



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

**LÍMITES ENTRE ESPECIES EN LAS HORMIGAS NEOTROPICALES DEL
COMPLEJO *ECTATOMMA RUIDUM* (FORMICIDAE: ECTATOMMINI)**

TESIS

POR ARTÍCULO CIENTÍFICO

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. REINA GABRIELA AGUILAR VELASCO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. ROXANA ACOSTA GUTIERREZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

DR. ADRIAN NIETO MONTES DE OCA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

CD. MX.

JUNIO, 2018



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.

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por permitirme llevar a cabo mis estudios, y por brindarme todo el apoyo necesario para la realización de la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para poder cubrir los gastos necesarios mientras llevaba a cabo mis estudios de maestría y al programa de becas mixtas para becarios CONACYT, por el apoyo económico otorgado para la realización de la estancia de investigación.

A mi director de tesis el **Dr. Alejandro Zaldívar Riverón** por su apoyo durante la planeación y desarrollo de este proyecto.

A los miembros de mi Comité Tutor: a la **Dra. Roxana Acosta Gutiérrez** y al **Dr. Adrian Nieto Montes de Oca**, por su puntual asistencia a los tutoriales y por sus valiosas sugerencias y orientarme a lo largo de todo el proceso.

Agradecimientos a título personal

Al M. C. **J. Martin de los Santos**, por su apoyo, comprensión y paciencia durante todo el proyecto, por acompañarme en los momentos buenos y malos, por su cariño y por todas sus atenciones.

A mis compañeros del Zaldívar's Lab. por sus valiosos consejos y por ayudarme a resolver mis dudas.

Dedicatoria

A mi gran compañero J. Martin de los Santos Crespo, por caminar a mi lado siempre.

A mis abuelos Jesús Velasco Cruz y Bartola Cruz Vicente.

A mi familia.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM


Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **29 de enero de 2018** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Sistemática** de la alumna **AGUILAR VELASCO REINA GABRIELA** con número de cuenta **306135424** por la modalidad de graduación de **tesis por artículo científico** titulado: "**Uncovering species boundaries in the Neotropical ant complex *Ectatomma ruidum* (Ectatomminae) under the presence of nuclear mitochondrial paralogues**", que es producto del proyecto realizado en la maestría que lleva por título: "**LÍMITES ENTRE ESPECIES EN LAS HORMIGAS NEOTROPICALES DEL COMPLEJO *ECTATOMMA RUIDUM* (FORMICIDAE: ECTATOMMINI)**", ambos realizados bajo la dirección del **DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DR. CARLOS SALVADOR PEDRAZA LARA**
Vocal: **DR. JAIRO ANDRÉS ARROYAVE GUTIÉRREZ**
Secretario: **DR. ADRIAN NIETO MONTES DE OCA**
Suplente: **DRA. ROXANA ACOSTA GUTIÉRREZ**
Suplente: **DR. ATILANO CONTRERAS RAMOS**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 11 de mayo de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



ÍNDICE

1.	Resumen	8
2.	Abstract	10
3.	Introducción	11
3.1	<i>Diversidad de la región neotropical</i>	11
3.2	<i>Formicidae</i>	12
3.3	<i>Origen de las hormigas</i>	14
3.4	<i>Importancia de las hormigas</i>	15
3.5	<i>Ectatomma ruidum</i>	16
3.6	<i>Delimitación de especies basada en secuencias de ADN</i>	19
3.7	<i>Numts y mt introgresión</i>	21
4.	Justificación	23
5	Objetivo General	23
6.	Uncovering species boundaries in the Neotropical ant complex <i>Ectatomma ruidum</i> (Ectatomminae) under the presence of nuclear mitochondrial paralogues	24
7.	Discusión General	40
7.1	<i>Presencia de numts en los análisis de delimitación de especies</i>	40
7.2	<i>ADN de Recombinación Nuclear</i>	42
7.3	<i>Taxonomía Integradora</i>	43
7.4	<i>Presencia de Microgínias</i>	45
8.	Conclusiones	46

9.	Literatura citada	47
10.	Material Anexo	52
	Tabla S1. Lista de especímenes, localidades, números de identificación y números de GenBank para COI, Cit b y H3.	53
	Tabla S2. Características de los marcadores genético examinados.	57
	Tabla S3. Distancias genéticas corregidas por pares para el marcador de COI entre y dentro de las morfoespecies delimitadas en este estudio.	58
	Figura S1. Los filogramas bayesianos derivados de los análisis separados de los conjuntos de datos COI y cit b que incluyen todas las secuencias examinadas. Las secuencias consideradas como pseudogenes, se indican con una línea negra. Los círculos negros cerca de las ramas indican los valores de probabilidades posteriores ≥ 0.95 .	59
	Figura S2. Filograma derivado del análisis bayesiano realizado con el marcador Cit b excluyendo todos los pseudogenes e híbridos potenciales. Los círculos negros cerca de las ramas son probabilidades posteriores ≥ 0.95 . Las líneas de color se refieren a los principales linajes recuperados. Los nombres de taxones se refieren a las morfoespecies delimitadas.	62
	Figura S3. Fotografías digitales que muestran vistas laterales y dorsales del tronco, peciolo y gaster de especímenes representativos pertenecientes a las cuatro morfoespecies delimitadas asignadas originalmente a <i>E. ruidum</i> : A, <i>E. gibbum</i> ; B, <i>E. ruidum</i> ; C, <i>E. sp. ruidum 2</i> ; D, <i>E. sp. ruidum 3</i> ; E, <i>E. sp. ruidum 4</i> ; F, <i>E. sp. ruidum 2 X sp. ruidum 3</i> .	63
	Figura S4. Dibujos que muestran las diferencias observadas en la joroba pronotal y el nodo peciolar entre las especies potenciales delimitadas, pertenecientes al complejo <i>Ectatomma ruidum</i> .	64

LÍMITES ENTRE ESPECIES EN LAS HORMIGAS NEOTROPICALES DEL COMPLEJO *ECTATOMMA RUIDUM* (FORMICIDAE: ECTATOMMINI)

1. RESUMEN

Los genes parálogos mitocondriales nucleares (*numts*) son fragmentos no funcionales de ADN mitocondrial integrados en el genoma nuclear que pueden ser amplificados mediante el uso de cebadores universales, y su inclusión en estudios en sistemática puede sobrestimar el número de especies. Dado que los *numts* tienen tasas de mutación relativamente bajas no pueden ser detectados fácilmente por los métodos convencionales, tales como la presencia de codones de paro internos, indels o polimorfismo en cromatogramas. El estudio de límites de especies basados en ADN mitocondrial por lo tanto requiere de una evaluación exhaustiva en busca de *numts*, especialmente en el caso de insectos, en donde este fenómeno es más frecuente. *Ectatomma ruidum* es una especie de hormiga con amplia distribución en el neotrópico, encontrándose desde el centro de México hasta el norte de Brasil. Debido a su considerable variación morfológica y a su similitud con otras especies cercanamente relacionadas, en este trabajo se evalúan los límites de las especies en *E. ruidum* basados en muestras recolectadas en localidades situadas a lo largo de la región Neotropical. Para ello, se examinaron tanto caracteres de morfología externa, así como secuencias de dos marcadores mitocondriales (COI y citocromo *b*) y un marcador nuclear (H3). Se detectaron parálogos mitocondriales tanto antiguos (*paleonumts*) como recientes (*neonumts*) en varios ejemplares. Sin embargo, mediante el empleo de un método de dilución pre-PCR en las extracciones de ADN se pudieron recuperar la mayor parte de las secuencias ortólogas. Con base en la congruencia encontrada entre el análisis molecular de delimitación de especies y las morfoespecies identificadas, se propone que *E. ruidum* en realidad está compuesto de al menos tres unidades evolutivas (i.e. especies). Dos de estas especies presentan una distribución geográfica amplia a lo largo de la región neotropical, mientras que la restante está restringida a localidades situadas cerca de la costa del Pacífico en el sureste de México. La evidencia obtenida con el marcador nuclear H3 sugiere la existencia de híbridos entre dos de

las especies en el sureste de México. Este estudio concuerda con estudios previos de otros taxones de animales, que han revelado una compleja historia evolutiva y una diversidad de especies que ha pasado desapercibida a lo largo de la costa del Pacífico mexicano.

2. ABSTRACT

Nuclear mitochondrial (mt) paralogues (*numts*) are non-functional fragments of mtDNA integrated into the nuclear genome that can overestimate the number of species in analyses based on mtDNA sequences. As *numts* have relatively slow mutation rates, they can pass undetected by conventional procedures such as inspecting for internal stop codons, indels or apparent polymorphism in chromatograms. Species boundaries based on mtDNA markers therefore require a thorough assessment of *numts*, especially in insects, where this phenomenon appears to be relatively frequent. *Ectatomma ruidum* is a widely distributed Neotropical ant species that is distributed from northern Mexico to northern Brazil. Previous behavioural and molecular evidence suggests that this species actually represents a composite taxon. Here we assessed the species boundaries in *E. ruidum* based on two mt (COI, Cit b) and one nuclear (H3) marker, as well as on external morphology. Ancient and recent mt paralogues were detected in several specimens, although pre-PCR dilution of DNA template helped to recover most of the mt orthologues. Based on the congruence found between our species delineation obtained from the mt genealogies and the discriminated morphospecies, we propose that *E. ruidum* is actually composed of at least three species. Two of these species have a wide geographical distribution in the Neotropics, whereas the remaining one was restricted to localities situated near the Pacific coast in south-east Mexico. We also found extensive intra- and interspecific variation in the barcoding locus. Moreover, the nuclear evidence suggests the existence of hybrids between two of these species in Oaxaca, south-east Mexico. This study agrees with previous studies of other closely related animal taxa, which have revealed a complex evolutionary history and overlooked species diversity in the latter region.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. *Diversidad de la región Neotropical*

La región Neotropical comprende los trópicos del continente americano, incluyendo desde la parte central y sur de México hasta el sur de sudamérica, así como las llamadas Indias Occidentales o islas del caribe: Antillas y Bahamas (Morrone, 2015) y ha sido dividida en cuatro subregiones: Caribeña, dividida en 29 provincias; Amazonica, con 13 provincias; Chaqueña, con 5 provincias; y Paranaense, que a su vez se divide en 3 provincias biogeográficas (Morrone, 2001; 2014 y 2015). En México, la región Neotropical se superpone con la región neártica en la zona de transición mexicana, mientras que en América del Sur se superpone con la región andina en la zona de transición sudamericana. Ambas zonas pertenecen tanto a la región Neotropical como a las regiones Neártica y Andina, respectivamente (Morrone 2015).

En la región Neotropical se concentra una extraordinaria riqueza de especies, resultado de la suma de especies de diferentes edades, lo cual puede explicarse por los grandes procesos geológicos y climáticos de la región, tales como las reorganizaciones paleogeográficas del periodo Terciario, los cambios climáticos durante el Cuaternario y los efectos de los cambios paleogeográficos del Mioceno y Plioceno en las tendencias de especiación, todos ellos relacionados con el surgimiento y desaparición de puentes y barreras (Rull 2007). Por ejemplo, el levantamiento de los Andes y el cierre del istmo de Panamá han jugado un papel significativo en la configuración de los patrones de biodiversidad neotropicales, así como a la capacidad de adaptación a nivel individual y poblacional de los organismos (Gutiérrez-García y Vázquez Domínguez, 2013; Rull 2007, 2008, 2011a y b; 2014). En particular, el Neotrópico es una de las regiones que presentan un mayor número de géneros de hormigas, mientras que las biorregiones Neotropical, Afrotropical y Australiana tienen el mayor porcentaje de géneros de hormigas endémicas (Fernández, 2003).

3.2. *Formicidae*

Las hormigas son insectos de la familia Formicidae, y junto con las abejas, avispas y afines, pertenecen al orden Hymenoptera. Las hormigas se caracterizan por presentar una glándula metapleuraleal, pecíolo y antenas acodadas (Fernández, 2003). Suelen formar colonias, por lo que son consideradas como organismos eusociales, ya que presentan una avanzada división de castas (Fernández, 2003, Wilson y Hölldobler, 2005). Una casta es un grupo de organismos que pertenece un grupo morfológico especializado en realizar funciones específicas dentro o fuera el nido, (Hölldobler y Wilson, 1990).

La eusociedad que tienen las hormigas cumple con cuatro características principales (Bourke y Franks, 1995):

1. División del trabajo de reproducción: individuos fértiles e infértiles que trabajan en conjunto para beneficio de los reproductores.
2. Cooperación en el cuidado de las crías: la descendencia ayuda a los progenitores durante su vida en la colonia.
3. Generaciones de adultos diferentes que ayudan al cuidado de la descendencia.
4. Altruismo: comportamiento que ayuda a incrementar la supervivencia de la descendencia.

Tipos principales de castas:

Obreras:

Las obreras son hembras sin alas (ápteras), casi siempre estériles y diploides (Jaffé, 1993). Esta es la casta más abundante de una colonia y la que se observa con mayor frecuencia. Las obreras recolectan comida, cuidan la prole de la reina, construyen y dan mantenimiento al nido y protegen a la colonia, entre muchas otras labores (Hölldobler y Wilson, 1990; Robinson, 1992).

El cuerpo de las obreras esta segmentado en tres partes: cabeza, tórax y abdomen. El tórax incluye el primer segmento abdominal fusionado con el tórax (propodeo), El abdomen incluye el pecíolo, el gáster y un aguijón con ovarios reducidos o atrofiados. En algunas especies, las obreras pueden estar divididas en subcastas llamadas *minor*, *media* y *mayor*, las cuales son variaciones en el tamaño con la misma morfología, las hormigas *mayor* defienden el nido de los depredadores y son conocidas comúnmente como soldados ([Robinson, 1992](#); [Fernández, 2003](#)).

Reinas:

Las “reinas” son hembras aladas/reproductoras diploides, tienen cabeza prognata, antenas entre cuatro y doce segmentos, escapo, glándula metapleurale normalmente presente, pecíolo, aguijón presente, funcional o secundariamente ausente o atrofiado y ovarios completamente funcionales ([Fernández, 2003](#)). Las hembras reproductoras pierden sus alas después del apareamiento.

