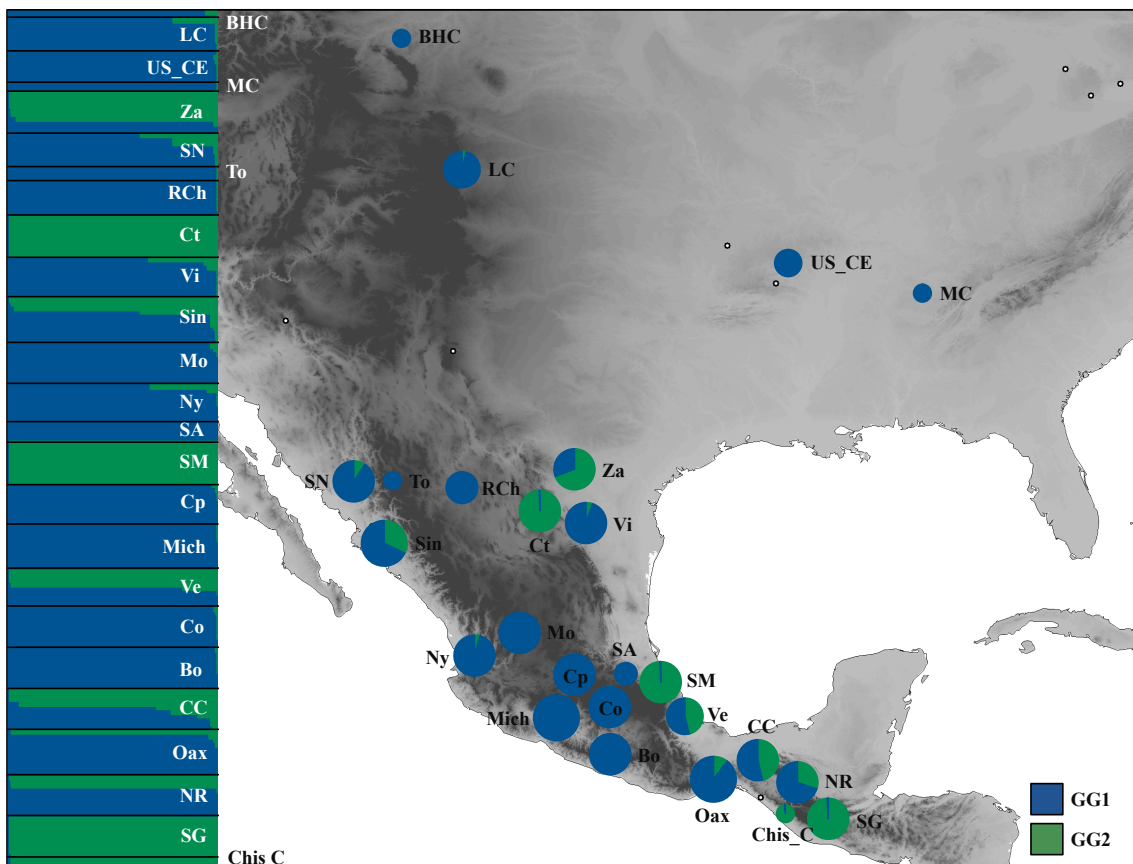


Figura 9. Análisis bayesiano en STRUCTURE. Proporciones de asignación para las poblaciones de *H. americana* para K=2. Los individuos son representados por las barras horizontales las cuales están particionadas en K grupos, la coloración de cada barra representa la proporción estimada de pertenencia a cada grupo genético; las líneas negras separan los sitios de colecta. Las gráficas de pastel representan la proporción y distribución de los dos grupos genéticos dentro de las poblaciones. El tamaño de la gráfica de pastel representa el tamaño de muestra analizado. En el mapa, el color gris oscuro representa las altitudes mayores.

encontramos una alta estructura genética entre los dos subgrupos ($\Phi_{CT} = 0.50$ $P < 0.0001$) relacionada a la distribución geográfica de las poblaciones. Las poblaciones del norte (EUACE, EUACN, Maury County, Tomochic, San Nicolás, Sinaloa, Río Chonchos y Villaldama) presentan genotipos del grupo genético GG1A, mientras que las poblaciones del centro y sur de México presentan genotipos del GG1B (excepto la población de Zaragoza, Coahuila), sin embargo, existe mezcla en algunas poblaciones (Fig. 11).

Dentro del segundo grupo (GG2), también se encontraron dos subgrupos genéticos altamente diferenciados ($K=2$) ($\Phi_{CT}=0.27$, $P < 0.01$), también asociados con la distribución geográfica, pero con un mayor grado de mezcla entre los grupos (Fig. 12).

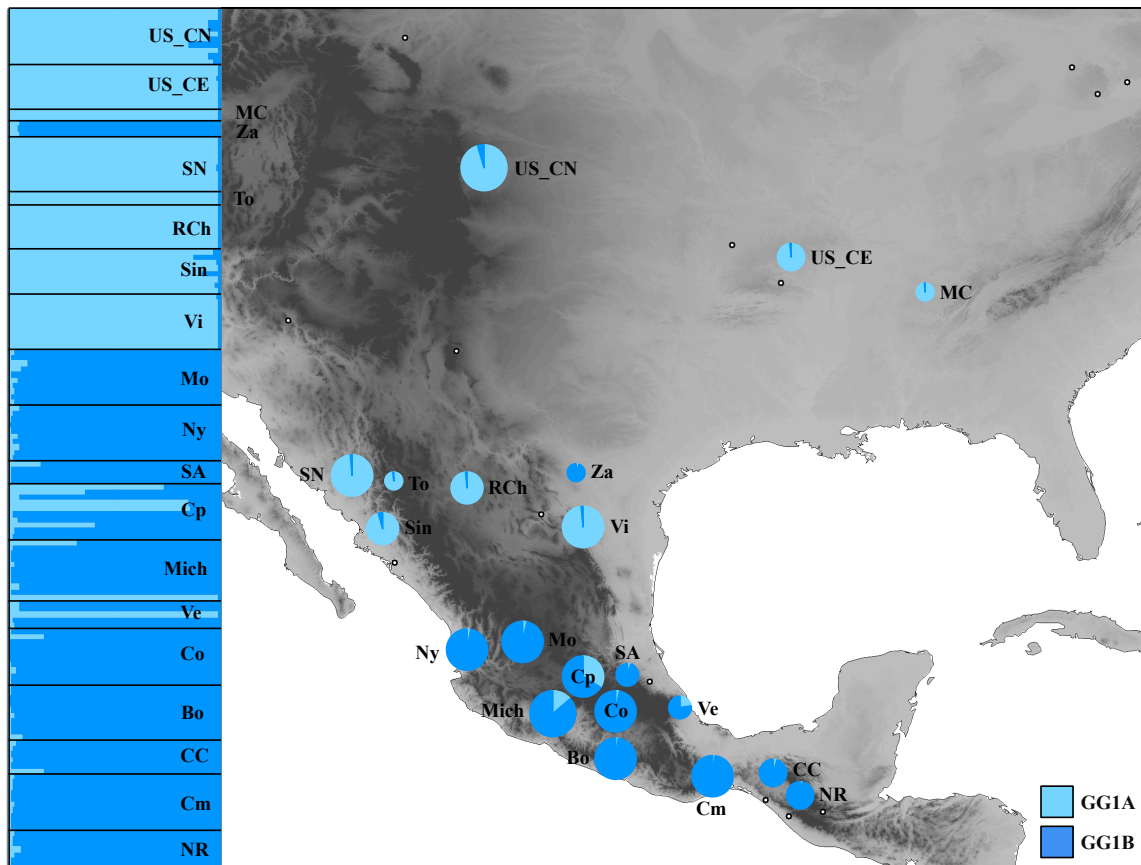


Figura 10. Análisis bayesiano en STRUCTURE dentro del grupo GG1. Probabilidades de asignación para las poblaciones que presentan el grupo genético GG1 para $K=2$. Los individuos son representados por las barras horizontales las cuales están particionadas en K grupos, la coloración de cada barra representa la proporción estimada de pertenencia a cada grupo genético; las líneas negras separan los sitios de colecta. Las gráficas de pastel representan la proporción y distribución de los dos grupos genéticos dentro de las poblaciones. Se recuperan dos grupos GG1A y GG1B. En el mapa, el color gris oscuro representa a las altitudes mayores.