Las comunidades de hormigas están dirigidas por una o varias reinas, cuya misión es la puesta de huevecillos para garantizar la supervivencia de la colonia. En algunas especies pueden encontrarse más de una reina (poliginia), y en ocasiones difieren en tamaño y en la cantidad de huevos que pueden llegar a depositar ([Jaffé, 1993](#)). En general, las reinas pueden clasificarse por su tamaño en a) macroginias (reinas grandes, aladas, comunes en colonias monogínicas; y b) microginias (reinas pequeñas, presentes en algunas colonias poligínicas). Al parecer, las hembras microginias son una reducción isométrica del tamaño corporal de las macroginias, que a pesar de su reducido tamaño tienen la capacidad de procrear tanto reinas, obreras como machos ([Hölldobler and Wilson 1990](#); [Schatz et al., 1996](#); [Lachaud et al. 1999](#)).

Machos:

Los machos, son alados y haploides, se originan de un huevo sin fecundar su función dentro del nido es la de fecundar a las hembras reproductoras. Tienen cabeza y mandíbulas pequeñas, con ojos y ocelos desarrollados, antenas entre 9 y

13 segmentos y tórax con escleritos asociados al vuelo ([Hölldobler and Wilson 1990](#), [Jaffé, 1993](#)).

3.3. *Origen de las hormigas*

Los fósiles encontrados de hormigas y avispas parecidas a hormigas se remontan a mediados del Cretácico, aunque son escasos (1%), pero se vuelven más comunes en depósitos terciarios: 5% en el Eoceno, 20% en el Oligoceno temprano y 36% en el Mioceno ([Ward, 2007](#)). Con base en el material fósil, el origen de las hormigas se remonta hacia el Cretácico inferior ([Grimaldi y Agosti, 2000](#)), hace aproximadamente 120 millones de años, poniendo como límite el Barremiano ([Fernández, 2003](#)).

Según una hipótesis, la diversificación de las hormigas está relacionada con las angiospermas y su éxito evolutivo está relacionado con la ocupación de la capa disponible de hojarasca de los bosques dominados por angiospermas (hábitats), ya que, hasta nuestros días, la diversidad de hormigas es más alta en los suelos de los bosques de angiospermas del mundo, particularmente en los trópicos ([Moreau et al., 2006](#); [Ward, 2007](#)). Además, la radiación de algunos grupos de insectos herbívoros proporcionó un recurso alimenticio indirecto para las hormigas, las cuales fueron capaces de alimentarse de secreciones producidas por larvas de Hemiptera y nectarios extraflorales ([Wilson y Hölldobler 2005](#), [Moreau et al., 2006](#); [Ward, 2007](#))

3.4. *Importancia de las hormigas*

Las hormigas representan uno de los componentes más dominantes y exitosos de los ecosistemas tropicales (Folgarait 1998; Wilson y Hölldobler, 2005), tienen una gran importancia ecológica debido a que prestan servicios ecosistémicos tales como hábitos depredadores, carroñeros, herbívoros, detritívoros y dispersores de semillas (mirmecocoria) (Rojas-Fernández, 2001; Giladi, 2006).

Los formícidos tienen una importante participación tanto en los procesos físicos como químicos del suelo, contribuyendo de forma importante en los procesos de descomposición, aeración y el reciclaje de nutrientes, siendo por lo tanto considerados como verdaderos “ingenieros biológicos” (Lobry de Bruyn y Conacher, 1990; Jaffé, 1993; Brussard *et al.*, 1997). Asimismo, las hormigas representan una importante fuente de alimento tanto para muchos vertebrados como invertebrados (Schultz y McGlynn, 2000).

Las hormigas pueden habitar en casi todos los ambientes terrestres, desde el subsuelo hasta las copas de los árboles, sobre y dentro de las plantas, y en el suelo en nidos subterráneos (hipogeos), pueden encontrarse desde el nivel del mar hasta los 4,000 metros de altitud (Fernández, 2003; Hölldobler y Wilson, 1990; Suarez *et al.*, 2010).

3.5. *Ectatomma ruidum*

Las hormigas del género *Ectatomma* Smith, 1858 están incluidas dentro de la subfamilia Ectatomminae Emery, 1895 y a su vez dentro de la tribu Ectatommini Emery, 1895 (Bolton, 2003; Moreau *et al.*, 2006; Ouellette *et al.*, 2006; Ward, 2007; Keller, 2011; Moreau y Bell, 2013). *Ectatomma* es uno de los géneros más comunes de hormigas “cazadoras” en la región Neotropical, y actualmente está representado por 15 especies descritas (Bolton, 2003): *Ectatomma bruneum* Smith 1858; *Ectatomma confine* Mayr, 1870; *Ectatomma edentatum* Roger, 1863; *Ectatomma gibbum* Kugler y Brown, 1982; *Ectatomma goninion* Kugler y Brown, 1982; *Ectatomma gracile* Emery, 1891; *Ectatomma lugens* Emery, 1894; *Ectatomma muticum* Mayr, 1870; *Ectatomma opaciventre* (Roger, 1861); *Ectatomma parasiticum* Feitosa y Fresneau, 2008; *Ectatomma permagnum* Forel, 1908; *Ectatomma planidens* Borgmeier, 1939; *Ectatomma ruidum* (Roger, 1860); *Ectatomma suzanae* Almeida Filho, 1986; *Ectatomma tuberculatum* (Olivier, 1792); *Ectatomma vizottoi* Almeida Filho, 1987.

De las especies reconocidas del género *Ectatomma*, *E. ruidum* (Roger, 1860) es una de las que tienen una mayor distribución geográfica, con registros que van desde los estados de Michoacán, Guerrero, Veracruz y Chiapas en México hasta el sureste de Ecuador y norte de Brasil (Kempf, 1972). Esta especie ha sido registrada en altitudes que van del nivel del mar hasta los 1500-2200 msnm (Kempf, 1972; Lauchaud, 1990; Arias-Penna, 2008). Ha sido ampliamente estudiada en el campo de la etología en estudios de aprendizaje (Schatz *et al.*, 1994, 1999), cleptobiosis (Perfecto y Vandermeer, 1993), forrajeo (Lachaud, 1990; Passera *et al.*, 1994; Schatz *et al.*, 1995 y 1996) y comportamiento social (Lachaud, 1985 y 1990; Corbara *et al.*, 1989; Pratt, 1989; Passera *et al.*, 1994; Schatz *et al.*, 1994, 1995; Lachaud *et al.*, 1999).

Se sabe que *E. ruidum* nidifica bajo el suelo (hipogeo), pero presenta un forrajeo epigeo (hojarasca) y algunas veces subarbóreo (Fernández, 1991). Su dieta es omnívora, aunque se considera en su mayoría carnívora, por lo cual desempeña un papel biológico muy importante en el control de algunos invertebrados

(Lauchaud, 1990). En *E. ruidum*, a diferencia de otras especies, las obreras forrajean individualmente cada una en un área designada, la cual recorren periódicamente en busca de larvas, huevos de artrópodos, cadáveres de insectos o cualquier organismo pequeño que pueda servir de alimento (Jaffé, 1993). No obstante, en algunas ocasiones los individuos de esta especie pueden llegar a utilizar una forma arcaica de forrajeo masivo, dependiendo del tipo de presa y la distancia entre el nido y la fuente de alimento (Schatz *et al.*, 1996). Además de cazar, las hormigas de *E. ruidum* se alimentan de nectarios florales y extraflorales y de secreciones azucaradas producidas por homópteros y otros chupadores de savia (Fernández, 1991; Jaffé, 1993).

Los ejemplares de *E. ruidum* presentan un comportamiento defensivo denominado “muerte simulada”, que consiste en detener cualquier movimiento cuando se presenta alguna perturbación, así como esconderse bajo la hojarasca y permanecer algunos segundos quietos, para continuar con su actividad cuando dejan de sentirse amenazadas (Cupul-Magaña, 2009).

Los nidos de *E. ruidum* son simples, con cámaras que se encuentran de 20 a 60 cm debajo de la tierra, y sus colonias llegan a albergar de 50 a 200 individuos aproximadamente. Las castas son morfológicamente similares, ya que los machos y hembras reproductoras solo se diferencian en su tamaño de las obreras (Fernández, 1991; Jaffé, 1993).

Varios trabajos han resaltado que existe una variación morfológica considerable en *E. ruidum* en diversas regiones ubicadas a lo largo de su distribución geográfica (Kugler y Brown, 1982; Arias-Penna, 2008), lo cual sugiere que ésta especie en realidad podría representar un taxón compuesto por varios linajes evolutivos, es decir, especies. En particular, *E. aztecum* (Emery 1901), una especie originalmente descrita para el suroeste de México (localidad tipo únicamente mencionada como “Michoacán”), fue considerada como sinónimo de *E. ruidum* por Kugler y Brown (1982). No obstante, estos autores observaron algunas diferencias morfológicas entre los ejemplares examinados anteriormente asignados

a *E. aztecum*, principalmente en la escultura del primer tergo gástrico (Kugler y Brown, 1982).

Actualmente, *E. ruidum* se caracteriza morfológicamente del resto de las especies de su género por presentar: cabeza en vista frontal con el contorno posterior casi recto; tubérculos laterales del pronoto rectangulares o agudos y subiguales en tamaño al tubérculo medio; y nodo peciolar en vista lateral alto y delgado, por lo menos la mitad superior con la cara anterior y la posterior vertical y subparalela (Arias-Penna, 2008).

Por otra parte, otra de las especies de *Ectatomma*, *E. gibbum* Kugler y Brown, 1982 es morfológicamente similar a *E. ruidum*, por lo que son frecuentemente confundidas. No obstante, *E. gibbum* tiene una distribución más restringida, registrada solo para Costa Rica (Holotipo: La Selva), Nicaragua, Honduras y Colombia (Kugler y Brown, 1982; Arias-Penna 2008).

En Colombia, esta especie se encuentra en tierras bajas, entre los 6 a 900 msnm (Arias-Penna, 2003, 2008). Las características morfológicas diagnósticas de *E. gibbum* incluyen la presencia de una joroba pronotal elevada y redondeada; los tubérculos laterales reducidos y ligeramente más gruesos; nodo peciolar sin constricción; y contorno posterior del cabeza redondeado notablemente, formando un arco de ojo a ojo (Kugler y Brown, 1982; Arias-Penna, 2008).

En un estudio filogenético entre miembros de 12 de 15 de las especies reconocidas de *Ectatomma* empleando marcadores mitocondriales y nucleares (Nettel-Hernanz *et al.*, 2015), los ejemplares examinados de *E. ruidum* se recuperaron en dos clados separados, uno con especímenes de poblaciones en donde se habían registrado reinas microginias, y otro con ejemplares de localidades en donde no se tiene registro alguno de la presencia de este tipo de reinas. Esta evidencia, y la variación morfológica existente en las poblaciones de *E. ruidum* a lo largo de su distribución sugieren que esta especie pudiera representar en realidad un taxón compuesto de varias especies.

3.6. *Delimitación de especies basada en secuencias de ADN*

La delimitación de especies es de gran importancia en los estudios de diversidad biológica, y algunos métodos que cumplen con este objetivo son los métodos basados en distancias genéticas. Este enfoque ha demostrado ser una herramienta rápida y generalmente fiable para la identificación de las especies en la mayoría de los grupos de animales (Hebert *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2007; Kerr *et al.*, 2009). No obstante, este criterio ha sido criticado por asumir que la tasa de sustitución varía uniformemente con el tiempo en todos los taxones animales (Papadopoulou *et al.*, 2010). El código de barras de la vida (DNA Barcoding), por ejemplo, ha propuesto emplear información del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I o COI (aprox. 650 pares de bases) en todas las especies (Hebert *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2006)

Otros métodos se basan en la teoría de la coalescencia, ([Fujita *et al.*, 2012](#); [Fujisawa, 2013](#)) como el método Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC), el cual utiliza un árbol ultramétrico en el que es posible diferenciar los eventos de especiación, de los eventos de coalescencia intraespecífica ([Pons *et al.*, 2006](#)).

3.7. *Numts e integración mitocondrial*

En la delimitación de especies con base en secuencias de ADN mitocondrial existen dos fenómenos principales que ocurren con mayor frecuencia de lo que se pensaba anteriormente, y que pueden oscurecer el reconocimiento preciso de los linajes evolutivos diferentes cuando no son detectados.

Uno de ellos es la presencia de pseudogenes mitocondriales (mt) provenientes del núcleo (*numts*), los cuales son fragmentos de ADNmt no funcionales que se integran en el genoma nuclear (López *et al.*, 1994; Bensasson *et al.*, 2001; Song, *et al.*, 2014). Estos parálogos mt se pueden coamplificar accidentalmente mediante las reacciones en cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores conservados (Benesh *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2014), principalmente cuando el ADN se emplea sin una purificación previa.

Si individuos de una especie tienen regiones parálogas a la región de ADN mitocondrial de interés, entonces los cebadores de la PCR a veces reconocen tanto a las secuencias mt, y en algunos casos con mayor afinidad a las secuencias *numts*. Esto da como resultado genealogías de genes incorrectas, una mala identificación de especies, así como la posterior sobreestimación de su número (Bensasson *et al.*, 2001).

Los *numts* se clasifican en dos clases de acuerdo a su ubicación en el árbol filogenético, así como a sus longitudes de rama:

- 1) Los *neonumts* o *numts* recientes, que no han tenido el tiempo de acumular mutaciones y forman politomías con el clado ortólogo. Se caracterizan por tener longitudes de rama muy cortas y son diferentes al ortólogo, solo en algunos pares de bases, pero también algunas de estas secuencias podrían ser más divergentes del ortólogo si la región del genoma nuclear donde se insertaron evoluciona rápidamente (Song *et al.*, 2014).

2) Los paleonumts o *numts* antiguos, representan la inserción nuclear antes de la ocurrencia de eventos de especiación en un grupo. Éstas secuencias presentan longitudes de rama característicamente más largas, no se agrupan con el ortólogo y pueden observarse formando un clado propio (Song *et al.*, 2014).

La introgresión es la transferencia de información genética de una especie a otra. Se ha demostrado que este fenómeno conduce a errores en la asignación de número de eventos de especiación de taxones, ya que implica la integración de genes de una especie o población a otra especie a través de la hibridación seguida por el retrocruzamiento de los híbridos con tipos parentales puros de una o ambas especies (Maynard, 1996). Este fenómeno puede ocasionar que las secuencias de ADN de una especie sean más similares a las secuencias de diferentes especies y conduzcan a la incongruencia dentro de los árboles genéticos (Bryson *et al.*, 2014). El fenómeno de introgresión hace que las secuencias de ADN de una especie sean más similares a las de otra especie y de lugar a la incongruencia en los árboles de genes (Bryson *et al.*, 2014).

4. JUSTIFICACIÓN

Varios trabajos han resaltado variación morfológica considerable en *E. ruidum* en diversas regiones ubicadas a lo largo de su distribución conocida (Kugler y Brown, 1982; Arias-Penna, 2008). Esta evidencia sugiere que este podría representar en realidad un taxón compuesto por varios linajes evolutivos (i.e. especies). Para conocer si *E. ruidum* está compuesta de más de una especie, en este estudio se han empleado marcadores mt y nucleares. El presente estudio tiene una relevancia importante, ya que *E. ruidum* es una especie que ha sido muy estudiada en el campo de la etología, principalmente en cuanto a forrajeo y comportamiento social.

5. OBJETIVO GENERAL

Investigar el número de eventos de especiación dentro de *Ectatomma ruidum* a lo largo de su distribución geográfica conocida, empleando un enfoque de taxonomía integradora mediante el uso de dos marcadores mt (COI y Cit b), uno nuclear (H3) y morfología externa.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Detectar la posible presencia de parálogos mt (*paleo*, *neonumts*) en los ejemplares examinados de *E. ruidum*.
- Investigar la posible presencia de recombinación en las secuencias de ADN de los marcadores mt y el marcador nuclear.
- Investigar los límites entre especies en las poblaciones estudiadas de *E. ruidum* con base en dos marcadores mt y morfología externa.

6. **Uncovering species boundaries in the Neotropical ant complex *Ectatomma ruidum* (Ectatomminae) under the presence of nuclear mitochondrial paralogues**



Uncovering species boundaries in the Neotropical ant complex *Ectatomma ruidum* (Ectatomminae) under the presence of nuclear mitochondrial paralogues

REINA GABRIELA AGUILAR-VELASCO¹, CHANTAL POTEAUX², RUBI MEZA-LÁZARO¹, JEAN-PAUL LACHAUD^{3,4}, DMITRY DUBOVIKOFF⁵ and ALEJANDRO ZALDÍVAR-RIVERÓN^{1,*}

¹Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 3er. circuito exterior s/n, Cd. Universitaria, Copilco Coyoacán A. P. 70–233, C. P. 04510, Ciudad de México, México

²Laboratoire d'Éthologie Expérimentale et Comparée, EA 4443, Sorbonne Paris Cité, 99 avenue J.-B. Clément, 93430 Villetaneuse, France

³Centre de Recherches sur la Cognition Animale, CNRS-UMR 5169, Université de Toulouse UPS, Bât. IVR3, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 09, France

⁴Depto. de Conservación de la Biodiversidad, El Colegio de la Frontera Sur, Avenida Centenario Km. 5.5, AP 424, 77074 Chetumal, Quintana Roo, México

⁵Department of Applied Ecology, Faculty of Biology, Saint Petersburg State University, 16th line of Vasilievsky Island, 29, St. Petersburg 199178, Russia

Received 20 September 2015; revised 25 January 2016; accepted for publication 27 January 2016

Nuclear mitochondrial (mt) paralogues (*numts*) are non-functional fragments of mtDNA integrated into the nuclear genome that can overestimate the number of species in analyses based on mtDNA sequences. As *numts* have relatively slow mutation rates, they can pass undetected by conventional procedures such as inspecting for internal stop codons, indels or apparent polymorphism in chromatograms. Species boundaries based on mtDNA markers therefore require a thorough assessment of *numts*, especially in insects, where this phenomenon appears to be relatively frequent. *Ectatomma ruidum* is a widely distributed Neotropical ant species that is distributed from northern Mexico to northern Brazil. Previous behavioural and molecular evidence suggests that this species actually represents a composite taxon. Here we assessed the species boundaries in *E. ruidum* based on two mt (COI, *cyt b*) and one nuclear (H3) marker, as well as on external morphology. Ancient and recent mt paralogues were detected in several specimens, although pre-PCR dilution of DNA template helped to recover most of the mt orthologues. Based on the congruence found between our species delineation obtained from the mt genealogies and the discriminated morphospecies, we propose that *E. ruidum* is actually composed of at least three species. Two of these species have a wide geographical distribution in the Neotropics, whereas the remaining one was restricted to localities situated near the Pacific coast in south-east Mexico. We also found extensive intra- and interspecific variation in the barcoding locus. Moreover, the nuclear evidence suggests the existence of hybrids between two of these species in Oaxaca, south-east Mexico. This study agrees with previous studies of other closely related animal taxa, which have revealed a complex evolutionary history and overlooked species diversity in the latter region.

© 2016 The Linnean Society of London, *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2016

doi: 10.1111/zoj.12407

ADDITIONAL KEYWORDS: DNA sequences – Formicidae – hybridization – pseudogenes – species delineation.

*Corresponding author. E-mail: azaldivar@ib.unam.mx

INTRODUCTION

Currently, one of the most challenging tasks in systematics is the development of objective, practical approaches to delimit boundaries between species (De Queiroz, 2007). Species descriptions, and therefore their delimitation, are traditionally carried out using only diagnostic morphological features, based on the premise that intra- and interspecific differences can be somewhat distinguishable. This practice, however, is now widely recognized to have serious limitations in recently diverged species with conserved morphology (e.g. Ross *et al.*, 2010; Militão *et al.*, 2014). The use of taxonomic approaches that combine information obtained from different sources of evidence (i.e. integrative taxonomy; Padial *et al.*, 2010; Schlick-Steiner *et al.*, 2010) therefore represents a valuable option for the accurate delineation of species. Assessing different types of data, however, requires additional precautions about the homologous nature of the characters that are being examined.

Mitochondrial (mt) DNA sequences have been by far the most widely employed molecular markers for species delineation analyses mainly due to their matrilineal inheritance and higher coalescence ratio in comparison with nuclear genes (Avice, 2000; Palumbi, Cipriano & Hare, 2001). Various phenomena, however, can obscure the accurate delineation of species using this locus, including incomplete lineage sorting (Funk & Omland, 2003), mt introgression (Bryson *et al.*, 2014) and nuclear mt pseudogenes (*numts*; Song, Moulton & Whiting, 2014).

These *numts* represent non-functional fragments of mtDNA integrated into the nuclear genome (Bensasson *et al.*, 2001). They can be accidentally co-amplified through conventional amplification using conserved primers, and their inclusion can overestimate the number of species in analyses based on mtDNA sequence data (Song *et al.*, 2008). As *numts* have relatively slow mutation rates, they can pass undetected by conventional procedures such as inspecting for internal stop codons, indels or apparent polymorphism in chromatograms (double peaks) (Calvignac *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2014).

Two main types of *numts* have been categorized to occur according to their phylogenetic placement with respect to the orthologue and their branch length, *paleonumts* and *neonumts* (Song *et al.*, 2014). The first are ancient paralogues whose duplication took place before the mtDNA had its current form, and are characterized by having relatively long branch lengths and often being grouped in separate clades that are distantly related to the orthologue. The second are recent duplication events that have not had

time to accumulate enough mutations. These often have short branch lengths and are not placed separately from the mt orthologue, making them extremely difficult to detect in phylogenetic analyses based on single mt sequence fragments.

Ectatomma Smith (Ectatomminae) is one of the most common groups of foraging Neotropical ants, currently comprising 15 recognized species distributed from northern Mexico to central Argentina (Fernández, 1991; Arias-Penna, 2008; Bolton, 2015; D. Dubovikoff, unpubl. data). Two species have by far the widest geographical distribution in the genus, *E. tuberculatum* (Olivier) and *E. ruidum* (Roger), with the latter ranging from Tamaulipas in northern Mexico to northern Brazil (Bolton, 2015; D. Dubovikoff, unpubl. data). *Ectatomma ruidum* is also one of the most studied Neotropical ant species in terms of its behavioural ecology. It is facultatively polygynous (i.e. with colonies having more than one queen) and is known to be a generalist predator, scavenger and collector of extrafloral nectar (Lachaud, 1990; Schatz, Lachaud & Beugnon, 1995, 1996; Lachaud *et al.*, 1999).

Despite their abundance and conspicuousness, the taxonomy of *E. ruidum* has not been thoroughly investigated. This species is morphologically similar to and appears to be sympatric with *E. gibbum* Kugler & Brown, which has a more restricted geographical distribution. Moreover, a species from central Mexico, *E. aztecum* Emery, was distinguished from *E. ruidum* based on body sculpture features and the form of the petiolar node (Emery, 1901), although it was subsequently regarded as a junior synonym of the latter species by Kugler & Brown (1982).

More recently, a molecular phylogenetic study carried out for 12 of the 15 recognized species of *Ectatomma* found that the members of *E. ruidum* were divided into two sister clades that shared the same wide distribution and were separated by relatively long branch lengths (Nettel-Hernanz *et al.*, 2015). One of these clades contained specimens from the only two populations recorded as having colonies with microgynous queens (i.e. an isometric reduction of the normal macrogynous queens; Lachaud *et al.*, 1999), whereas the other one had specimens from localities without records of microgyny. This biological and molecular evidence thus suggests that *E. ruidum* actually represents a taxon composed of more than one evolutionary lineage (i.e. species).

Here we assessed the number of speciation events that occurred within *E. ruidum* based on specimens collected from several localities along its known geographical distribution. For this, we have followed an integrative taxonomic approach and examined two

mt markers and one nuclear marker, as well as external morphological features. Our preliminary mt gene genealogies revealed an incorrect phylogenetic placement for a number of the examined sequences. We therefore investigated the presence of *numts* in the mt data sets using different approaches. Based on the congruence found between the species delimitation analyses carried out with our putative mt orthologues and on the consistent morphological differences found, we propose that *E. ruidum* actually represents a complex composed of at least three evolutionary units, two of which have a wide geographical distribution within the Neotropics. The evidence obtained from the nuclear marker also suggests the existence of a hybrid zone between two of the proposed species in the Pacific coast of Oaxaca, south-east Mexico.

MATERIALS AND METHODS

TAXON SAMPLING

We examined newly generated and previously published sequences (Smith, Hallwachs & Janzen, 2014; BOLD systems, www.boldsystems.org) for a total of

133 specimens originally assigned to *E. ruidum* and *E. gibbum* according to the two available keys to species of *Ectatomma* (Kugler & Brown, 1982; Arias-Penna, 2008). The taxon sampling included specimens collected from 38 geographically separated populations in the Neotropics (Fig. 1), with an emphasis on south-east Mexico, where preliminary observations carried out by the authors revealed considerable external morphological differences between the sampled populations.

We also included newly generated and published sequences (Moreau *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2014) of 33 specimens belonging to *E. brunneum* Smith, *E. edentatum* Roger, *E. opaciventre* (Roger) and *E. tuberculatum*, as well as sequences of two other ectatommine genera, *Typhlomyrmex rogenhoferi* Mayr and *Rhytidoponera metallica* (Smith). We used sequences of *R. metallica* and of *E. tuberculatum* to root the COI and *cyt b* trees, respectively. A list with the included specimens, their species assignment after this study, localities and GenBank accession numbers for the three markers examined is provided in Table S1.

All specimens were preserved in 95% ethanol and kept at -20°C until they were processed for DNA

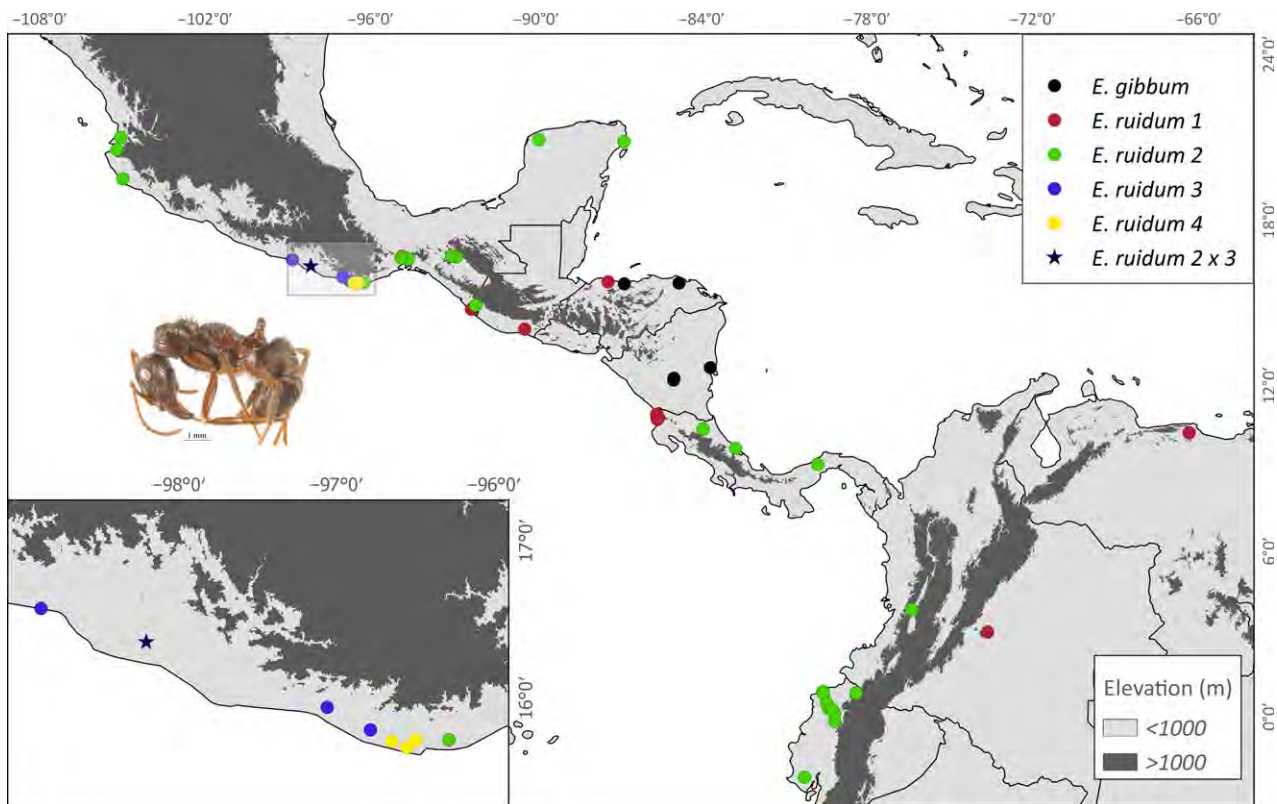


Figure 1. Map showing the sampled localities for the specimens assigned to *Ectatomma ruidum* and *Ectatomma gibbum*. The taxon names refer to the delimited morphospecies.

sequencing. The examined material is deposited in the Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM), the National Museum of Natural History, Paris, France (MNHN), and the Zoological Institute RAS, St. Petersburg, Russia (ZISP).