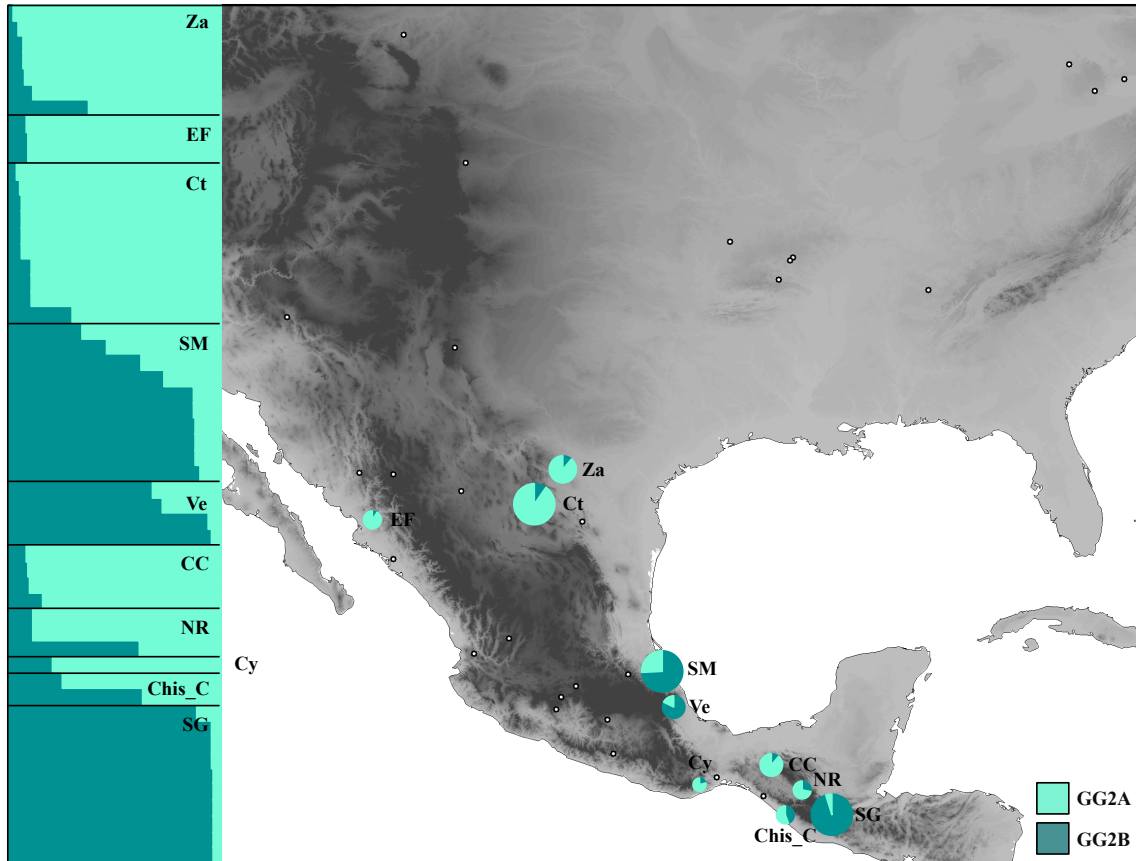


Figura 11. Análisis bayesiano en STRUCTURE dentro del grupo GG2. Probabilidades de asignación para las poblaciones que presentan el grupo genético GG2 para $K=2$. Los individuos son representados por las barras horizontales las cuales están particionadas en K grupos, la coloración de cada barra representa la proporción estimada de pertenencia a cada grupo genético; las líneas negras separan los sitios de colecta. Las gráficas de pastel representan la proporción y distribución de los dos grupos genéticos dentro de las poblaciones. Se recuperan dos grupos GG2A y GG2B. En el mapa, el color gris oscuro representa a las altitudes mayores.

6.3. Variación morfológica.

6.3.1. Forma del cercus superior derecho.

En el análisis de discriminantes, utilizando como criterio de agrupamiento los grupos genéticos obtenidos mediante el análisis bayesiano de los microsatélites nucleares (GG1 o GG2) y a los haplogrupos mitocondriales (rojo, verde, azul o amarillo), se encontró que existen dos grupos principales que presentan formas diferentes en los cerci (Fig. 13) (Wilk's Lambda= 0.00015; $P < 0.0001$). Cada uno de los grupos detectado coincide con los grupos genéticos nucleares asignados por STRUCTURE, es decir, todos los individuos del GG1 tienen una forma de cercus que es diferente de la forma del cercus de todos los individuos que pertenecen al grupo GG2. Por lo que, de ahora en adelante, nos referiremos a estos grupos morfológico-genéticos como GG1 y GG2.

Adicionalmente, hay subestructuración morfológica dentro del GG1 la cual concuerda con el haplogrupo que presenta cada individuo, es decir, se reconocen tres subgrupos (verde, rojo y azul) (Fig. 13). Por otro lado, dentro del GG2 no se presenta este patrón, ya que existe un traslape entre los individuos que presentan los diferentes haplotipos (Fig. 13).

Al realizar otro análisis de discriminantes por separado para cada uno de los grupos anteriores (GG1 y GG2), y de nuevo teniendo como variable categórica el grupo genético asignado por STRUCTURE (GG1A o GG1B; GG2A o GG2B) y el haplotipo que presentan (amarillo, azul, rojo o verde), encontramos que hay otra subdivisión

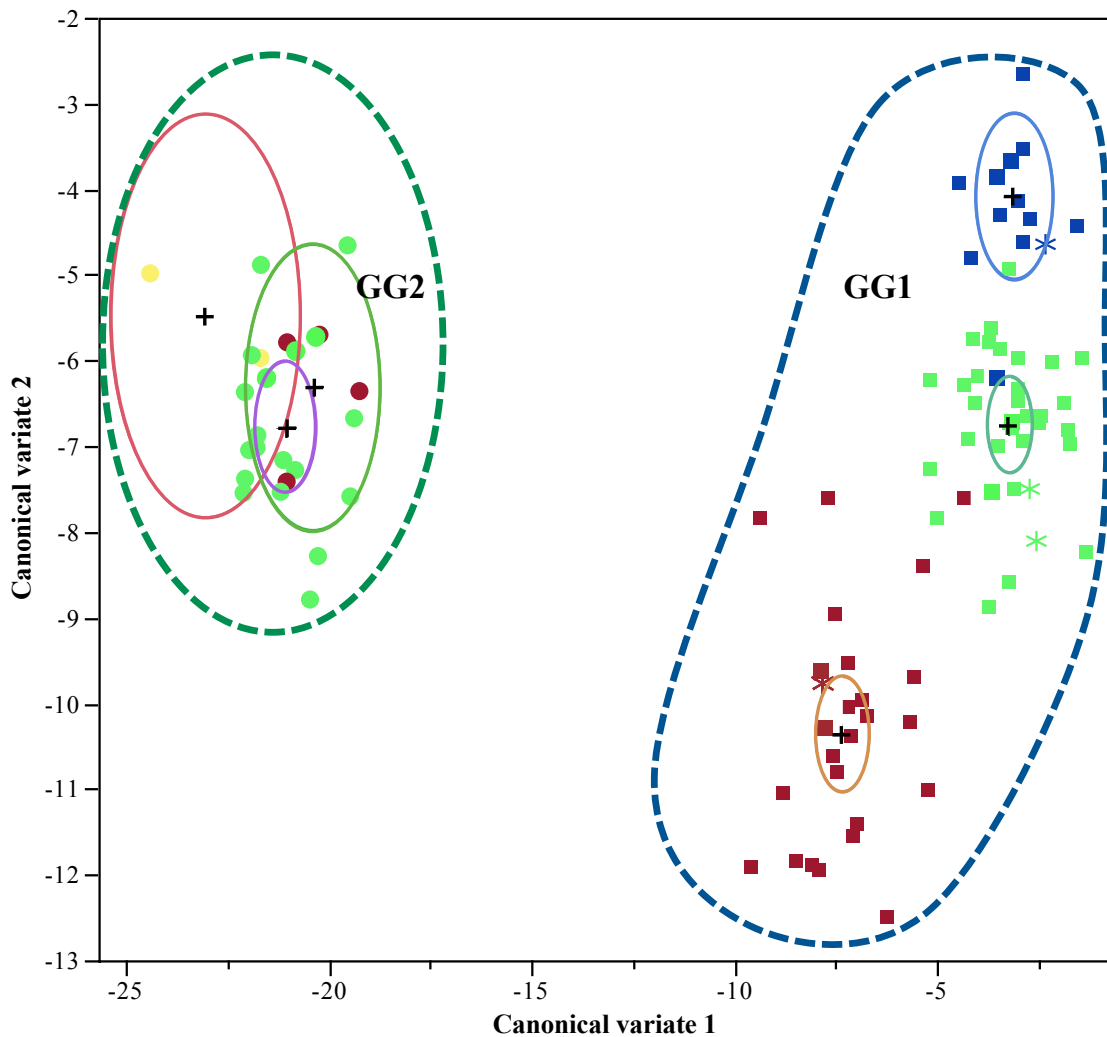


Figura 12. Análisis de discriminantes para la forma del apéndice caudal. Se observan dos grupos principales, los cuales corresponden con los grupos genéticos nucleares (líneas punteadas). Los cuadrados representan los individuos que pertenecen al GG1, los círculos representan a los individuos que pertenecen al GG2 y los asteriscos son individuos que presentan menos del 0.90 de proporción de pertenencia a algún grupo genético. El color de las figuras representa al haplogrupo al cual pertenecen. Las cruces representan el centroide de cada grupo y las elipses el promedio de las variables canónicas con un 95% de confianza.

dentro de estos, es decir, en el grupo GG1 hay tres subgrupos mientras que para el GG2 hay dos subgrupos morfológicos-genéticos.

El análisis de discriminantes del grupo GG1 (Wilk's Lambda= 0.00197; $P= 0.0001$) (Fig. 14), muestra que en el subgrupo GG1A hay dos grupos morfológicos que corresponden con los haplogrupos rojo y verde, mientras que en el subgrupo GG1B también hay dos grupos morfológicos correspondientes a los haplogrupos verde y azul.