LABORATORY PROTOCOLS

DNA sequences of two mt and one nuclear gene fragments were examined. We first sequenced a 632-bp fragment of the cytochrome oxidase I (COI) mtDNA gene, which corresponds to most of the barcoding locus (Hebert *et al.*, 2003). We also amplified a 792-bp fragment corresponding to part of the cytochrome *b* (*cyt b*) and the tRNA^{ser} mtDNA genes, and 260 bp of the histone H3 protein (H3) encoding nuclear gene for a subset of 62 and 41 specimens, respectively. COI and *cyt b* are the most widely employed mt markers for analyses of closely related taxa, as well as for phylogeographical and population genetic studies in animals, including insects (Simon *et al.*, 1994; Simmons & Weller, 2001; Lin & Danforth, 2004). We also generated 32 sequences corresponding to a 748-bp fragment of the second and third domain regions of the 28S ribosomal DNA gene (GenBank accession numbers KU570706–37). These sequences, however, did not show variation among the sequenced specimens and therefore they were not considered for the study.

Genomic DNA in most cases was extracted from one to three legs of each specimen using the E-Z10 Spin Colum Genomic DNA Minipreps kit (Bio Basic, Amherst, NY, USA) following the manufacturer's protocol. Some of the DNA extractions were carried out by placing the dried samples in 50 μL of 5% (w/v) Chelex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), which contained 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of proteinase K, followed by digestion for approximately 2 h at 55–60 °C and finally inactivating proteinase K at 96 °C for 15 min. PCRs were performed in 15 μL of total volume reactions containing 1.25 μL of 10 \times PCR buffer, 0.5 μL of MgCl_2 , 0.2 mM of each dNTP, 0.2 μM of each primer, 0.125 μL of platinum Taq polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA), 3 μL of DNA template and 9.475 μL of ddH₂O. Amplifications were carried out using the following primers: LCO (5'-GGTCAA-CAAATCATAAA GATATTGG-3') and HCO (5'-TAAACTTCAGGGTGA CCAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994) for COI; CB1 (5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3') and tRS (5'-TATTTCTTTATTATGTTTTCAAAC-3') (Jermiin & Crozier, 1994) for *cyt b*; and H3F (5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3') and H3R (5'-ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC-3') (Colgan *et al.*, 1998) for H3.

PCR cycling conditions were as follows. COI: one step of 3 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 94 °C for 40 s, 50 °C for 1 min and 72 °C for 40 s, and a final step at 72 °C for 7 min. *Cyt b*: one step of 2 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 50 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and a final step at 72 °C for 1 min. H3: one step of 1 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 45.5 °C and 1 min 30 s at 72 °C, and a final step of 10 min at 72 °C.

Unpurified PCR products were sent for sequencing at the University of Washington's High-Throughput Genomics Unit (<http://www.htseq.org>). Sequences were edited with Sequencher version 4.1.4 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA) and aligned manually based on their translated amino acids using Mesquite version 2.75 (Maddison & Maddison, 2009). The fragment belonging to the tRNA^{ser} gene was excised from the alignment containing the *cyt b* marker due to its considerable sequence length variation.

DETECTION OF NUMTS

Nuclear mt paralogues can be detected based on the presence of codon position substitution bias, distinct rates of evolution, internal stop codons, indels, apparent polymorphism in chromatograms (double peaks) or incongruent phylogenetic placement (Song *et al.*, 2008, 2014; Calvignac *et al.*, 2011). We therefore detected the presence of *numts* in the two mt data sets based on the above six criteria and excluded them from the species delineation analyses. In particular, several sequences, especially of COI, had polymorphisms and/or incongruent relationships after carrying out preliminary phylogenetic analyses. We therefore performed additional COI amplifications, following the pre-PCR dilution procedure described by Calvignac *et al.* (2011) to recover mt othologues in samples that had the latter two cases of paralogy. This procedure has been shown to be the best one employed to amplify mtDNA sequences instead of *numts*, as dilution of the DNA template considerably decreases the nuclear genome and therefore reduces the chance of amplifying nuclear gene fragments in PCRs (Calvignac *et al.*, 2011).

DNA extractions of the selected specimens had between 3 and 4 ng μL^{-1} of genomic DNA using 1 μL of DNA template with a Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Based on this DNA concentration, we amplified the COI marker for 29 *E. ruidum* specimens as described above, employing both 1:10 and 1:30 dilutions of the DNA template.

A partitioned Bayesian analysis was performed with the parameters described below, including both the originally generated COI sequences and those

recovered with the pre-PCR dilution procedure. Those subsequently generated sequences that had alternative relationships involving geographically and morphologically congruent clades were regarded as orthologues. We followed Calvignac *et al.*'s (2011) criterion and refer to all our proposed mtDNA sequences with the prefix 'putative', as we cannot guarantee their mt origin. For the *cyt b* data set we did not repeat amplifications with pre-PCR dilutions, although *numts* were also detected and excised from subsequent analyses based on incongruent relationships. Sequences considered in this study as nuclear mt paralogues can be retrieved from GenBank under accession numbers KU570738–62. All the sequences and locality details are also available in the project file 'Species boundaries in the Neotropical ant complex *Ectatomma ruidum*' (ECT project), contained in the projects section of the Barcode of Life Data Systems (www.boldsystems.org). All the matrices analysed in this work can be retrieved from Data S1.

NUCLEAR DNA RECOMBINATION

The presence of recombination in the nuclear H3 gene was assessed using TOPALi version 2.5 (Milne *et al.*, 2009). This program uses a sliding-window approach to search for putative recombination breakpoints along aligned sequences (Milne *et al.*, 2009). We looked for signal of recombination, which is expressed by a significant difference in sum-of-squares (DSS) peak along the sequence alignment (250 bp) using the DSS with a 75- and 100-bp window and a 10-bp step-size. The statistical significance of DSS was assessed using 100 parametric bootstraps. We also visually examined the aligned sequences to try to identify positions with inconsistent phylogenetic signal, which could represent recombination breakpoints. Sequences with evidence of recombination were regarded as potential hybrids and were excluded from the species delineation analyses.

SPECIES DELINEATION BASED ON MTDNA SEQUENCE DATA

It has been shown that various groups of ants have complex population genetic processes that promote the presence of marked geographical genetic structure (Wild, 2009; Ross *et al.*, 2010). Species delineation approaches that are not sensitive to intrinsic properties of mtDNA polymorphism, such as overlap in inter- and intraspecific divergences and non-monophyly of species, can thus lead to overestimation of the number of species within Formicidae. Among these are the DNA barcoding approach (Hebert *et al.*, 2003) and the General mixed Yule-coalescent model (Pons *et al.*, 2006), which have been shown to be highly susceptible

to the presence of high levels of mt genetic structure (Wild, 2009; Talavera, Dincă & Vila, 2013).

Species delineation based on the mt markers was therefore assessed using Wiens & Penkrot's (2002) approach based on DNA haplotype phylogenies. In this approach, the discordance between haplotype clades and the geographical provenance of their individuals is assumed to represent evidence of gene flow among the examined populations (Wiens & Penkrot, 2002). Therefore, the number of potential species can be assessed by the presence of lineages that are concordant with geography.

Bayesian phylogenetic analyses were carried out with MrBayes version 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) for each mt marker and for a concatenated COI + *cyt b* matrix that included only specimens with sequences generated for both genes. Two different matrices were employed for the separate analyses of each mt marker. The first one included all their generated sequences, whereas the second one excised all sequences regarded as *numts*, as well as specimens with evidence of recombination based on the nuclear marker. Each analysis consisted of two simultaneous runs of 20 million generations each, using four chains and saving trees every 1000 generations. Three partitions were considered for each marker according to their codon positions. The most appropriate models of evolution for each partition were obtained with jModeltest version 2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012) (COI: 1st = GTR + G; 2nd = GTR + G; 3rd = GTR + G; *cyt b*: 1st = GTR + I; 2nd = GTR + G; 3rd = GTR + I). Burn-in was determined based on convergence of the two simultaneous runs measuring the values of the average standard deviation of split frequencies. A value <0.01 was considered as convergence of the two simultaneous runs. We discarded the trees sampled during the first 10 million generations in all analyses, and the remaining sampled trees were employed to reconstruct a phylogram, considering clades as significantly supported when they had a posterior probability (PP) ≥ 0.95 .

We also calculated corrected pairwise genetic distances for COI using the Kimura two-parameter distance model (Kimura, 1980) with the program MEGA version 6 (Tamura *et al.*, 2013) to compare the results obtained between the above approach and the 2% corrected pairwise distance criterion that is widely employed for this marker in animals (Hebert *et al.*, 2003).

MORPHOSPECIES DELIMITATION AND INTEGRATIVE TAXONOMY

Morphospecies were discriminated based on nine external morphological characters examined from a vast number of worker specimens belonging to all

the populations sampled for the molecular analyses. Most of these features have been employed in previous taxonomic studies to distinguish species in *Ectatomma* (Kugler & Brown, 1982). A list describing the morphological features examined, as well as their observed variation among the morphospecies discriminated, is shown in Table 1.

Digital photographs were taken for representative specimens of each of the discriminated morphospecies with a Leica IC 3D digital camera mounted on a Leica MZ16 microscope and using the Leica Application Suite imaging system. All the examined specimens are deposited in the Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (IB UNAM).

We followed an integrative taxonomic approach by congruence (*sensu* Padial *et al.*, 2010), and recognized as evolutionary species (*sensu* Wiley, 1978; De Queiroz, 2007) those taxa delimited by the DNA sequence-based species delineation analysis that also had consistent external morphological differences.

RESULTS

DETECTION OF NUMTS

The initial COI, *cyt b* and H3 data sets consisted of 148, 66 and 41 sequences, respectively. A total of 36 sequences were subsequently added to the COI data set from the amplifications obtained with the pre-PCR dilution procedure, increasing its number to 184. Details of the gene fragments examined are listed in Table S2.

The Bayesian phylograms derived from the separate analyses of the COI and *cyt b* data sets with all the examined sequences are shown in Fig. S1. The COI phylogram recovered most of the specimens originally assigned to *E. ruidum* within a major, significantly supported clade with strong morphological and geographical structure. A total of 19 sequences were regarded as *numts* according to their incorrect phylogenetic placement and/or presence of polymorphism. Thirteen of these sequences were considered as *paleonumts* as they were grouped outside the major *E. ruidum* clade and belonged to specimens coming from distinct localities in Oaxaca and Costa Rica. The remaining six sequences (five *E. ruidum* and one *E. gibbum*), on the other hand, were regarded as *neonumts* due to the fact that they were nested within geographically and morphologically congruent clusters but were polymorphic. The pre-PCR dilution procedure generated four alternative sequences that were regarded as putative orthologues for specimens whose original sequences had incongruent relationships or polymorphism in their

chromatograms, and also supported the orthologue nature of 21 original sequences.

The *cyt b* data set contained ten probable *numts*. One of them is a *paleonumt* represented by a specimen from Oaxaca with an incorrect phylogenetic placement. The remaining nine are *neonumts*, five of which belong to specimens from Jalisco that lack the stop codon flanking the tRNA^{ser} gene, and four to specimens from Chiapas, Oaxaca and Costa Rica.

NUCLEAR DNA RECOMBINATION

The alignment of the 41 H3 sequences had nine phylogenetically variable sites (3.5%). Sequences of three specimens from Pinotepa Nacional in Oaxaca, Mexico (DNA voucher nos. CNIN1993–95), have one of the two exclusive nucleotide substitutions that characterize two of the delimited morphospecies (*E. sp. 'ruidum 3'* and *E. sp. 'ruidum 4'*; see below), although in the other position they instead have the state that is present in *E. sp. 'ruidum 1'* and *E. sp. 'ruidum 2'*. The DSS analyses revealed significant signal of recombination in the latter three samples using the 75-bp window and a 10-bp step-size, although they had a non-significant signal using the 100-bp window. Based on this result, the latter specimens were regarded as potential hybrids and thus were excluded from the subsequent species delineation analyses.

DNA SEQUENCE-BASED SPECIES DELINEATION ANALYSES

The Bayesian phylograms derived from the separate COI and *cyt b* and the concatenated data sets excluding all potential *numts* and hybrids are shown in Fig. 2, S2, and Fig. 3, respectively. *Ectatomma gibbum* appears significantly supported in the three topologies as sister to the clade containing all specimens assigned to *E. ruidum*. Use of Wiens & Penrot's (2002) approach in the two mt and the concatenated analyses consistently delimited two significantly supported lineages within the main *E. ruidum* clade. Both lineages contain specimens collected in localities occurring from Mexico to northern South America, appearing as sister taxa in the *cyt b* (PP = 0.95) and the concatenated (PP = 0.93) analyses, but not in the one performed with COI. The concatenated phylogram also recovered two significantly supported clades represented by the two morphospecies that appear restricted to localities near the Pacific coast in south-east Mexico (*E. sp. 'ruidum 3'* and *E. sp. 'ruidum 4'*). However, members of these two morphospecies appeared intermingled as a grade in the COI and the *cyt b* phylograms.

Table 1. List of the nine external morphological features examined, their states and the morphospecies delimited for specimens originally assigned to *Ectatomma ruidum*; morphospecies assignments for the specimens examined in this study are given in Table S1.

Species assignment	Space between eye and frontal carina	Clypeus	Posterior outline of head	Pronotal hump	Lateral pronotal teeth
<i>E. gibbum</i>	With oblique rugae	With oblique rugae	Strongly arched	High, rounded, considerably higher than lateral teeth	Reduced, rectangular
<i>E. sp. 'ruidum 1'</i>	8 or fewer longitudinal striae; space between striae rugulose	With few irregular, longitudinal striae	Straight	Low, moderately acute, slightly higher than lateral teeth	Prominent, pointed
<i>E. sp. 'ruidum 2'</i>	8 or fewer longitudinal striae; space between striae slightly rugulose	With few irregular, longitudinal striae	Straight	Low, strongly acute, distinctly higher than lateral teeth	Prominent, pointed
<i>E. sp. 'ruidum 3'</i>	10–16 longitudinal striae running from base of antennae to top level of eye	With well-defined longitudinal striae	Straight	Low, rounded, same level as lateral teeth	Reduced, rectangular
<i>E. sp. 'ruidum 4'</i>	10–16 longitudinal striae running from base of antennae to top level of eye	With well-defined longitudinal striae	Straight	Low, rounded, same level as lateral teeth	Reduced, rectangular
<i>E. sp. 'ruidum 2'</i> × <i>E. sp. 'ruidum 3'</i>	10–16 longitudinal striae running from base of antennae to top level of eye; space between striae slightly rugulose	With well-defined longitudinal striae	Straight	Low, rounded, slightly higher than lateral teeth	Reduced, rectangular
Species assignment	Propodeal teeth	Propodeum	Petiolar node		
<i>E. gibbum</i>	Reduced, blunt	With poorly defined transverse striae surrounded by strong oblique rugae	Low, wide, strongly arched anteriorly, straight posteriorly		
<i>E. sp. 'ruidum 1'</i>	Distinct, sharp	With transverse striae, oblique rugae anteriorly and/or medially	High, narrow, medially constrained, subparallel dorsally		
<i>E. sp. 'ruidum 2'</i>	Distinct/reduced, sharp	With transverse striae, oblique rugae anteriorly and/or medially	Moderately high, narrow, slightly arched anteriorly, almost straight posteriorly		
<i>E. sp. 'ruidum 3'</i>	Distinct/reduced, sharp	With well-defined transverse striae	Low, wide, distinctly arched anteriorly, straight posteriorly		
<i>E. sp. 'ruidum 4'</i>	Absent/reduced, sharp	With well-defined transverse striae	High, moderately wide, straight, slightly arched anteriorly		
<i>E. sp. 'ruidum 2'</i> × <i>E. sp. 'ruidum 3'</i>	Reduced, sharp	With transverse, irregular striae	Low, wide, distinctly arched anteriorly, straight posteriorly		

Species assignment	Sculpture of first gastric tergum
<i>E. gibbum</i>	With arched, rugulose 'fingerprint'-like costulae basally, running to apical end laterally; medial area punctate, with fine, broken costulae
<i>E. sp. 'ruidum 1'</i>	With arched, rugulose 'fingerprint'-like costulae running from basal to apical end of tergum
<i>E. sp. 'ruidum 2'</i>	With arched, rugulose 'fingerprint'-like costulae running from basal to apical end of tergum
<i>E. sp. 'ruidum 3'</i>	With arched, well defined 'fingerprint'-like costulae running from basal to apical end of tergum
<i>E. sp. 'ruidum 4'</i>	With arched, well defined 'fingerprint'-like costulae running from basal to apical end of tergum
<i>E. sp. 'ruidum 2'</i> × <i>E. sp. 'ruidum 3'</i>	With arched, slightly rugulose 'fingerprint'-like costulae running from basal to apical end of tergum

The corrected genetic distances for the COI data set excluding all probable *numts* and hybrids among and within the four taxa delimited by both the morphological evidence (see below) and the concatenated analysis are shown in Table S3. The four taxa show considerably high intra- and inter-lineage COI distances (0–9.5 and 3.4–12.2%, respectively), with the highest levels of intra-lineage distance occurring in the two taxa restricted to south-east Mexico (up to 5.6 and 9.5% in *E. sp. 'ruidum 3'* and *E. sp. 'ruidum 4'*, respectively).

MORPHOLOGICAL DATA

A list with the morphospecies assignments for the specimens examined in this study is given in Table S1. Digital photographs showing some of the morphological features that characterize the delimited morphospecies are shown in Figs 4 and S3. The nine external morphological features examined helped to discriminate four morphospecies that are concordant with the four species delimited by the *cyt b* and the concatenated species delineation analyses.

The two species with wide distributions recovered by the above species delineation approach, *E. sp. 'ruidum 1'* and *E. sp. 'ruidum 2'*, can be morphologically distinguished from each other by the form of the pronotal hump and the petiolar node (Table 1; Figs 4B, C; S3 and S4). These two morphospecies also differ from the other two by five consistent additional features. On the other hand, the two morphospecies restricted to south-east Mexico, *E. sp. 'ruidum 3'* and *E. sp. 'ruidum 4'*, differ from each other by two morphological differences: the form of the petiolar node and presence/absence of pronotal teeth. However, for the latter character, the state that distinguishes *E. sp. 'ruidum 4'* (pronotal teeth absent) is not fixed. Our morphological examination also supports a hybrid origin for the specimens from Pinotepa Nacional, Oaxaca, which share features of both *E. sp. 'ruidum 2'* and *E. sp. 'ruidum 3'* (Figs 4F and S3).

DISCUSSION

DETECTION OF *NUMTS* IN SPECIES DELIMITATION ANALYSES

Here we have shown that the use of universal primers for the two most widely used mt gene markers, COI and *cyt b*, could lead in some cases to preferential amplification of *numts* in the ant genus *Ectatomma*. Our results also agree with those of a previous study that supports the use of the pre-PCR dilution procedure as a valuable tool to increase the preferential amplification of mt orthologues (Calvignac *et al.*, 2011).

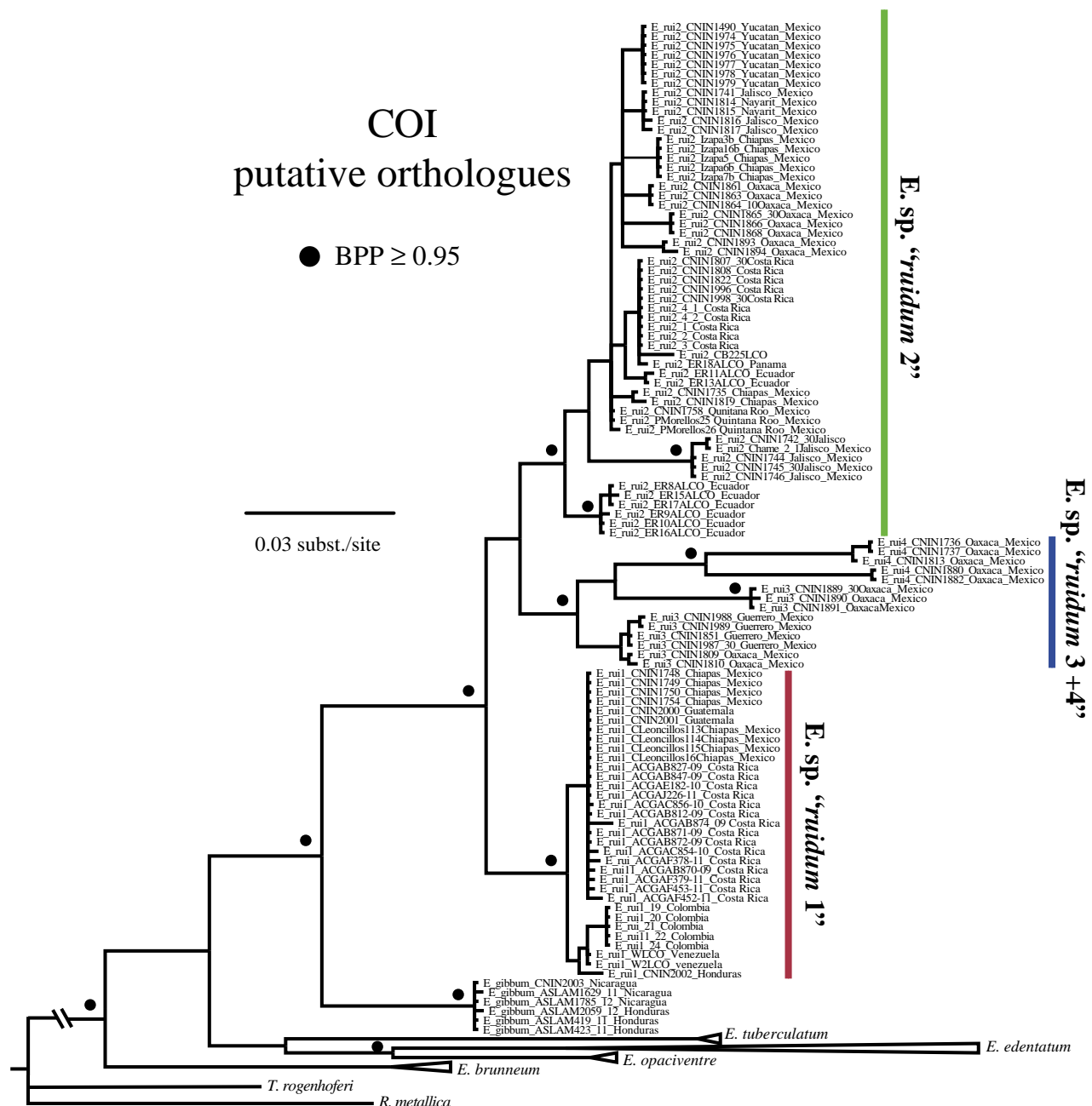


Figure 2. Phylogram derived from the Bayesian analysis performed with the COI marker excluding all potential *numts* and hybrids. Black circles near branches are Bayesian posterior probabilities ≥ 0.95 . Colour lines refer to the main lineages recovered. Taxon names refer to the delimited morphospecies.

Most of the nuclear mt paralogues detected in this study appear to represent *paleonumts*, as they were nested in a clade at the base of the main *E. ruidum* clade, suggesting that they originated before speciation events occurred in this species complex. In contrast, only a few mt paralogues seem to be *neonumts* based on their small number of substitutions. These *neonumts* were detected by

the presence of internal stop codons and/or polymorphism in chromatograms. We recognize that additional *neonumts* could have passed undetected by our established criteria. However, as they usually accumulate few mutations, they are often nested together with the orthologue (Song *et al.*, 2014), and thus do not have a strong impact in species delineation analyses.

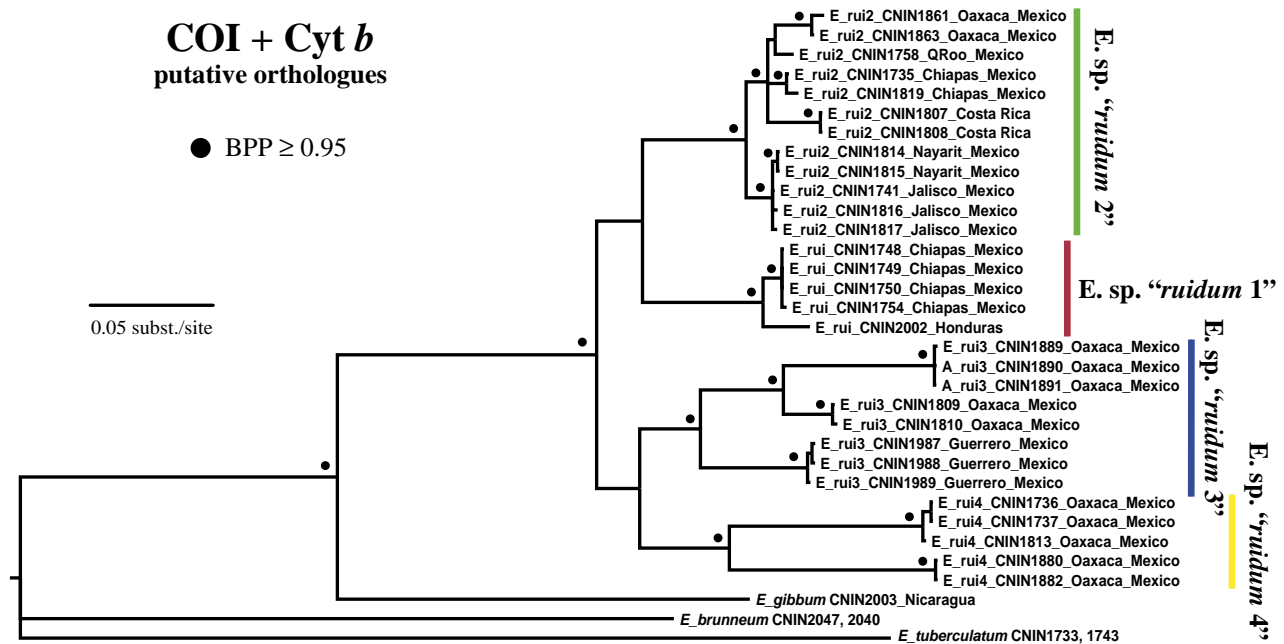


Figure 3. Phylogram derived from the Bayesian concatenated (COI + *cyt b*) analysis excluding all potential *numts* and hybrids. Black circles near branches are Bayesian posterior probabilities ≥ 0.95 . Coloured lines refer to the main lineages recovered. Taxon names refer to the delimited morphospecies.

The presence of *numts* has been reported to occur in various insect orders (Leite, 2012). In Hymenoptera, they occur in members of Cynipidae (Rokas *et al.*, 2003), Apidae (Pamilo, Viljakainen & Vihavainen, 2007) and Colletidae (Magnacca & Brown, 2010), and in Formicidae they have been recorded for species of *Dorylus* (Kronauer *et al.*, 2007) and in members of the Attini genera *Atta* and *Acromyrmex* (Martins *et al.*, 2007; Cristiano, Cardoso & Fernandes-Salomão, 2014). Here, we propose the existence of *numts* within the *E. ruidum* complex not only among our generated sequences, but also among others previously published (Smith *et al.*, 2014). Our results thus highlight the use of rigorous, objective approaches that help to detect the presence of *numts* in order to avoid overestimation in the number of independent evolutionary lineages recovered in species delimitation analyses.

NUCLEAR RECOMBINATION

Our morphological and nuclear DNA recombination evidence suggests the existence of a hybrid zone between two of our delineated species, *E. sp. 'ruidum 2'* and *E. sp. 'ruidum 3'*, in a locality situated near the Pacific coast of Oaxaca in south-east Mexico. Nuclear DNA recombination due to hybridization could represent a potential problem for DNA sequences, as traditional phylogenetic methods assume that a single evolutionary history underlies

the data (Ibrahim, Cooper & Hewitt, 2002; Posada & Crandall, 2002). In particular, phylogenetic biases are likely to take place when there is recent recombination among divergent taxa, and the recombinational breakpoint divides the alignment into two regions of similar length (Posada & Crandall, 2002).

In this work, the examined nuclear marker did not provide enough phylogenetic signal for estimating interspecific relationships within the *E. sp. ruidum* complex. Its observed variation, however, suggests the existence of H3 sequences composed of regions belonging to both *E. sp. 'ruidum 2'* and *E. sp. 'ruidum 3'*. This, to our knowledge, represents the first report of putative recombination of this protein-coding gene in insects.