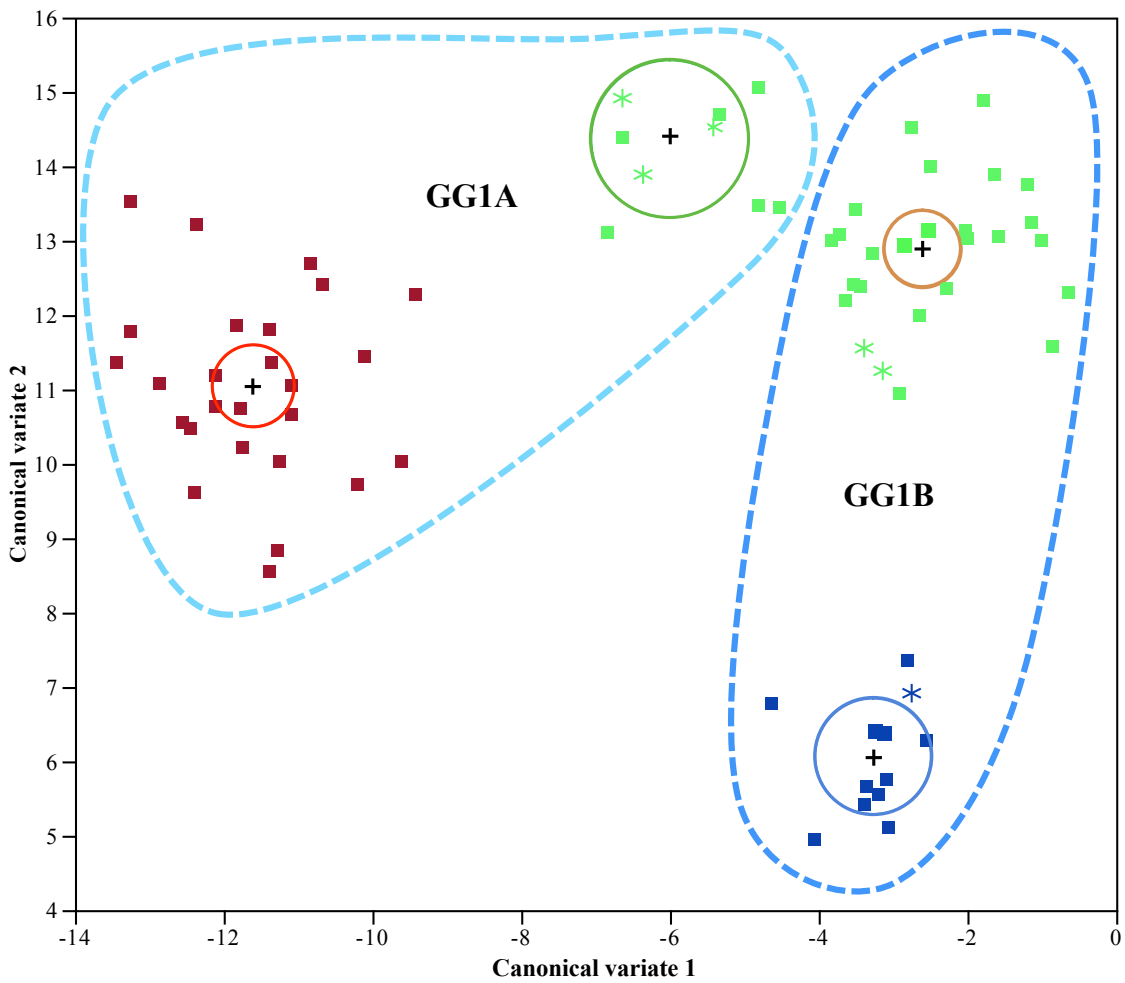


Figura 13. Análisis de discriminantes para la forma del apéndice caudal dentro del GG1. Se observan tres grupos principales, que se relacionan con los haplogrupos a los que pertenecen los individuos. Los grupos genéticos nucleares obtenidos en STRUCTURE están dentro de las líneas punteadas. Los asteriscos son individuos que presentan menos del 0.90 de proporción de pertenencia a algún grupo genético; el color de las figuras representa al haplogrupo al cual pertenecen. Las cruces representan el centroide de cada grupo y las elipses el promedio de las variables canónicas con un 95% de confianza.

Sin embargo, todos los individuos que presentan el haplogrupo verde son más cercanos morfológicamente, independientemente del subgrupo genético nuclear (Fig. 14), por lo que hay tres morfologías diferentes de cercus de acuerdo al haplogrupo.

En el caso del grupo GG2 no se encontró una relación de la forma de los cerci con el haplogrupo al que corresponde cada organismo, sin embargo, sí se encontraron diferencias claras entre los dos subgrupos genéticos nucleares (GG2A y GG2B), no obstante, el tamaño de muestra es demasiado bajo por lo que no fue posible obtener el valor de significancia.

Una vez establecido que existen diferentes formas de cerci las cuales además están asociadas a los grupos genéticos, se realizaron gradillas de deformación para comparar gráficamente estos diferentes grupos y subgrupos. Entre los dos grupos principales, GG1 y GG2, observamos que la mayor variación de forma se encuentra en el lóbulo medio así como en la parte distal del apéndice (Fig. 15). En el GG1 el lóbulo medio es más pronunciado que el lóbulo medio del grupo GG2, mientras que la parte distal del grupo GG1 es más alargada que en el apéndice del grupo GG2.

En cuanto a la variación entre los subgrupos, en el caso de GG1A y GG1B, la mayor parte de ésta se encuentra en el lóbulo medio, aunque no es tan pronunciada como entre

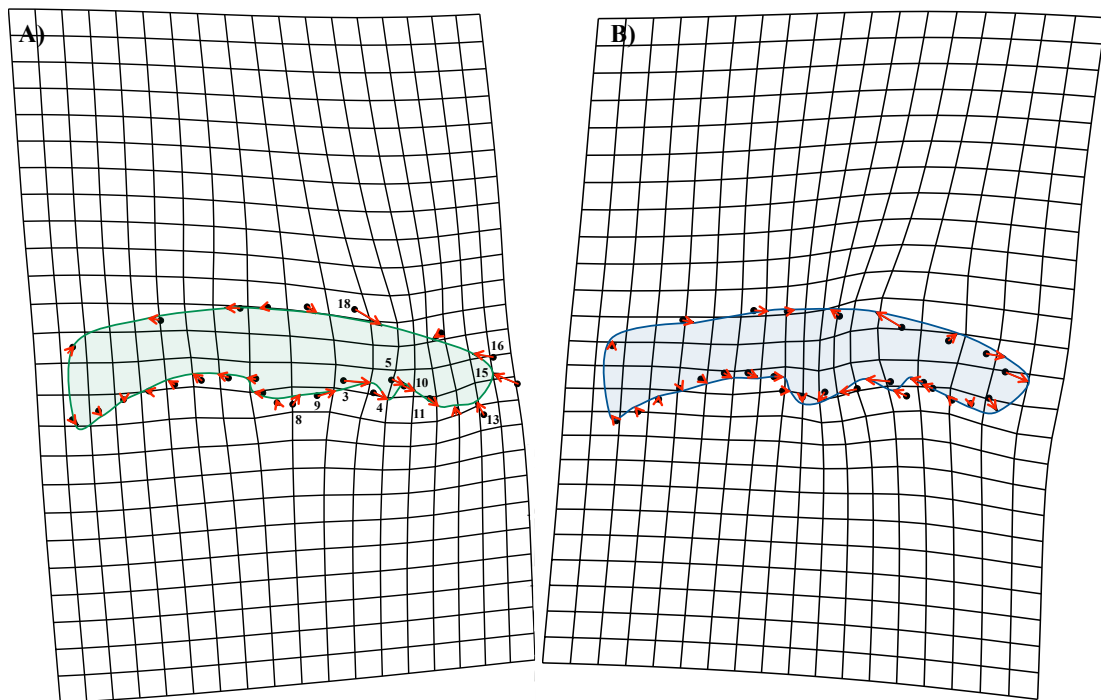


Figura 14. Variación de la forma del apéndice caudal superior derecho. Gradillas de deformación que representan la forma promedio del apéndice de cada grupo genético (GG1 y GG2), el tamaño y dirección de las flechas representan el grado de deformación en la forma del GG1 (A) con respecto al grupo GG2 (B).

los grupos principales (Fig. 16).

En resumen, se encontraron cinco variantes (GG1-Haplotipo azul; GG1-Haplotipo rojo; GG1-Haplotipo verde; GG2A y GG2B) en la forma de los cerci que se ajustan con los datos genéticos, ya sean mitocondriales o nucleares.

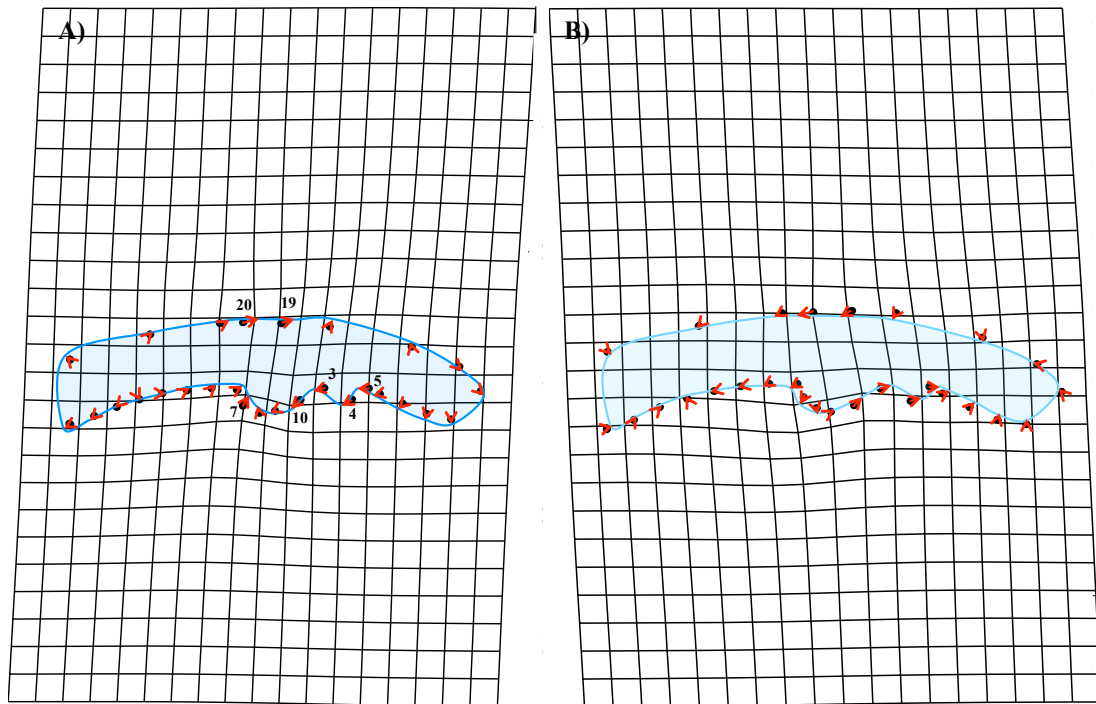


Figura 15. Variación de la forma del apéndice caudal superior derecho en el grupo GG1. Gradillas de deformación que representan la forma promedio del cercus de cada grupo genético (GG1A y GG1B), el tamaño y dirección de las flechas representan el grado de deformación en la forma del cercus del GG1A (A) con respecto al grupo GG1B (B).

VII. DISCUSIÓN

7.1. *Hetaerina americana*: ¿Complejo de especies crípticas?

En este trabajo analizamos por primera vez la variación genética neutral y la variación en la forma de los cerci de *H. americana*.