INTEGRATIVE TAXONOMY

Integrative taxonomy has proved to be a powerful approach for a robust delineation of species, especially in morphologically conserved groups. This criterion has been particularly useful in discriminating overlooked species diversity in ants (Schlick-Steiner *et al.*, 2006; Seifert, 2009; Ferreira *et al.*, 2010). The congruence between our species delineation analysis based both on mtDNA sequence data and morphological evidence supports the existence of at least three independent evolutionary lineages (i.e. species) within the *E. ruidum* complex. Two of these species are represented by

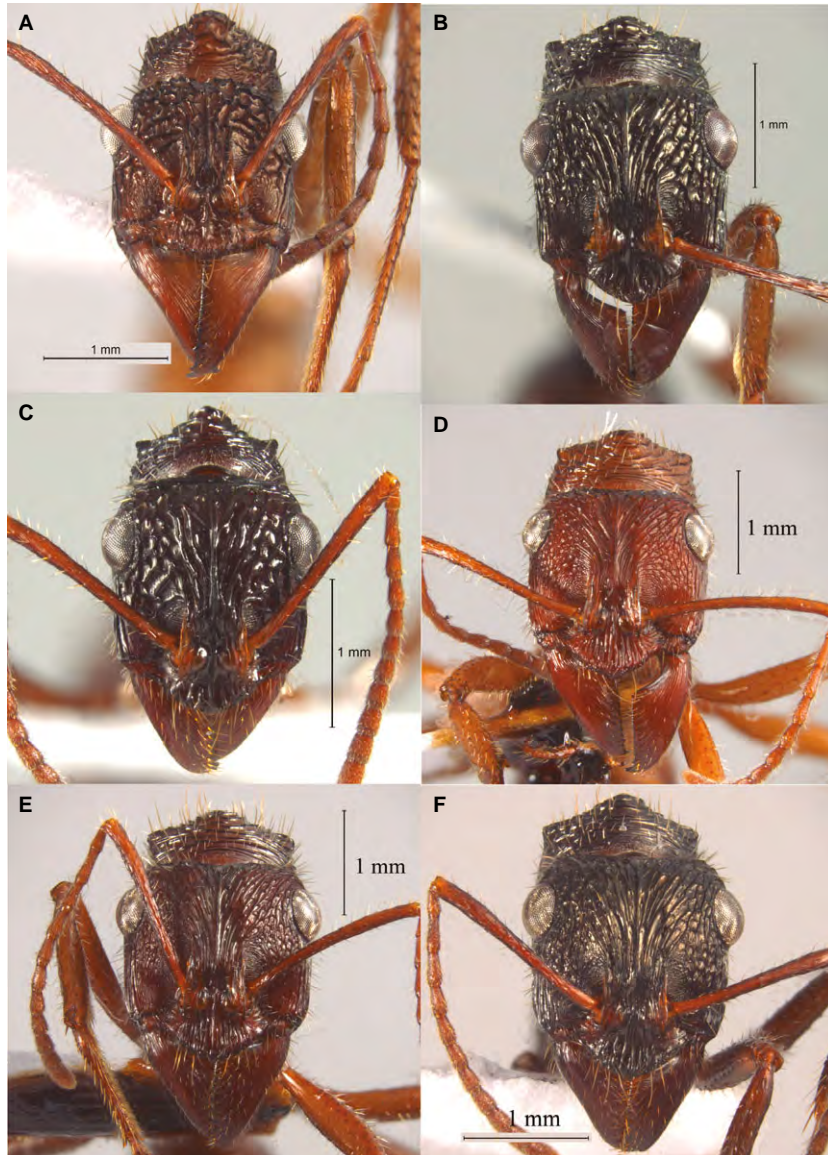


Figure 4. Digital photographs showing the head (full face) and pronotal hump of representative specimens belonging to the four delimited morphospecies originally assigned to *Ectatomma ruidum*: A, *E. gibbum*; B, *E. sp. 'ruidum 1'*; C, *E. sp. 'ruidum 2'*; D, *E. sp. 'ruidum 3'*; E, *E. sp. 'ruidum 4'*; F, *E. sp. 'ruidum 2 × sp. ruidum 3'*.

morphospecies *E. sp. 'ruidum 1'* and *E. sp. 'ruidum 2'*, whereas the third one is provisionally composed of *E. sp. 'ruidum 3 + 4'*, although further biological, morphological and molecular studies are needed to determine whether the latter two morphospecies do or do not represent valid species.

The delimited species *E. sp. 'ruidum 1'* and *E. sp. 'ruidum 2'* share a similar, wide geographical distribution in the Neotropics. Their allospecificity was significantly supported by the separate and concatenated mt analyses, and also was confirmed by the presence of exclusive external morphological features of workers. Roger (1860) described *E. ruidum*

based on syntypes from Colombia, Brazil and French Guiana. However, more recently Kugler & Brown (1982) restricted its type locality to Colombia because the syntypes from this country 'would agree with the present concept of *E. ruidum*'. According to the scanning electron micrographs included in the latter study, our proposed diagnostic morphological features for the species assigned to *E. sp. 'ruidum 1'* agree with those of *E. ruidum*. Moreover, *E. sp. 'ruidum 1'* corresponds morphologically to the original description of *E. ruidum* (Roger, 1860) and to the photographs of their syntypes provided in the Antweb website (Bolton, 2015). *Ectatomma sp.*

'*ruidum 2*' thus represents an undescribed species, which will be described elsewhere.

Based on the specimens examined in this study and additional material deposited at IB UNAM, *E. sp. 'ruidum 1'* occurs at least from south-eastern Mexico on the border between Chiapas and Guatemala, to northern and north-eastern South America (central Colombia, Venezuela and French Guiana) to the south. On the other hand, our confirmed records of *E. sp. 'ruidum 2'* indicate that this species extends from Tamaulipas and Nayarit on the Atlantic and Pacific coasts of Mexico, respectively, to south-western Ecuador. Examination of reported populations assigned to *E. ruidum* from northern Brazil (Bolton, 2015) are needed to determine which of the two proposed species extends its southern distribution to this country.

We decided to maintain the morphospecies *E. sp. 'ruidum 3'* and *E. sp. 'ruidum 4'* as a single evolutionary lineage because the haplotype genealogies failed to consistently recover them as reciprocally monophyletic. Our records of this proposed species are restricted to a few localities situated along the south-eastern Pacific coast of Mexico in Oaxaca and Guerrero, not far from the state of Michoacan, the type locality of one of the current synonyms of *E. ruidum*, *E. aztecum* (Emery, 1901). Our examination of the syntype of *E. aztecum* showed that it is quite similar to the specimens assigned to this third species based on body sculpture and the form of the petiolar node. Further integrative biological, molecular and morphological studies are therefore needed to clarify whether morphospecies *E. sp. 'ruidum 3'* and *E. sp. 'ruidum 4'* actually represent separate species, and whether both or one of them can be assigned to *E. aztecum*. The presence of overlooked diversity and potential hybrids in this group agrees with previous studies of other animal taxa, which have revealed a complex evolutionary history and overlooked species diversity along the Mexican Pacific coast, and in particular near the Isthmus of Tehuantepec in Oaxaca (e.g. Zarza, Reynoso & Emerson, 2008; Pedraza-Lara *et al.*, 2015).

PRESENCE OF MICROGYNY

The two proposed species that share a wide geographical distribution in the Neotropics appear to differ from each other by the presence/absence of microgyny. All populations of *E. sp. 'ruidum 1'* inspected for the presence/absence of microgyny lack it. These include populations situated in south-eastern Mexico, Costa Rica, Venezuela, French Guiana and eastern Colombia (Breed *et al.*, 1990, 1992, 1999; Guénard & McGlynn, 2013; J.-P. Lachaud, unpubl. data). In contrast, gynecoid workers and

microgynes have been reported for populations assigned to *E. ruidum sp. 'ruidum 2'* from south-east Mexico, the Yucatan peninsula and western Colombia (Fernández, 1991; Lachaud *et al.*, 1999; Nettel-Hernanz *et al.*, 2015; F. C. Prada, pers. comm.).

The above two species are known to be sympatric only in a region situated on the coastal plain near the border between Chiapas in Mexico and Guatemala. Previous studies have revealed that both species have similar life traits in this region, including feigning of death when workers are disturbed (Cupul-Magaña, 2009) and presence of the same parasitoid eucharitid wasp species (Pérez-Lachaud *et al.*, 2006; Lachaud & Pérez-Lachaud, 2015). However, ongoing research supports that, in addition to the presence/absence of microgyny, the two species can also be discriminated from each other by other biological traits, such as date of sexuals production (J.-P. Lachaud, unpubl. data), and chemical compounds in hydrocarbon profiles (Gallegos-Aguirre, 1998; C. Poteaux, unpubl. data). Thus, we expect that the integration of novel biological, morphological and molecular data, as well as historical museum material, can help to provide a robust, conclusive delineation and description of species in this group.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank P. Hanson, J. Longino, F. Fernández, D. Donoso, M. Vázquez-Bolaños and J. Ponce-Saavedra for the loan/donation of specimens; F. C. Prada and the 'ants lab' team in Cali, Colombia, for their help in the field; C. Mayorga and G. Ortega for helping with the curation of specimens; A. Jiménez and L. Márquez for their help in the laboratory; and S. Guzman for taking the digital photographs. This study was supported by grants given by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: convocatoria SEP-Ciencia Básica 2014, proyecto no. 220454; Red Temática del Código de Barras de la Vida; convocatoria fortalecimiento de infraestructura 2014, proyecto no. 224743) to A.Z.R., and by a grant given by the Ecos-Nord-CONACyT Program (proyecto no. M12A01) to A.Z.R. and C.P. This study is part of the MSc thesis of R.G.A.V., who received an MSc scholarship given by CONACyT. R.G.A.V. also thanks the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, for its support during her studies.

REFERENCES

- Arias-Penna TM. 2008.** Subfamilia Ectatomminae. In: Jiménez E, Fernández F, Arias TM, Lozano-Zambrano FH, eds. *Sistemática, biogeografía y conservación de las hormigas cazadoras de Colombia*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 53–107.

- Avise JC. 2000.** *Phylogeography. The history and formation of species.* Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Bensasson D, Zhang DX, Hartl DL, Hewitt GM. 2001.** Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 314–321.
- Bolton B 2015.** AntWeb. Available from: <https://www.antweb.org/description.do?rank=species&genus=Ectatomma&name=ruidum&project=>. Accessed 5 September 2015.
- Breed MD, Abel P, Bleuze TJ, Denton SE. 1990.** Thievery, home ranges, and nestmate recognition in *Ectatomma ruidum*. *Oecologia* **84**: 117–121.
- Breed MD, Snyder LE, Lynn TL, Morhart JA. 1992.** Acquired chemical camouflage in a tropical ant. *Animal Behaviour* **44**: 519–523.
- Breed MD, McGlynn TP, Stocker EM, Klein AN. 1999.** Thief workers and variation in nestmate recognition behavior in a ponerine ant, *Ectatomma ruidum*. *Insectes Sociaux* **46**: 327–331.
- Bryson RW Jr, Smith BT, Nieto-Montes de Oca A, García-Vázquez UO, Riddle BR. 2014.** The role of mitochondrial introgression in illuminating the evolutionary history of Nearctic treefrogs. *Zoological Journal of the Linnean Society* **172**: 103–116.
- Calvignac S, Konecny L, Malard F, Douady CJ. 2011.** Preventing the pollution of mitochondrial datasets with nuclear mitochondrial paralogues (numts). *Mitochondrion* **11**: 246–254.
- Colgan DJ, McLauchlan A, Wilson GDF, Livingston SP, Edgecombe GD, Macaranas J, Cassis G, Gray MR. 1998.** Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology* **46**: 419–437.
- Cristiano MP, Cardoso DC, Fernandes-Salomão TM. 2014.** Could pseudogenes be widespread in ants? Evidence of numts in the leafcutter and *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863) (Formicidae: Attini). *Comptes Rendus Biologies* **337**: 78–85.
- Cupul-Magaña FG. 2009.** Primera observación del comportamiento defensivo por muerte simulada de la hormiga *Ectatomma ruidum* (Roger, 1861) (Formicidae: Ponerinae). *Acta Zoológica Mexicana* **25**: 199–201.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**: 772.
- De Queiroz K. 2007.** Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* **56**: 879–886.
- Emery C. 1901.** Notes sur les sous-familles des Dorylines et Ponérines (Famille des Formicides). *Annales de la Société Entomologique de Belgique* **45**: 32–54.
- Fernández F. 1991.** Las hormigas cazadoras del género *Ectatomma* (Formicidae: Ponerinae) en Colombia. *Caldasia* **16**: 551–564.
- Ferreira RS, Poteaux C, Delabie JHC, Fresneau D, Rybak F. 2010.** Stridulations reveal cryptic speciation in Neotropical sympatric ants. *PLoS ONE* **5**: e15363.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**: 294–299.
- Funk DJ, Omland KE. 2003.** Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **34**: 397–423.
- Gallegos-Aguirre B. 1998.** *Identificación del congénere en la hormiga Ectatomma ruidum (Hymenoptera, Ponerinae): análisis de los hidrocarburos cuticulares.* Tesis de Licenciatura en Química-Farmacobiología. Tapachula: Universidad Autónoma de Chiapas y Escuela de Ciencias Químicas.
- Guénard B, McGlynn TP. 2013.** Intraspecific thievery in the ant *Ectatomma ruidum* is mediated by food availability. *Biotropica* **45**: 497–502.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences* **270**: 313–321.
- Ibrahim KM, Cooper SJB, Hewitt GM. 2002.** Testing for recombination in a short nuclear DNA sequence of the European meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* **11**: 583–590.
- Jermiin LS, Crozier RH. 1994.** The cytochrome *b* region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution* **38**: 282–294.
- Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111–120.
- Kronauer DJC, Schöning C, Vilhelmsen LB, Boomsma JJ. 2007.** A molecular phylogeny of *Dorylus* army ants provides evidence for multiple evolutionary transitions in foraging niche. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 56.
- Kugler C, Brown WL Jr. 1982.** Revisionary & other studies on the ant genus *Ectatomma*, including the descriptions of two new species. *Search. Agriculture* **24**: 1–8.
- Lachaud J-P. 1990.** Foraging activity and diet in some Neotropical ponerine ants I. *Ectatomma ruidum* Roger (Hymenoptera Formicidae). *Folia Entomológica Mexicana* **78**: 241–256.
- Lachaud J-P, Pérez-Lachaud G. 2015.** Ectaheteromorph ants also host highly diverse parasitic communities: a review of the parasitoids of the Neotropical genus *Ectatomma*. *Insectes Sociaux* **62**: 121–132.
- Lachaud J-P, Cadena A, Schatz B, Pérez-Lachaud G, Ibarra-Núñez G. 1999.** Queen dimorphism and reproductive capacity in the ponerine ant, *Ectatomma ruidum* Roger. *Oecologia* **120**: 515–523.
- Leite LAR. 2012.** Mitochondrial pseudogenes in insect DNA barcoding: differing points of view on the same issue. *Biota Neotropica* **12**: 301–308.
- Lin CP, Danforth BN. 2004.** How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**: 686–702.

- Maddison WP, Maddison DR. 2009.** Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.7. <http://mesquiteproject.org>.
- Magnacca KN, Brown MJF. 2010.** Mitochondrial heteroplasmy and DNA barcoding in Hawaiian *Hylaeus* (*Nesoprotopis*) bees (Hymenoptera: Colletidae). *BMC Evolutionary Biology* **10**: 174.
- Martins J Jr, Solomon SE, Mikheyev AS, Mueller UG, Ortiz A, Bacci M Jr. 2007.** Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). *Insect Molecular Biology* **16**:777–784.
- Militão T, Gómez-Díaz E, Kaliontzopoulou A, González-Solís J. 2014.** Comparing multiple criteria for species identification in two recently diverged seabirds. *PLoS ONE* **9**: e115650.
- Milne I, Lindner D, Bayer M, Husmeier D, McGuire G, Marshall DF, Wright F. 2009.** TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics* **25**: 126–127.
- Moreau CS, Bell CD, Vila R, Archibald SB, Pierce NE. 2006.** Phylogeny of the ants: diversification in the age of angiosperms. *Science* **312**: 101–104.
- Nettel-Hernanz A, Lachaud J-P, Fresneau D, López-Muñoz RA, Poteaux C. 2015.** Biogeography, cryptic diversity, and queen dimorphism evolution of the Neotropical ant genus *Ectatomma* Smith 1958 (Formicidae: Ectatomminae). *Organisms Diversity & Evolution* **15**: 543–553.
- Padial JM, Miralles A, De la Riva I, Vences M. 2010.** The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* **7**: 16.
- Palumbi SR, Cipriano F, Hare MP. 2001.** Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution* **55**: 859–868.
- Pamilo P, Viljakainen L, Vihavainen A. 2007.** Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1340–1346.
- Pedraza-Lara C, Barrientos-Lozano L, Rocha-Sánchez AY, Zaldivar-Riverón A. 2015.** Montane and coastal species diversification in the economically important Mexican grasshopper genus *Sphenarium* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **84**: 220–231.
- Pérez-Lachaud G, Heraty JM, Carmichael A, Lachaud J-P. 2006.** Biology and behavior of *Kapala* (Hymenoptera: Eucharitidae) attacking *Ectatomma*, *Gnamptogenys*, and *Pachycondyla* (Formicidae: Ectatomminae and Ponerinae) in Chiapas, Mexico. *Annals of the Entomological Society of America* **99**: 567–576.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, Hazell S, Kamoun S, Sumlin WD, Vogler AP. 2006.** Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* **55**: 595–609.
- Posada D, Crandall KA. 2002.** The effect of recombination on the accuracy of phylogeny estimation. *Journal of Molecular Evolution* **54**: 396–402.
- Roger J. 1860.** Die Ponera-artigen Ameisen. *Berliner Entomologische Zeitschrift* **4**: 278–312.
- Rokas A, Melika G, Abe Y, Nieves-Aldrey JL, Cook JM, Stone GN. 2003.** Lifecycle closure, lineage sorting, and hybridization revealed in a phylogenetic analysis of European oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini) using mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**: 36–45.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012.** MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539–542.
- Ross KG, Gotzek D, Ascunce MS, Shoemaker DD. 2010.** Species delimitation: a case of study in a problematic ant taxon. *Systematic Biology* **59**: 162–184.
- Schatz B, Lachaud J-P, Beugnon G. 1995.** Spatial fidelity and individual foraging specializations in the Neotropical ponerine ant *Ectatomma ruidum* Roger (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* **26**: 269–282.
- Schatz B, Lachaud J-P, Beugnon G. 1996.** Polyethism within hunters of the ponerine ant, *Ectatomma ruidum* Roger (Formicidae, Ponerinae). *Insectes Sociaux* **43**: 111–118.
- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Moder K, Seifert B, Sanetra M, Dyreson E, Stauffer C, Christian E. 2006.** A multidisciplinary approach reveals cryptic diversity in Western Palearctic *Tetramorium* ants (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**: 259–273.
- Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH. 2010.** Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology* **55**: 421–438.
- Seifert B. 2009.** Cryptic species in ants (Hymenoptera: Formicidae) revisited: we need a change in the alpha-taxonomic approach. *Myrmecological News* **12**: 149–166.
- Simmons RB, Weller SJ. 2001.** Utility and evolution of cytochrome *b* in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20**: 196–210.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994.** Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**: 651–701.
- Smith MA, Hallwachs W, Janzen DH. 2014.** Diversity and phylogenetic community structure of ants along a Costa Rican elevational gradient. *Ecography* **37**: 720–731.
- Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA. 2008.** Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**: 13486–13491.
- Song H, Moulton MJ, Whiting MF. 2014.** Rampant nuclear insertion of mtDNA across diverse lineages within Orthoptera (Insecta). *PLoS ONE* **9**: e110508.
- Talavera G, Dincă V, Vila R. 2013.** Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. *Methods in Ecology and Evolution* **4**: 1101–1110.

- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725–2729.
- Wiens JJ, Penkrot TA. 2002.** Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology* **51**: 69–91.
- Wild AL. 2009.** Evolution of the Neotropical ant genus *Linepithema*. *Systematic Entomology* **34**: 49–62.
- Wiley EO. 1978.** The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology* **27**: 17–26.
- Zarza E, Reynoso VH, Emerson BC. 2008.** Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology* **17**: 3259–3275.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website:

Table S1. List of specimens, their localities and voucher and GenBank accession numbers for COI, *cyt b* and H3.

Table S2. Main characteristics for the gene markers examined.

Table S3. Ranges of pairwise COI corrected distances within and among the four main lineages of specimens assigned to *E. ruidum* that were recovered both by morphology and by the concatenated (COI + *cyt b*) data set.

Data S1. Separate and concatenated matrices examined in this study for the COI, *cyt b*, 28S and H3 markers.

Figure S1. Bayesian phylograms of the separate analyses derived from the COI and *cyt b* data sets including all the examined sequences. Sequences considered as *numts* after the phylogenetic analyses are indicated with a black line. Black circles near branches are Bayesian posterior probabilities ≥ 0.95 .

Figure S2. Phylogram derived from the Bayesian analysis performed with the *cyt b* marker excluding all potential *numts* and hybrids. Black circles near branches are Bayesian posterior probabilities ≥ 0.95 . Coloured lines refer to the main lineages recovered. Taxon names refer to the delimited morphospecies.

Figure S3. Digital photographs showing side and dorsal views of trunk, petiole and gaster of representative specimens belonging to the four delimited morphospecies originally assigned to *E. ruidum*: A, *E. gibbum*; B, *E. ruidum*; C, *E. sp. 'ruidum 2'*; D, *E. sp. 'ruidum 3'*; E, *E. sp. 'ruidum 4'*; F, *E. sp. 'ruidum 2 × sp. ruidum 3'*.

Figure S4. Drawings showing the observed differences in the pronotal hump and petiolar node among the delimited putative species belonging to the *Ectatomma ruidum* complex.

7. DISCUSIÓN

7.1. Presencia de *numts* en los análisis de delimitación de especies

En el presente trabajo se ha demostrado que el uso de cebadores universales para los dos marcadores de genes mitocondriales más utilizados, COI y Cit b, pueden dar lugar en algunos casos a la amplificación preferencial de *numts* en el género de hormigas *Ectatomma*. Este estudio también confirma los resultados de un estudio previo que apoya el uso del procedimiento de dilución pre-PCR como una herramienta valiosa para aumentar la amplificación preferencial de ortólogos mitocondriales (Calvignac et al., 2011).

Si una especie tiene regiones *numt* parálogas a la región del ADN mt de interés, la presencia accidental de *numts* puede conducir a filogenias genéticas robustas, pero incorrectas, y por lo tanto dando lugar a un error de identificación de especies y a la sobreestimación de la cantidad de especies utilizando metodologías de código de barras de ADN (Bensasson et al., 2001). Aquí se propone que varios de los parálogos mt nucleares detectados en este estudio representan *paleonumts*, ya que se anidan en un clado en la base del clado principal de *E. ruidum*, lo cual sugiere que se originaron antes de que los eventos de especiación se produjeran en este complejo de especies.

En contraste, sólo pocos parálogos mt parecen representar *neonumts*, esto con base en su pequeño número de sustituciones, y que pueden en ocasiones detectarse por la presencia de codones de paro y/o polimorfismo en los cromatogramas. Reconocemos que algunos *neonumts* adicionales podrían haber pasado desapercibidos por los criterios establecidos, ya que por lo general acumulan pocas mutaciones y frecuentemente se anidan juntos en un mismo clado con la secuencia ortóloga correspondiente (Song et al., 2014). No obstante, los *neonumts* no tienen un impacto serio en los diferentes enfoques de delimitación de especies.

La clase Insecta es el grupo reportado con un mayor número de especies con pseudogenes, principalmente dentro del orden Orthoptera, donde han sido ampliamente estudiados (Song et al., 2014). En el caso del orden Hymenoptera existen reportes de pseudogenes en avispas pertenecientes a la Familia Cynipidae (Rokas et al., 2003); Apidae, en la abeja mielera *Apis mellifera* (Pamilo et al., 2007) y Colletidae (Magnacca y Brown, 2010).

En Formicidae, la familia a la cual pertenecen las hormigas, se ha reportado la presencia de *numts*, solo en tres estudios. En el género *Atta*, Martins et al., (2007) caracterizaron dos grupos de *numts* en el gen mt COI, y se describieron los protocolos y cebadores para obtener específicamente a cada uno de estos *numts* así como las secuencias mt. Además, en ese estudio se resaltó que esos cebadores pueden ser útiles para evitar la interferencia de *numts* en las reconstrucciones filogenéticas y las historias de las poblaciones de *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758) basadas en secuencias de ADN mitocondrial.

En otro trabajo, Kronauer et al., (2007) identificaron algunos *numts* al realizar una filogenia molecular de las hormigas legionarias del género *Dorylus*. Estos autores descartaron varios datos en los cuales podían representar posibles pseudogenes, ya que presentaron mutaciones de cambio de lectura, y descartaron una secuencia por presentar una tasa de sustitución muy elevada. También los autores obtuvieron dos conjuntos de secuencias potencialmente funcionales para el gen mt COII, pero debido a que una de las alternativas no presentó variación en todas las especies, las secuencias fueron interpretadas como pseudogenes con una tasa de evolución muy baja, decidiendo tomar el segundo conjunto variable como las secuencias mitocondriales verdaderas.

En un estudio más reciente, Cristiano et al., (2014) reportaron la presencia de *numts* en las hormigas *Acromyrmex striatus* (Roger, 1863), un género perteneciente a la misma tribu (Attini) que *A. cephalotes*. En este trabajo se reporta la existencia de pseudogenes de citocromo b (Cit b), identificados por la presencia de dobles picos, indels y codones de paro internos. De todas las secuencias de

hormigas cortadoras de hojas analizadas, únicamente *A. striatus* mostró claramente la presencia de *numts*.

En el presente estudio se demuestra la existencia de *numts* dentro del complejo *E. ruidum* no sólo entre nuestras secuencias generadas, sino también en secuencias publicadas anteriormente (Smith et al., 2014). Nuestros resultados, por lo tanto, destacan el uso de un enfoque objetivo y riguroso que ayude a detectar la presencia de pseudogenes para evitar una sobreestimación en el número de linajes evolutivos independientes recuperados en análisis de delimitación de especies.

7.2. ADN de recombinación Nuclear

Los resultados sugieren la existencia de una zona de hibridación entre dos de las especies delimitadas como *E. sp. ruidum 2* y *E. sp. ruidum 3* en una de las localidades, cerca de la costa oaxaqueña del Pacífico Mexicano. La recombinación de ADN nuclear debido a un proceso de hibridación puede representar un problema para las secuencias de ADN, ya que los métodos filogenéticos tradicionales suponen que subyace una historia evolutiva única de los datos (Ibrahim et al., 2002; Posada y Crandall, 2002). En particular, es probable que se produzcan sesgos filogenéticos cuando existe una recombinación reciente entre taxones divergentes, en donde el “breakpoint” de recombinación divide el alineamiento en dos regiones de longitud similar (Posada y Crandall, 2002).

En este trabajo, el marcador nuclear examinado no proporcionó suficiente señal filogenética para estimar las relaciones interespecíficas dentro de las especies complejo *E. ruidum*. Sin embargo, su variación observada sugiere la existencia de secuencias H3 compuestas de regiones que pertenecen tanto a *E. sp. ruidum 2* y *E. sp. ruidum 3*. Este representa el primer informe de supuesta recombinación de este gen codificador de proteína en insectos.

7.3. Taxonomía Integradora

La taxonomía integradora ha demostrado ser una aproximación útil para la delimitación de especies, especialmente en grupos morfológicamente conservados. Este criterio ha sido particularmente útil en la discriminación de la diversidad de hormigas ([Schlick-Steiner et al., 2006 y 2010](#); [Seifert, 2009](#); [Ferreira et al., 2010](#)).

La congruencia entre nuestro análisis de delimitación de especies con base a secuencias de ADN y evidencia morfológica respalda la existencia de al menos tres linajes evolutivos independientes (especies) dentro del complejo *E. ruidum*. Dos de estas especies están representadas por las morfoespecies *E. sp. ruidum 1* y *E. sp. ruidum 2*, mientras que la tercera está compuesta provisionalmente de las morfoespecies *E. sp. ruidum 3* + *E. sp. ruidum 4*. Es necesario llevar a cabo más estudios biológicos, morfológicos y moleculares para determinar si las dos últimas morfoespecies representan o no especies válidas.

Las especies delimitadas *E. sp. ruidum 1* y *E. sp. ruidum 2* comparten una zona de distribución geográfica similar en la región Neotropical. Su alloespecificidad fue soportada por los análisis individuales, así como con los análisis concatenados y fue confirmada mediante la presencia de caracteres morfológicos exclusivos en las obreras. Roger (1860) describió la especie *E. ruidum* basado en sintipos provenientes de Colombia, Brasil y la Guyana francesa. Sin embargo, más recientemente Kugler y Brown (1982) restringieron la localidad tipo a Colombia ya que los sintipos de este país, concuerdan mejor con la descripción de la especie *E. ruidum*. La especie *E. sp. ruidum 1* corresponde morfológicamente a la descripción original de *E. ruidum* (Roger, 1860) y a las fotografías de los sintipos proporcionados en el sitio web Antweb ([Bolton, 2015](#)). Por otra parte, *Ectatomma sp. ruidum 2* representa una especie no descrita.