El marcador mitocondrial muestra un patrón filogeográfico claro con tres grupos principales: norte (haplogrupo rojo), centro (haplogrupo verde) y sur (haplogrupo azul), además, estos haplogrupos, de acuerdo a las pruebas de neutralidad muestran que las poblaciones que se encuentran en estas regiones sufrieron cuellos de botella seguidos de expansiones poblacionales las cuales fueron recientes. Si asociamos este patrón con los tiempos de divergencia obtenidos, podemos relacionar estos cambios demográficos a los cambios climáticos del Cuaternario. Esto se ha reportado para otras especies de odonatos que presentan distribuciones norteñas, como es el caso de *Enagllama* (Turgeon y McPeck 2002; Turgeon et al. 2005), sin embargo para *H. americana*, este patrón sólo se ajusta a las poblaciones del norte, ya que las poblaciones del sur presentaron mayor estabilidad climática (asociado a la temperatura y precipitación) durante el Cuaternario (Bartlein et al. 1998). Por otro lado, en cuanto a la diferenciación genética encontrada entre estos haplogrupos, ésta fue alta ($\Phi_{CT} = 0.89$); este patrón se ha descrito para otras especies de odonatos como *Megaloprepus caerelatus*, donde se encontraron diferencias genéticas muy altas entre las poblaciones ($\Phi_{ST} = 0.99$); los autores sugieren, dadas las distancias genéticas, que este género monotípico, es en realidad un complejo de especies crípticas (Feindt et al. 2014).

En cuanto a los microsátelites, la estructura genética encontrada indica que el flujo genético es prácticamente nulo entre los grupos (GG1 y GG2) y subgrupos genéticos (GG1A y GG1B; GG2A y GG2B). Además, es importante mencionar que el número de individuos con ancestría mezclada, es decir, que presentan un porcentaje de pertenencia

similar a diferentes grupos genéticos, es bajo (menos del 10% de la muestra presenta un grado de mezcla), lo cual nos indica una baja frecuencia de ‘hibridación’ entre los grupos genéticos nucleares principales. Este escenario difiere a lo que se ha encontrado en otras especies de odonatos, por ejemplo, Sánchez-Guillén et al. (2014; 2011) analizaron varias poblaciones de cuatro especies taxonómicamente reconocidas del género *Ischnura*; los autores encontraron valores bajos de estructura genética ($\Phi_{ST}=0.057$) incluso entre especies diferentes, lo cual está relacionado al alto grado de hibridación de este género, lo cual es esperado cuando la divergencia entre especies es reciente y se presentan barreras productivas incompletas. Este escenario nos indica que dentro de *H. americana* existe alguna barrera que evita el flujo genético entre los diferentes grupos genéticos, incluso en las poblaciones donde se encuentran en simpatria individuos de ambos grupos genéticos (e. i. Nuevo Recuerdo, Chiapa de Corzo, Apazapan, etc.). Cabe mencionar que este patrón también se presenta dentro de los subgrupos genéticos, aunque dentro del GG2 el porcentaje de individuos con herencia mezclada es mayor.

Cuando comparamos los resultados de ambos marcadores, no es posible encontrar congruencia entre éstos. Una posibilidad para explicar esta incongruencia es la distinta tasa mutacional del ADN mitocondrial y de los microsatélites nucleares, la cual es más alta en estos últimos, involucrando que los patrones de diferenciación genética difieran debido a que la divergencia entre los grupos genéticos nucleares es muy reciente.

En cuanto a la variación de la forma de los cerci, el encontrar al menos dos grupos morfológicos claramente diferenciables, indica la posible existencia de entidades taxonómicas diferentes dentro de *H. americana*, debido a que estas estructuras son, sino el único, el principal carácter diagnóstico para determinar especies no sólo en el género, sino en la subfamilia (Garrison 1990, Garrison 2006).

Al integrar los datos moleculares con los morfológicos, se encontró una completa asociación de estos grupos morfológicos con los grupos definidos a través del análisis de agrupamiento bayesiano de los microsatélites nucleares, lo que refuerza la hipótesis de entidades taxonómicas diferentes, ya que la alta diferenciación genética (bajo flujo génico) indicaría aislamiento reproductivo entre los subconjuntos de individuos encontrados dentro de *H. americana*. Sin embargo, la información mitocondrial tampoco concuerda completamente con los datos morfológicos, ya que existen individuos que presentan morfos de cerci diferentes pero comparten el genoma mitocondrial. Un patrón similar se ha registrado en otros odonatos, como en el caso del género *Enallagma*, en el que hasta cinco especies reconocidas taxonómicamente comparten el genoma mitocondrial a pesar de una clara divergencia morfológica y en el genoma nuclear (Turgeon et al. 2005). Este patrón, conocido como sorteo incompleto de linajes, es común en especies que han divergido recientemente (Turgeon et al. 2005; Sánchez-Guillén et al. 2011).

Por otro lado, es importante mencionar que a pesar de las diferencias encontradas en el ADN mitocondrial, Vega-Sánchez (2013) también utilizó los mismos organismos de algunas de las poblaciones de este estudio, pero utilizando secuencias de ADN nuclear, y encontró una alta diferenciación genética que sí está relacionada con los grupos morfológicos encontrados en este estudio (Fig. 18). Con base a esto, ahora es posible entender porqué los individuos de la población de Veracruz que, con base a las secuencias de ADN nuclear, divergían más entre ellos que con respecto a individuos de otras poblaciones (Vega-Sánchez 2013), ya que estos individuos presentan los dos morfos de cerci más contrastantes encontrados en este estudio (Fig. 15), es decir, representan dos linajes independientes asociados a una divergencia genética y morfológica, por lo que, aunque el patrón de diferenciación de la mitocondria no es

claro, la divergencia es apoyada por otro marcador molecular adicional. Esto apoya nuestra hipótesis general, en el sentido de que la diferenciación genética no es resultado de la capacidad de dispersión de los individuos, sino de una barrera reproductiva entre éstos, lo cual evita el flujo genético entre los individuos pertenecientes a distintos grupos genético-morfológicos (Fig. 17).

La congruencia entre éstas diferentes fuentes de información sugiere que entre estos grupos puede estar ocurriendo aislamiento reproductivo, al igual que ocurre en otros odonatos (Sánchez-Guillén et al. 2014). Particularmente, porque la variación morfológica encontrada está en los cerci, los cuales, como ya se ha mencionado, participan en la discriminación de machos coespecíficos y heteroespecíficos por parte de las hembras.

El aislamiento reproductivo es uno de los componentes más importantes en el mantenimiento de las barreras entre especies y para odonatos está asociado tanto a

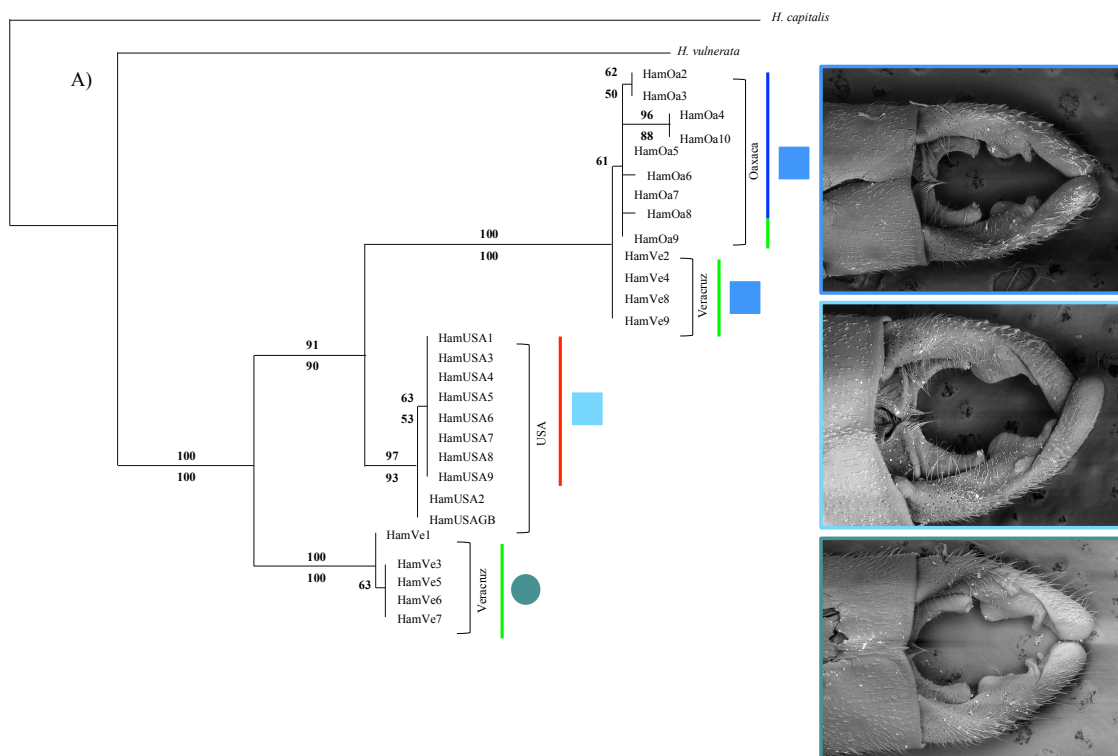


Figura 17. Relaciones filogenéticas con base a la región ITS1-5.8S-ITS2. Análisis de máxima verosimilitud entre poblaciones de *H. americana*, se muestran los valores de soporte (Bootstrap y Jackknife). Las líneas representan el haplogrupo al cual corresponden los individuos (verde, rojo o azul); los cuadros representan individuos del GG1 (azul claro GG1A y azul oscuro GG1B) y el círculo representa los individuos que pertenecen al GG2. Además, se muestra las fotografías de los apéndices caudales de cada grupo genético. Tomado y modificado de Vega-Sánchez (2013).

factores conductuales como mecánicos-sensoriales relacionados al sistema de reconocimiento de pareja (Tennesen 1982; Kirkpatrick y Ravigné 2002). Dado que *H. americana* presenta patrones fuertes de selección intrasexual (factores conductuales) así como variación en los cerci, es importante conocer la importancia relativa de ambos factores en patrones de aislamiento reproductivo dentro de esta ‘especie’.

Aunque en este estudio no analizamos el componente conductual del aislamiento reproductivo, estudios anteriores sugieren que existe variación en las conductas de los machos (e.g. machos lek, no territoriales, etc.) (Raihani et al. 2008), las cuales podrían estar relacionadas al sistema de reconocimiento de pareja, ya que existe un éxito reproductivo diferencial entre machos que tienen conductas diferentes. A partir de esto, y dado que la conducta está relacionada con la mancha alar, la cual es diferente entre machos con diferentes estrategias, se ha sugerido que en *H. americana*, la mancha alar es importante en el reconocimiento intraespecífico entre machos (Córdoba-Aguilar y González-Tokman 2014). Sin embargo, un estudio realizado en poblaciones simpátricas de *H. americana* y *H. titia*, muestra que la alteración experimental de la coloración de machos de *H. americana* (Fig. 18) no altera el número de cópulas que estos machos obtienen con hembras coespecíficas, por lo que se ha sugerido que el reconocimiento de pareja por parte de las hembras no está relacionado con la coloración alar de los machos y por lo tanto con la conducta (Drury y Grether 2014).

Por tanto, es más factible que el aislamiento reproductivo entre los grupos genéticos-morfológicos, sea resultado de factores mecánico-sensoriales ya que los cerci son estructuras especializadas para el reconocimiento de pareja, sobre todo en especies que no presentan cortejo (Svensson et al. 2006), como *Hetaerina*.



Figura 18. Cópula de *Hetaerina americana*. Experimento realizado por Drury y Grether (2014) para evaluar si las hembras reconocían a los machos por las manchas alares. Se muestra la coloración artificial en las alas del macho (coloración negra) que simula la coloración de la especie simpátrica *H. titia*.

Aunque el aislamiento reproductivo entre los grupos identificados es claro, es necesario analizar si existe variación en las estructuras de las hembras que corresponda a la variación en los machos. Es importante mencionar que Garrison (1990) señala que existe variación en los interesternitos de las hembras entre diferentes poblaciones (California, Sinaloa y Veracruz). Esta es una de las estructuras principales para el reconocimiento taxonómico de las especies dentro del género y se encuentra en la región por donde los machos sujetan a las hembras a la hora de formar el tándem, por lo que esperamos que la variación en esta estructura esté relacionada con los grupos morfológicos-genéticos encontrados en los machos, sin embargo, no se tiene información sobre si estas estructuras entran en contacto durante el tándem.

El patrón genético-morfológico global, nos permite sugerir que *H. americana* representa, al menos, dos especies crípticas: *H. americana* tipo y *H. nov. sp.* (Fig. 19), con base en el concepto de especies crípticas de Stebbins (1950), ya que aunque existen diferencias morfológicas, éstas son poco conspicuas. En cuanto a la variación de otras

características como la coloración, ésta es casi nula (coloración del tórax y abdomen) (Fig. 19). En cuanto a la variación de la coloración de la mancha alar, ésta es mayor y es una de las características principales que ha llevado al número de sinonimias descritas para *H. americana*, sin embargo, como ya se ha mencionado, este carácter es muy variable incluso dentro de poblaciones y no es importante para el reconocimiento de pareja por parte de la hembra (Drury y Grether 2014).

Hetaerina americana tipo presenta los cerci con la morfología que reporta Garrison (Fig. 20d) (1990), mientras que *H. nov. sp.* presenta un cercus con una morfología no reportada anteriormente. Este morfo varía en la forma y extensión del lóbulo medio así como en la extensión de la cresta superior (Fig. 19). A pesar de que esta variación es evidente, el hecho de no haber sido reportada aún puede deberse a la restringida distribución geográfica de las poblaciones que presentan este morfo.

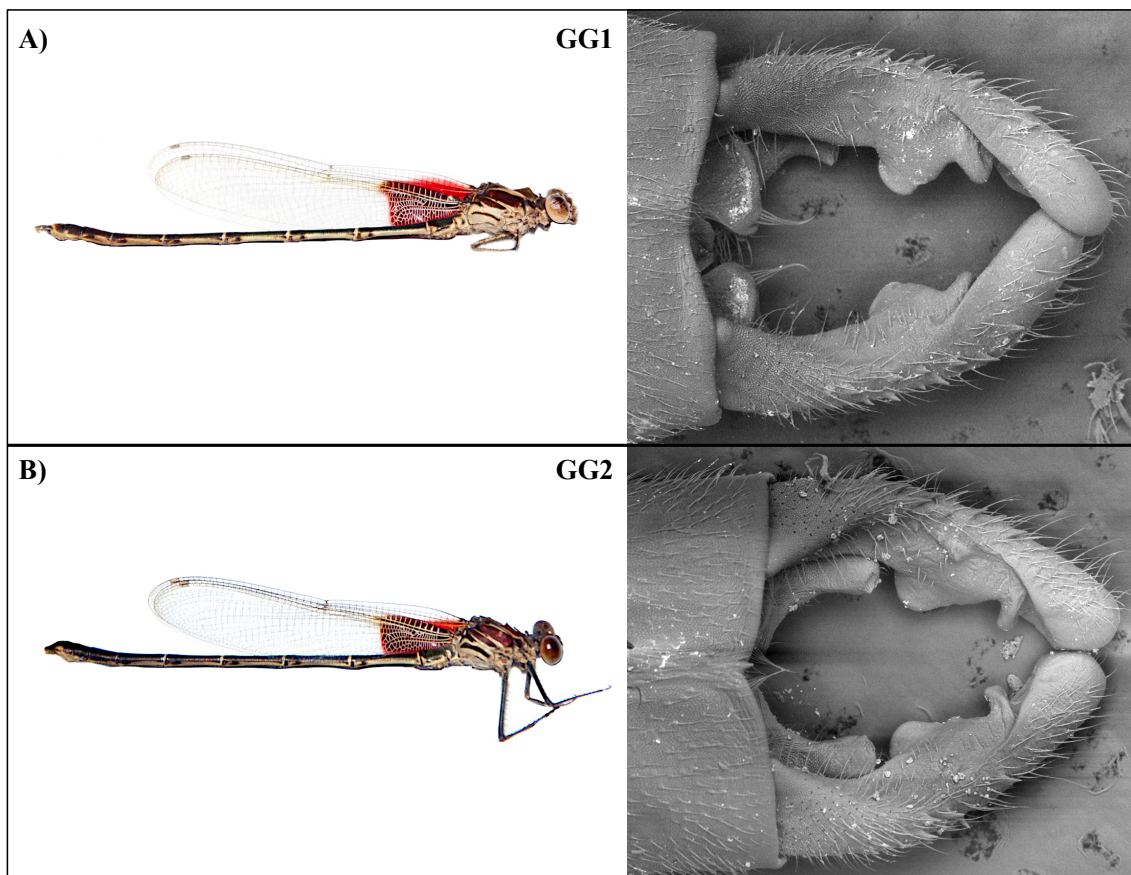


Figura 16. Especies crípticas en *Hetaerina americana*. A) Fotografía de un individuo y del apéndice caudal obtenida mediante microscopio electrónico que pertenecen al GG1 (*H. americana* sensu stricto). B) Individuo y apéndice caudal del GG2. (*H. nov. sp.*). Los apéndices caudales están con un acercamiento de 60x.

Estas dos especies, por lo tanto sólo pueden ser diferenciadas por la forma de los cerci o por datos genéticos nucleares.

Otro punto interesante de este estudio, es el hecho de haber encontrado no sólo dos grupos morfológicos-genéticos, sino una serie de subgrupos claramente diferenciables. Es decir, dentro de *H. americana* tipo hay tres subgrupos morfológico-genéticos, uno que se encuentra hacia el norte de la distribución (EUA y Norte de México) (Fig. 20a), otro más que se encuentra en el centro y sur de México (Fig. 20b) y, por último un grupo que es exclusivo del sur de México (Fig. 20c); estos grupos corresponden a los distintos haplogrupos mitocondriales. Por otro lado, dentro de *H. nov. sp.* hay dos subgrupos más que presentan morfología y composición genética diferente, sin embargo, es necesario aumentar la muestra para tener patrones de diferenciación con

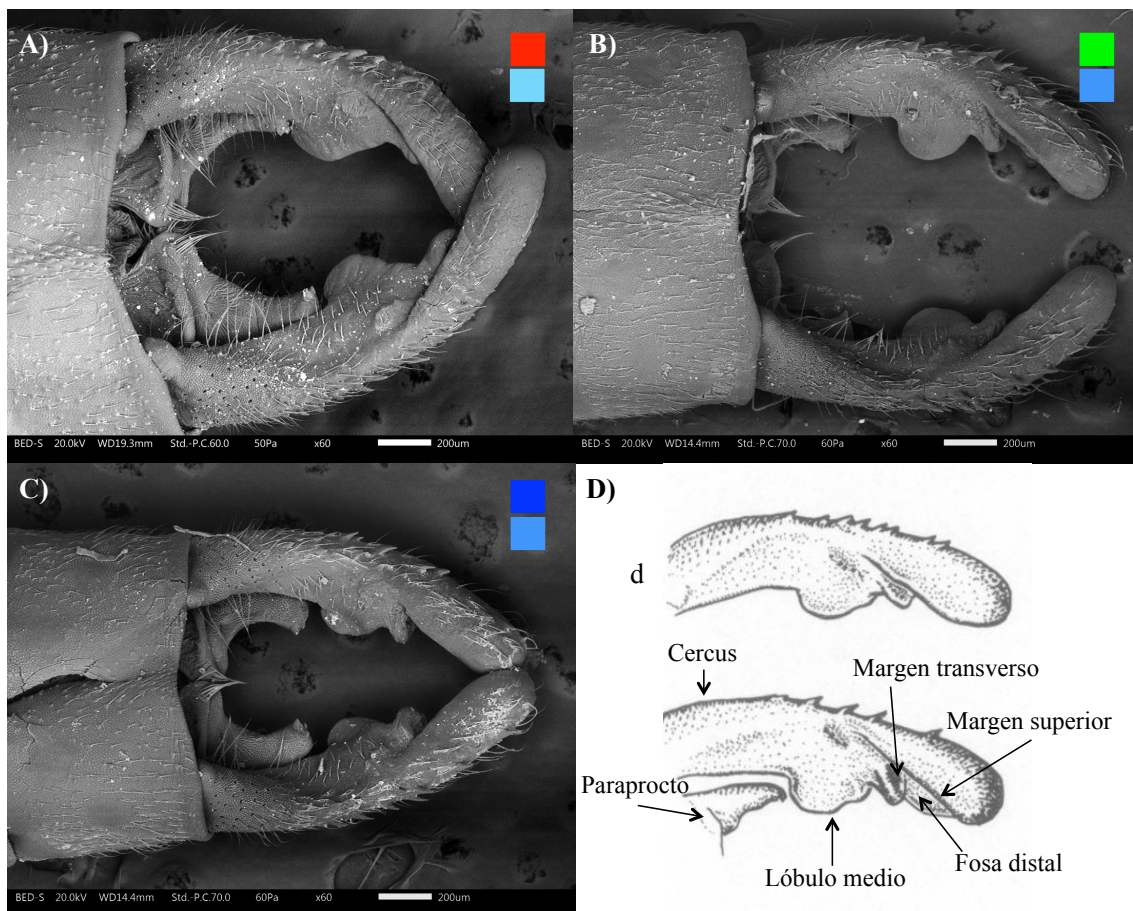


Figura 17. Variación de la forma de los apéndices caudales en el complejo *Hetaerina americana*. A) Morfo característico del GG1A y que además presentan sólo el haplogrupo rojo. B) Morfo del grupo GG1B que pertenecen al haplogrupo verde. C) Morfo del GG1B pero que pertenece al haplogrupo azul. D) Morfotipo descrito por Garrison Garrison (1990) para *H. americana*, se muestra en vista dorsal (d) y mediodorsal, además, se señalan las áreas importantes para el reconocimiento de las especies dentro del género. Modificado de Garrison (1990).

soporte estadístico.

Dado este patrón, *H. americana*, que ha sido reconocida taxonómicamente como una sola especie con base en la forma de los cerci, y la cual presenta una distribución amplia, parece ser un complejo de especies que se encuentra en un proceso de especiación reciente y acelerada. Se ha sugerido que este tipo de procesos de especiación rápidos se pueden dar incluso en condiciones de simpatria como resultado de las preferencias de apareamiento de las hembras (Gavrilets y Boake 1998; Boake 2005). Sin embargo, para determinar de manera más concreta el número de especies crípticas incluidas en el complejo, es necesario agregar otros aspectos, como son geográficos, ecológicos e incluso conductuales.

7.2. Proceso de especiación en odonatos.

Más allá de describir lo que sugerimos es un complejo de especies, es interesante discutir qué mecanismos pudieron haber llevado al proceso de especiación en entidades tan similares morfológicamente, lo que como resultado ha llevado a la variación en estructuras tan importantes en el reconocimiento de pareja como son los cerci, o incluso evaluar si por el contrario esta variación fue la que llevó al proceso de especiación.

El proceso de especiación en los odonatos, al igual que para muchos otros organismos, se ha relacionado con diferentes mecanismos, los cuales no son independientes entre sí (Arnqvist 1997). Se han descrito procesos de especiación por factores ecológicos, biogeográficos y sobre todo aquellos relacionados con la selección sexual.

McPeck y Brown (2000), sugieren un proceso de especiación ecológico para algunas especies neárticas del género *Enallagma*, el cual ha estado dirigido por diferencias en los hábitats donde éstas especies se distribuyen, principalmente, con el tipo de depredadores que se encuentran en las pozas donde habitan. En algunas pozas los

depredadores tope son especies de peces y en otras son larvas de anisópteros. Como resultado, los estadios larvales de las especies de *Enallagma* han desarrollado diferentes tácticas conductuales y fisiológicas dependiendo del depredador, mientras que los adultos muestran estasis morfológica, excepto en los cerci (única característica por la que se puede diferenciar taxonómicamente a estas especies) (Monetti et al. 2002; Stocks et al. 2005; McPeck et al. 2010). Por lo tanto se sugiere que la presión ecológica llevó a la divergencia entre las diferentes especies, sin embargo, al no haber una presión diferencial para los adultos, las diferencias morfológicas contrastantes están en las larvas. En este contexto, el complejo *H. americana* es muy variable ecológicamente, dada la amplia distribución que presenta, sin embargo se tiene poca información acerca de la biología del estado larval, por lo que es importante analizar los efectos de ésta variabilidad en la divergencia de las especies putativas.

Diversos autores sugieren que el mecanismo principal que dirige el proceso de especiación en este grupo es la selección sexual (Svensson et al. 2006; Svensson 2012), incluyendo el conflicto sexual y las interacciones antagonistas. El resultado de este tipo de interacciones es la rápida divergencia en los genitales o estructuras importantes en el proceso reproductivo como los cerci (Cordero-Rivera 2004; Eberhard 2004). Uno de los ejemplos más interesantes es el registrado en el género *Calopteryx*, que pertenece a la misma familia que *Hetaerina*. Svensson et al. (2006) analizaron varias poblaciones de *Calopteryx splendens*, especie que presenta un cortejo precopulatorio que incluye despliegues alares hacia la hembra. Para estos despliegues los machos presentan manchas alares oscuras que brindan información acerca de la calidad del macho. Los autores analizaron los efectos de la selección sexual y natural en relación a estas manchas, encontrando que existe aislamiento reproductivo incluso entre poblaciones, ya que al translocar a los machos entre las diferentes poblaciones, éstos fueron rechazados por las

hembras. Por lo que los autores sugieren que el proceso de especiación en estos organismos está dado por la selección sexual. Cabe resaltar que, para estas especies, el aislamiento reproductivo sólo está en la parte de reconocimiento visual, ya que los cerci no varían entre especies de éste género (al menos no drásticamente como en *Hetaerina*). Por lo anterior, y sabiendo que en el complejo *H. americana* no existe cortejo (precopulatorio), es importante mencionar que el patrón de selección sexual descrito para el género (interacción macho-macho) puede tener un efecto en el proceso de especiación, sobre todo con la variación que existe en las estrategias alternativas de apareamiento. En éste aspecto, Boake (2005) con base en estudios realizados con *Drosophila*, propone que especies con este tipo de características conductuales, pueden desarrollar aislamiento reproductivo más rápidamente que las especies que no las presentan. Sin embargo, el aislamiento reproductivo parece no estar relacionado con la mancha alar (reconocimiento visual por parte de las hembras), por lo que es poco probable que el proceso de especiación haya estado dado por selección sexual. El analizar si existen conductas diferentes sobre todo en poblaciones simpátricas, podría ayudar establecer la significancia de la conducta en el proceso de especiación.

Por último, el proceso de especiación dado por factores biogeográficos ha sido mayormente documentado. En este caso, la fragmentación de las áreas de distribución ancestrales debido a procesos históricos como la variación climática, ha tenido como resultado el aislamiento de las poblaciones así como diferentes procesos demográficos dentro de éstas (e. g. cuellos de botella). Éste tipo de procesos pueden provocar la limitación del flujo genético y como un resultado último la divergencia entre las poblaciones y, dependiendo del tiempo de divergencia, también puede resultar en la variación morfológica. En aquellos casos en los que estas poblaciones vuelven a estar en contacto, y si la variación morfológica sucede en estructuras como los cerci, entonces

se promoverá el aislamiento reproductivo. Estos procesos se han reportado para los géneros *Enallagma* y *Trithemis*, en los que las variaciones climáticas del Plioceno-Pleistoceno provocaron la fragmentación de las poblaciones, y una posterior divergencia del sistema de reconocimiento de especies y/o la divergencia morfológica de las estructuras reproductivas (Turgeon y McPeck 2002; Turgeon et al. 2005; Damm et al. 2010b). En el complejo *H. americana* es difícil saber hace cuánto divergieron las especies putativas, debido al sorteo incompleto de linajes, sin embargo, hay evidencia con base en la datación de los haplotipos, de que el proceso de divergencia fue anterior a tres millones de años, lo cual es incluso mayor al tiempo de divergencia obtenido para dos especies reconocidas taxonómicamente (*H. laesa* y *H. sanguinea*), que fue alrededor de un millón de años atrás (Fig. 9).

Estos tiempos concuerdan con los efectos de la transición Neógeno-Cuaternario y de los ciclos glaciares del Cuaternario, y se ajusta a lo que se esperaría para las poblaciones del norte de la distribución (divergencia por fragmentación de la distribución), lo que apoya la divergencia como resultado de procesos biogeográficos. Sin embargo, para las poblaciones del sur, este patrón no es tan claro ya que estas variaciones climáticas no afectaron de igual manera a esta región que al norte.

Si el proceso de especiación en este grupo se dio en alopatría, es poco probable que la forma de los cerci haya cambiado como respuesta a hábitats contrastantes, sin embargo, esta variación pudo ser resultado de cambios pleiotrópicos, es decir, otras características cambiaron durante la adaptación en alopatría y dada la relación genética con los cerci éstos también se modificaron (Mayr 1970; Robertson y Paterson 1982).

Lo que resulta interesante es que la divergencia de los cerci siempre ha sido interpretada como un resultado del proceso de especiación y no como un mecanismo que lo promueve. Añadir otros datos genéticos así como filogenéticos nos ayudaría a

revisar la evolución de este carácter y aclarar de manera menos ambigua cómo ha sido el proceso de especiación en estos organismos.

VIII. CONCLUSIONES

- Se acepta la hipótesis de diferenciación genética dada por aislamiento reproductivo atribuido a la incompatibilidad entre los cerci y el protórax de las hembras.
- Existe divergencia morfológica y genética dentro de *Hetaerina americana*. Por lo que se sugiere que éste taxón es en realidad un complejo de especies crípticas, ya que, aunque hay diferencias morfológicas asociadas a los cerci, éstas son poco conspicuas.
- El número de especies dentro del complejo no es del todo claro, sin embargo, al menos cinco morfos con composiciones genéticas diferentes son reconocibles. Se sugiere ampliar el muestreo y analizar otros factores como podrían ser conductuales, geográficos, ecológicos, etc., para determinar el número de especies.
- Se sugiere que un proceso de especiación por vicarianza puede haber ocurrido entre los grupos, seguido de un contacto secundario en las poblaciones que ahora son simpátricas, sin embargo, es necesario añadir otros marcadores genéticos para esclarecer el patrón.

Literatura citada

- Alcock, J. 1982. Post-copulatory mate guarding by males of the damselfly *Hetaerina vulnerata* Selys (Odonata: Calopterygidae). *Anim. Behav.* 30(1): 99-107.
- Anderson, C. N., y G. F. Grether. 2013. Characterization of novel microsatellite loci for *Hetaerina americana* damselflies, and cross-amplification in other species. *Conservation Genet. Resour.* 5(1): 149-151.
- Arnqvist, G. 1997. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biol. J. Linn. Soc.* 60(3): 365-379.
- Battin T. J. 1993. Revision of the *puella* group of the genus *Cuenagrion* Kirby, 1890 (Odonata, Zygoptera), with emphasis on morphologies contributing to reproductive isolation. *Hydrobiología* 262(1): 13-29.
- Bartlein P. J., K. H. Anderson, P. M. Anderson, M. E. Edwards, C. J. Mock, R. S. Thompson, R. S. Webb, T. Webb III, y C. Whitlock. 1998. Paleoclimate simulations for North America over the past 21,000 years; features of the simulated climate and comparisons with paleoenvironmental data. *Quat. Sci. Rev.* 17:549-585.
- Bick, G. H., y D. Sulzbach. 1966. Reproductive behaviour of the damselfly *Hetaerina americana* (Fabricius) (Odonata: Calopterygidae). *Anim. Behav.* 14:156-158.
- Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sodhi, P. N L. Ng, R. Meier, K. Winker, K. K. Ingram, y I. Das. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends. Ecol. Evol.* 22(3): 148- 155.
- Boake, C. R. B. 2005. Sexual selection and speciation in Hawaiian *Drosophila*. *Behav. Genet.* 35(3): 297-303.
- Bookstein, F. L. 1991. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. 1er ed. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

- Clement, M., D. Posada, y K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9(10): 1657-1660.
- Contreras-Garduño, J., B. A. Buzatto, M. A. Serrano-Meneses, K. Nájera-Cordera, y A. Córdoba-Aguilar. 2008. The size of the red spot of the American rubyspot as a heightened condition-dependent ornament. *Behav. Ecol.* 19(4): 724-732.
- Corbet, P. S. 1962. A biology of dragonflies. 1er ed. Entomology Research Institute, Ottawa, Canadá.
- Cordero-Rivera, A., J. A. Andrés, A. Córdoba-Aguilar, y C. Utzeri. 2004. Postmating sexual selection: allopatric evolution of sperm competition mechanisms and genital morphology in Calopterygidae damselflies (Insecta: Odonata). *Evolution* 58(2): 349-359.
- Córdoba-Aguilar, A. 1999. Male copulatory sensory stimulation induces female ejection of rival sperm in a damselfly. *Proc. R. Soc. London* 266: 779-784.
- Córdoba-Aguilar, A. 2002. Sensory trap as the mechanisms of sexual selection in a damselfly genitalic trait (Insecta: Calopterygidae). *Am. Nat.* 160(5): 594-601.
- Córdoba-Aguilar, A. 2003. Predicting mechanisms of sperm displacement based on genital morphometrics in calopterygids (Odonata). *J. Insect Behav.* 16(1): 153-167.
- Córdoba-Aguilar, A., y A. Cordero-Rivera. 2005. Evolution and ecology of Calopterygidae (Zygoptera: Odonata): status of knowledge and research perspectives. *Neotrop. Entomol.* 34(6): 861-879.
- Córdoba-Aguilar, A., A. C. Leshner-Treviño, y C. N. Anderson. 2007. Sexual selection in *H. titia* males: a possible key species to understand the evolution of pigmentation in calopterygid damselflies (Odonata: Zygoptera). *Behaviour* 144(8): 931-952.
- Córdoba-Aguilar, A., y D. M. González-Tokman. 2014. The behavioral and physiological ecology of adult Rubyspot damselflies (*Hetaerina*, Calopterygidae,

- Odonata). En: Naguib, M., L. Barret, H. J. Brockmann, S. Healy, J. C. Mitani, T, J. Roper, L. W. Simmons, editores: *Advances in the study of behavior*. Burlington: Academic Press.
- Córdoba-Aguilar, A., E. Uhía, y A. Cordero-Rivera. 2003. Sperm competition in Odonata (Insecta): the evolution of female sperm storage and rival's sperm displacement. *J. Zool.* 261(4): 381-398.
- Córdoba-Aguilar, A., G. Raihani, M. A. Serrano-Meneses, and J. Contreras-Garduño. 2009. The lek mating system of *Hetaerina* damselflies (Insecta: Calopterygidae). *Behaviour* 146(2): 189-207.
- Damm, S., B. Schierwater, y H. Hadrys. 2010. An integrative approach to species discovery in odonates: from character-based DNA barcoding to ecology. *Mol. Ecol.* 19(18): 3881-3893.
- Damm, S., K. B. Dijkstra, y H. Hadrys. 2010b. Red drifters and dark residents: the phylogeny and ecology of a Plio-Pleistocene dragonfly radiation reflects Africa's changing environment (Odonata, Libellulidae, *Trithemis*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 54(3): 870-880.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doalla, y D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9(8): 772-772.
- De Wilde, J. 1964. *Physiology of insecta*. Academic Press, New York, USA. En: Masley, J. P. 2012. 170 Years of "Lock-and-Key": Genital Morphology and Reproductive Isolation. *Int. J. Evol. Biol.* 2012: 1-10.
- Dufour, L. 1844. *Anatomie Générale des Diptères*. *Ann. Sci. Nat.* 1: 244-64. En: Masley, J. P. 2012. 170 Years of "Lock-and-Key": Genital Morphology and Reproductive Isolation. *Int. J. Evol. Biol.* 2012: 1-10.

- Dijkstra, K. B., V. J. Kalkman, R. A. Dow, F. R. Stokvis, y J. V. Tol. 2014. Redefining the damselfly families: a comprehensive molecular phylogeny of Zygoptera (Odonata). *Syst. Entomol.* 39(1): 68-86.
- Drury, J. P., y G. F. Grether. 2014. Interspecific aggression, no interspecific mating, drives carácter displacement in the wing coloration of male Rubyspot damselflies (*Hetaerina*). *Proc. R. Soc. B.* 281: 1-8.
- Earl, D. A., y B. M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genet. Resour.* 4(2): 359-361.
- Eberhard, W. G. 1996. The behavioral ecology of the tropical damselfly *Hetaerina macropus* Selys (Zygoptera: Calopterygidae). *Odonatologica* 15(1): 51-60.
- Eberhard, W. G. 2004. Rapid divergent evolution of sexual morphology: comparative tests of antagonistic coevolution and traditional female choice. *Evolution* 58(9): 1947-1970.
- Evanno, G., S. Regnaut, y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14(8): 2611-2620.
- Excoffier, L, y H. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10(3): 564-567.
- Falush, D., M. Stephens, y J. K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164(4): 1567-1587.

- Feindt, W., O. Fincke, y H. Hadrys. 2014. Still a one species genus? Strong genetic diversification in the world's largest living odonate, the Neotropical damselfly *Megaloprepus caerulatus*. *Conserv. Genet.* 15(1): 469-481.
- Feulner, P. G. D., F. Kirchbaum, C. Schugardt, V. Ketmaier, y R. Tiedemann. 2006. Electrophysiological and molecular genetic evidence for sympatrically occurring cryptic species in African weakly electric fish (Teleostei: Mormyridae: *Campylomormyres*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39(1): 198-208.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147(2): 915-925.
- Garrison, R. W. 1990. A synopsis of the genus *Hetaerina* with descriptions of four new species (Odonata: Calopterygidae). *Trans. Am. Entomol. Soc.* 116(1): 175-259.
- Garrison, R. W. 2006. A synopsis of the genera *Mnesarete* Cowley, *Bryoplathanon* gen. Nov., and *Ormenoplebia* gen. Nov. (Odonata: Calopterygidae). *Contrib. Sci. (Los Angel)* 506: 1-84.
- Gavrilets, S., y C. R. B. Boake. 1998. On the evolution of premating isolation after a founder event. *Am. Nat.* 152(5): 706-716.
- Grether, G. F. 1996. Intrasexual competition alone favors a sexually dimorphic ornament in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution* 50(5): 1949-1957.
- Grether, G. F. 1996b. Sexual selection and survival selection on wing coloration and body size in the rubyspot damselfly *Hetaerina americana*. *Evolution* 50(5): 1939-1948.
- Guillermo-Ferreira R., y K. Del-Claro. 2011. Resource defense polygyny by *Hetaerina rosea* Selys (Odonata: Calopterygidae): influence of age and wing pigmentation. *Neotrop. Entomol.* 40(1): 78-84.

- Grundt, H. H., S. Kjolner, L. Borgen, L. H. Rieseberg, y C. Brochmann. 2006. High biological species diversity in the arctic flora. PNAS 103(4): 972-975.
- Hamilton, C. A., D. R. Formanowicz, y J. E. Bond. 2011. Species delimitation and phylogeography of *Aphonopelma hentzi* (Araneae, Mygalophae, Theraphosidae): cryptic diversity in North American tarantulas. PLoS ONE 6(10): 12-16.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball y J. R. de Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond 270: 313-321.
- Hebert, P. D. N., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen, y W. Hallwachs. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrapter fulgerator*. PNAS 101(41): 14812-14817.
- Johnson, C. 1962. A description of territorial behaviour and a quantitative study of its function in males of *H. americana* (Fabricius) (Odonata: Agridae). The Canadian Entomologist 94: 178-190.
- Johnson, C. 1963. Interspecific territoriality in *Hetaerina americana* (Fabricius) and *Hetaerina titia* (Drury) (Odonata: Calopterygidae) with a preliminary analysis of the wing color pattern variation. Fla. Entomol. 95: 575-582.
- Katz, A. D., R. Giordano, y F. N. Soto-Adames. 2015. Operational criteria for cryptic species delimitation when evidence is limited, as exemplified by North American *Entomobrya* (Collembola: Entomobryidae). Zool. J. Linn. Soc. 173: 181-840.
- Kirkpatrick, M., y V. Ravigné. 2002. Speciation by natural and sexual selection: models and experiments. Am. Nat. 159(53): S22-S35.
- Krieger, F., y E. Krieger-Loibl. 1958. Beitrage zum verhalten von *Ischnura elegans* und *Ischnura pumilio* (Odonata). Zeitschrift für Tierpsychologie 15: 82–93. En: Masley, J. P. 2012. 170 Years of “Lock-and-Key”: Genital Morphology and Reproductive Isolation. Int. J. Evol. Biol. 2012: 1-10.

- Lefevre, K., y V. Muehter. 2004. Competition for mating resources in a territorial damselfly (Odonata: Calopterygidae). *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* 39(2): 159-165.
- Loibl, E. 1958. Zur ethologie und biologie der deutschen lestiden (Odonata). *Zeitschrift für Tierpsychologie* 15: 54–81. En: Masley, J. P. 2012. 170 Years of “Lock-and-Key”: Genital Morphology and Reproductive Isolation. *Int. J. Evol. Biol.* 2012: 1-10.
- Masley, J. P. 2012. 170 Years of “Lock-and-Key”: Genital Morphology and Reproductive Isolation. *Int. J. Evol. Biol.* 2012: 1-10.
- Mayr, E. 1970. *Populations, species and evolution*. Harvard Univ. Press, Cambridge.
- McPeck, M. A., y J. M. Brown. 2000. Building a regional species pool: diversification of the *Enallagma* damselflies in eastern north America. *Ecology* 81(4): 904-920.
- McPeck, M. A., L. B. Symes, D. M. Zong, y C. L. McPeck. 2010. Species recognition and patterns of population variation in the reproductive structures of a damselfly genus. *Evolution* 65(2): 419-428.
- McPeck, M. A., L. Shen, y H. Farid. 2009. The correlated evolution of three-dimensional reproductive structures between male and female damselflies. *Evolution* 63(1): 73-83.
- McPeck, M. A., L. Shen, J. Z. Torrey, y H. Farid. 2008. The tempo and mode of three-dimensional morphological evolution in male reproductive structures. *Am. Nat.* 171(5): E158-E178.
- McPeck, M. A., y S. Gavrilets. 2006. The evolution of female mating preferences: differentiation from species with promiscuous males can promote speciation. *Evolution* 60: 1967-1980.
- Monetti, L., R. A. Sánchez-Guillén, y A. Cordero-Rivera. 2002. Hybridization between *Ichnura graellsii* (Vander Linder) and *I. elegans* (Rambur) (Odonata: Coenagrionidae): are they different species? *Biol. J. Linn. Soc.* 76(2): 225-235.

- Moritz, C., y C. Cicero. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol.* 2(10): e279-e354.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, U.S.
- Paulson, D. R. 1974. Reproductive isolation in damselflies. *Syst. Zool.* 23(1): 40-49.
- Pedraza-Hernández, M. Del C. 2010. El efecto de las señales sexuales en la termorregulación y territorialidad en machos de *Hetaerina vulnerata* (Odonata). Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Peixoto, P. E., y P. de Marco. 2009. No size or density effect on alternative mate-locating tactics in the tropical damselfly *Hetaerina rosea* males (Odonata: Calopterygidae). *Rev. Biol. Trop.* 57(1-2): 361-370.
- Pfenning, K. S. 1998. The evolution of mate choice and the potential for conflict between species and mate-quality recognition. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265(1407): 1743-1748.
- Pfenninger, M., y K. Schwenk. 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evol. Biol.* 7: 121-126.
- Raihani, G., M. A. Serrano-Meneses, y A. Córdoba-Aguilar. 2008. Male mating tactics in the American Rubyspot damselfly: territoriality, nonterritoriality and switching behaviour. *Anim. Behav.* 75(6): 1851-1860.
- Rissler, J. L., y J. J. Apodaca. 2007. Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Syst. Biol.* 56(6): 924-942.
- Robertson, H. M., y H. E. H. Paterson. 1982. Mate recognition and mechanical isolation in *Enallagma* damselflies (Odonata: Coenagrionidae). *Evolution* 36(2): 243-250.

- Rohlf, F. J. 2004. TpsDig, digitize landmarks and outlines, versión 2.0. Stony Brook State University of New York, New York, U.S.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. V. D. Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, y J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61(3): 539-542.
- Sánchez-Guillén, R. A., A. Córdoba-Aguilar, A. Cordero-Rivera, y M. Wellenreuther. 2014. Genetic divergence predicts reproductive isolation in damselflies. *J. Evol. Biol.* 27(1): 76-87.
- Sánchez-Guillén, R. A., M. Wellenreuther, A. Cordero-Rivera, y B. Hansson. 2011. Introgression and rapid species turnover in sympatric damselflies. *BMC Evol. Biol.* 11: 210-226.
- Serrano-Meneses, M. A., A. Córdoba-Aguilar, V. Méndez, S. J. Layen, y T. Székely. 2007. Sexual size dimorphism in the American Rubyspot; male body size predicts male competition and mating success. *Anim. Behav.* 73(6): 987-997.
- Stocks, R., J. L. Nystrom, M. L. May, y M. A. McPeck. 2005. Parallel evolution in ecological and reproductive traits to produce cryptic damselfly species across the holarctic. *Evolution* 59(9): 1976-1988.
- Svensson, E. I. 2012. Non-ecological speciation, niche conservatism and thermal adaptation: how are they connected? *Org. Divers. Evol.* 12(3): 229-240.
- Svensson, E. I., F. Eoukhmanoff, y M. Friberg. 2006. Effects of natural and sexual selection on adaptive population divergence and premating isolation in a damselfly. *Evolution* 60(6): 1242-1253.
- Switzer, P. V. 1997. Factors affecting site fidelity in a territorial animal, *Perithemis tenera*. *Anim. Behav.* 53(4): 865-877.

- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123(3): 585-595.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, y S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis versión 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12): 2725-2729.
- Turgeon, J., y A. McPeck. 2002. Phylogeographic analysis of a recent radiation of *Enallagma* damselflies (Odonata: Coenagrionidae). *Mol. Ecol.* 11:1989-2001.
- Turgeon, J., R. Stocks, R. A. Thum, J. B. Brown, y A. McPeck. 2005. Simultaneous Quaternary radiations of three damselfly clades across the Holarctic. *Am. Nat.* 165(4): E78-E107.
- Vega-Sánchez, Y. M. 2013. Análisis cladístico, genético y morfológico del género *Hetaerina* (Odonata: Calopterygidae). Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Williams, H. C., S. J. Ormerod, y M. W. Bruford. 2006. Molecular systematics and phylogeography of the cryptic species complex *Baetis rhodani* (Ephemeroptera, Baetidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 40(2): 370-382.
- Willkommen, J., S. Michels, y S. N. Gorb. 2015. Functional morphology of the male caudal appendages of the damselfly *Ischnura elegans* (Zygoptera: Coenagrionidae). *Arthropod. Struc. Dev.* 44: 289-300.
- Zelditch, M. L., D. L. Swiderski, y H. D. Sheets. 2012. Geometric morphometrics for biologists: a primer. 2da ed. Academic Press, New York, U.S.

ANEXOS

Anexo I.

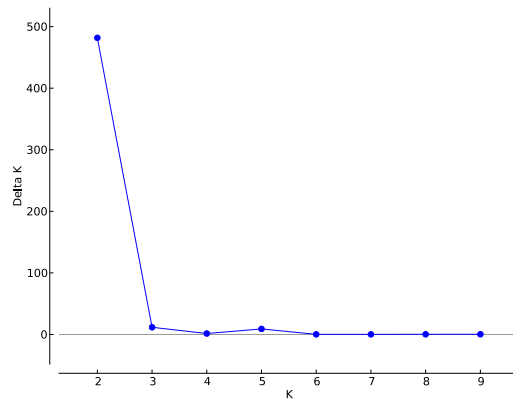


Figura 18. Valor óptimo de K para el grupo GG1. Estimación del número de grupos (K) más probable con base al Delta K.

Anexo II.

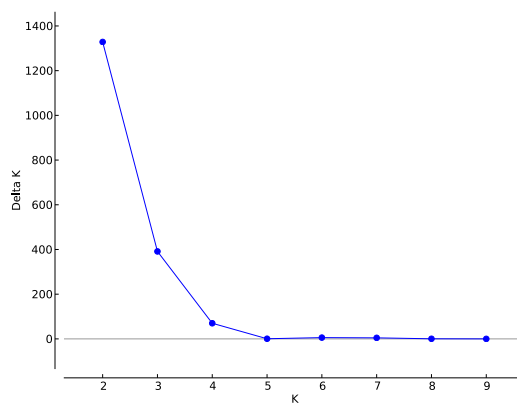


Figura 19. Valor óptimo de K para todas las poblaciones. Estimación del número de grupos (K) más probable con base al Delta K.

Anexo III.

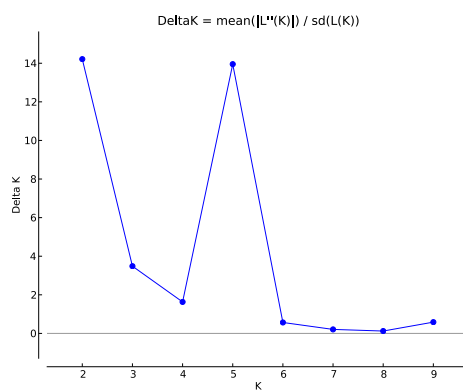


Figura 20. Valor óptimo de K para el grupo GG2. Estimación del número de grupos (K) más probable con base al Delta K.