De los ejemplares revisados se determinó que la especie *E. sp. ruidum* se distribuye del sureste de México, en la frontera entre Chiapas y Guatemala, al norte y noreste de Sudamérica. Por otro lado, nuestros registros confirmados de *E. sp. ruidum 2* indican que esta especie se extiende desde Tamaulipas y Nayarit en las

costas del Atlántico y Pacífico de México, respectivamente, hasta el suroeste de Ecuador. Es necesario examinar los ejemplares de las poblaciones asignadas a *E. ruidum* reportadas para el norte de Brasil (Bolton, 2015) para determinar cuál de las dos especies propuestas extiende su distribución hacia el sur.

Se decidió que las morfoespecies *E. sp. ruidum* 3 y *E. sp. ruidum* 4 permanecieran tentativamente como un solo linaje evolutivo ya que no se pudo recuperar la monofilia del grupo. La distribución de esta especie se encuentra restringida a unas pocas localidades a lo largo de la costa del Pacífico mexicano en los estados de Oaxaca y Guerrero, cerca del estado de Michoacán, donde se encuentra la localidad tipo de *E. aztecum*, una de las especies sinónimo de *E. ruidum* (Emery, 1901).

La revisión del sintipo de *E. aztecum*, mostró que es muy similar a los ejemplares de la morfoespecie *E. sp. ruidum* 3, en la escultura del cuerpo y en la forma del nodo peciolar. Por lo anterior, es necesario realizar estudios integrales (biológicos, moleculares y morfológicos) para aclarar si las morfoespecies *E. sp. ruidum* 3 y *E. sp. ruidum* 4, en realidad representan linajes diferentes y si alguno de ellos puede asignarse a *E. aztecum*.

La presencia de la diversidad desapercibida en la zona del Istmo de Tehuantepec en Oaxaca, al sureste de México, y la presencia de posibles híbridos en este grupo concuerda con estudios previos en otros taxones que también presentan una historia evolutiva compleja a lo largo de la costa del Pacífico mexicano, particularmente en la región arriba mencionada (Zarza, et al., 2008; Pedraza-Lara et al., 2015).

7.4. Presencia de Microginias

Las dos especies del complejo *E. ruidum* que comparten una amplia distribución geográfica en el Neotrópico parecen diferir entre sí por la presencia/ausencia de reinas microginias. Todas las poblaciones de *E. sp. ruidum* 1 analizadas al parecer carecen de la presencia de reproductoras microginias, incluyendo poblaciones situadas en el sureste de México, Costa Rica, Venezuela, la Guayana Francesa y el este de Colombia (Breed et al., 1990, 1992, 1999; Guénard y McGlynn, 2013; J. P. Lachaud, datos no publicados). En contraste, se han reportado macroginias y microginias para las poblaciones asignadas a *E. sp. ruidum* 2 del sureste de México, la península de Yucatán y el oeste de Colombia (Fernández, 1991; Lachaud et al., 1999; Nettel-Hernanz et al., 2015; F. C. Prada, com. pers.). Estas dos especies son simpátridas en la región situada en la planicie costera cerca de la frontera entre Chiapas en México y Guatemala. Estudios previos han revelado que ambas especies tienen rasgos de vida similares en esta región, incluyendo el comportamiento de fingirse muertas cuando son perturbadas (Cupul-Magaña, 2009) y la presencia de las mismas especies de avispas parasitoides: Eucharitidae (Pérez-Lachaud et al., 2006; Lachaud y Pérez-Lachaud, 2015).

Investigaciones en curso (Zaldívar-Riverón, Meza-Lázaro, Poteaux, Lachaud, en preparación) respaldan que, además de la presencia/ausencia de microginias, las especies *E. sp. ruidum* 1 y 2 también pueden ser discriminadas entre sí por otros rasgos biológicos, como la temporada de reproducción sexual, así como por compuestos químicos en perfiles de hidrocarburos (Gallegos-Aguirre, 1998). Por lo tanto, se espera que la integración de datos biológicos, morfológicos y moleculares novedosos, así como material histórico de museos, pueda ayudar a proporcionar una delimitación y descripción sólida y definitiva de las especies en este grupo.

8. CONCLUSIONES

- ◆ Se detectó por primera vez la presencia de genes parálogos (*numts*) mitocondriales provenientes del núcleo en ejemplares de *E. ruidum*.
- ◆ El uso de cebadores universales para los dos marcadores de genes mitocondriales más utilizados, COI y Cit b, podría dar lugar en algunos casos a la amplificación preferencial de *numts* en el género de hormigas *Ectatomma*.
- ◆ El uso de un método de dilución pre-PCR de la plantilla molde de ADN, puede ayudar a evitar la amplificación de pseudogenes.
- ◆ La especie descrita como *E. ruidum* en realidad se encuentra compuesta por al menos tres linajes evolutivos:
 - » *E. sp. ruidum* 1, la cual corresponde a la descripción original de *E. ruidum*.
 - » *E. sp. ruidum* 2, la cual se caracteriza por presentar reinas microginias.
 - » *E. sp. ruidum* 3 + 4., para la cual es necesario llevar a cabo más estudios biológicos, morfológicos y moleculares para determinar si estas representan o no dos especies distintas.
- ◆ Es imperativo el uso de metodologías rigurosas que ayuden a detectar la presencia de pseudogenes para evitar una sobreestimación en el número de linajes evolutivos independientes en los análisis de delimitación de especies.
- ◆ La integración de datos biológicos, morfológicos y moleculares, así como material histórico de museos, puede ayudar a proporcionar una delimitación y descripción sólida y definitiva de las especies en este grupo.

9. LITERATURA CITADA

- Arias-Penna T. M. 2003. Nuevos registros de especies de hormigas de la subfamilia Ponerinae (Hymenoptera: Formicidae) para Colombia. *Caldasia*. 25(2): 429-431.
- Benesh DP, Hasu T, Suomalainen LR, Valtonen ET, Tirola M (2006) Reliability of mitochondrial DNA in an acanthocephalan: the problem of pseudogenes. *Int J Parasitol*. 36: 247–254.
- Bolton B. 2003. Synopsis and classification of Formicidae. *Memoirs of the American Entomological Institute*. 71: 1-370.
- Bourke, A.F.G. y N.R. Franks. 1995. *Social evolution in ants*. Princeton University press. 529 pp.
- Brussaard L., Behan-Pelletier, V. M.; Bignell, D.E.; Brown, V.K.; Didden, W.; Folgarait, P.; Fragoso, C.; Freckman, D.W.; Gupta, V.V.S.R.; Hattori, T.; Hawksworth, D.L.; Klopatek, C.; Lavelle, P.; Malloch, D.W.; Rusek, J.; Soderstrom, B.; Tiedje, J.M.; Virginia, R.A. Biodiversity and ecosystem functioning in soil. *Ambio*. v.26, p.563-570, 1997.
- Corbara B., J. R Lachaud and D. Fresneau, 1989. Individual variability, social structure and division of labour in the ponerine ant *Ectatomma ruidum* Roger (Hymenoptera; Formicidae). *Ethology*. 82: 89-100.
- Emery C. 1895. Die Gattung *Dorylus* Fab. und die systematische Eintheilung der Formiciden. *Zoologische Jahrbücher. Abteilung für Systematik, Geographie und Biologie der Tiere*. 8:685-778
- Fernández F. (ed.). 2003. *Introducción a las Hormigas de la región Neotropical*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. XXVI + 398 p.
- Folgarait P. J. 1998. Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. *Biodiversity and Conservation*. 7:1221–1244.

- Fujita M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A. y Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*. 27: 480-488.
- Fujisawa T., Barraclough T. G. 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*. 62: 707–724.
- Gutiérrez-García T. A. y Vázquez-Domínguez, E. 2013. Consensus between genes and stones in the biogeographic and evolutionary history of Central America. *Quaternary Research*. 79: 311-324.
- Giladi I. 2006. Choosing benefits or partners: a review of the evidence for the evolution of myrmecochory. *Oikos*. 112:481-492.
- Grimaldi D. y D. Agosti. 2000. A formicine in Cretaceous amber from New Jersey (Hymenoptera: Formicidae), and early evolution of the ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(25):13678-13683.
- Hajibabaei M., G. A.C. Singer, P. D.N. Hebert y D. A. Hickey. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*. 23(4): 167-172.
- Hebert P. D. N., S. Ratnasingham y J. R de Waard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences*. 270: 313–321.
- Hölldobler B., y O.E Wilson. 1990. *The Ants*. Harvard University Press, Cambridge. 732p.
- Jaffe K. 1993. *El mundo de las hormigas*. Baruta, Venezuela: Equinoccio (Ediciones de la Universidad Simón Bolívar). 188 pp.

- Keller R. A. 2011. A phylogenetic analysis of ant morphology (Hymenoptera: Formicidae) with special reference to the poneromorph subfamilies. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 355:1-90.
- Kempf W.W. 1972. Catalogo abreviados das formigas de regio Neotropical. *Studia Entomológica*. 15:3-344.
- Kerr K. C. R., Lijtmaer, D. A., Barreira, A. S., Hebert, P. D. N. y Tubaro, P. L. (2009). Probing evolutionary patterns in Neotropical birds through DNA barcodes. *PLoS ONE*. 4: 2.
- Lachaud J. P., 1985. Recruitment by selective activation: An archaic type of mass recruitment in a Ponerinae Ant (*Ectatomma ruidum*). *Sociobiology*. 11 : 133-142.
- Lobry de Bruyns L. A., y Conacher, A. J. (1990). The role of termites and ants in soil modification: A review. *Australian Journal of Soil Research*, 28, 55-93
- Lopez, J. V., N. Yuhki, R. Masuda, W. Modi, y S. J. O'Brien. 1994. *Numt*, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *J. Mol. Evol.* 39:174–190.
- Maynard C., 1996: Forest Genetics Glossary. SUNY College of Environmental Science and Forestry. http://www.esf.edu/course/cmeynard/GENE_GLOSSERY.html.
- Moreau C. S., C. D. Bell. 2013. Testing the museum versus cradle tropical biological diversity hypothesis: phylogeny, diversification, and ancestral biogeographic range evolution of the ants. *The Society for the Study of Evolution. Evolution*. 67-8: 2240–2257.
- Morrone J. J. 2001. Biogeografía de América Latina y el Caribe. Manuales y Tesis SEA, nro. 3, Sociedad Entomológica Aragonesa, Zaragoza (España).
- Morrone J.J. 2014. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa*. 3782: 1-110.

- Morrone J.J. 2015. Biogeographical regionalisation of the world: A reappraisal. *Australian Systematic Botany*. 28 (2-3):81-90
- Ouellette G. D., B. L. Fisher y D. J. Girman. 2006. Molecular systematics of basal subfamilies of ants using 28S rRNA (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40: 359-369
- Papadopoulou A., I. Anastasiou y A. P. Vogler. 2010. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-aegean trench calibration. *Molecular Biology and Evolution*. 27:1659-1672
- Passera L., Lachaud, J. P. y Gomel, L. 1994. Individual food source fidelity in the Neotropical ponerine ant *Ectatomma ruidum* Roger (Hymenoptera Formicidae). *Ethology, Ecology and Evolution*. 6: 13-21.
- Perfecto I. y J. H. Vandermeer. 1993. Cleptobiosis in the ant *Ectatomma ruidum* in Nicaragua. *Insectes Sociaux*. 40(3):295-299
- Pratt S. C., 1989. Recruitment and other communication Behavior in the ponerinae ant *Ectatomma ruidum*. *Ethology*. 81: 313- 331.
- Rojas Fernández, Patricia. 2001. Las hormigas del suelo en México: Diversidad, distribución e importancia (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie), núm. Es1, pp. 189-238.
- Rokas A., Melika G., Abe Y., Nieves-Aldrey JL, Cook JM, Stone GN. 2003. Lifecycle closure, lineage sorting, and hybridization revealed in a phylogenetic analysis of European oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini) using mitochondrial sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26: 36-45.
- Rull V. 2007. On the origin of present neotropical biodiversity: a preliminary meta-analysis about speciation timing using molecular phylogenies. *Orsis* 22: 105-119

- Rull V. 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: The tertiary-quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology*. 17: 2722-2729.
- Rull, V. 2011a. Origins of biodiversity. *Science*. 331:398-399.
- Rull V. 2011b Neotropical biodiversity: Timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution*. 26: 508-513.
- Rull, V. 2014. Pleistocene speciation is not refuge speciation. *Journal of Biogeography*.
- Schatz, B. G. Beugnon y J.-P Lachaud. 1994. Time-place learning by an invertebrate, the ant *Ectatomma ruidum* Roger. *Anita. Behav.* 48: 9-15.
- Schatz, B., Lachaud J. P., Beugnon G.y A. Dejean. 1999. Prey density and polyethism within hunting workers in the Neotropical ponerine Ant *Ectatomma ruidum* (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology*. 34(3): 605-617.
- Schultz, T.R. y T.P. McGlynn. 2000. The interactions of ants with other organisms. Pp. 35-44. In: D. Agosti., J.D. Majer, L.E. Alonso and T.R. Schultz (eds). *Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Ward, P. S. 2007. Phylogeny, classification, and species-level taxonomy of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*. 1668:549-563.
- Wilson E. O. y Hölldobler B. 2005. Eusociality: origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102 (38):13367-13371.

10. Material Anexo

Table S1. List of specimens, their localities and voucher and GenBank accession numbers for COI, cyt *b* and H3.

Taxon	No. specimens	Voucher no.	Locality	GenBank accession nos.		
				COI	Cyt <i>b</i>	H3
<i>E. sp. ruidum</i> 1	12	CNIN-1748-50, 52-54, 56-57, CLeoncillos113-116	México, Chiapas, Tapachula, Cantón Leoncillos, 14.7689 -92.403.	KU570629-32, 36-39	KU570545-48	KU570513-18
<i>E. sp. ruidum</i> 1	2	CNIN-2000, 01	Guatemala, Escuintla, Carr. Puerto Quetzal, cruce con Obero, 14.5205 - 90.4718.	KU570633-34	-	KU570519
<i>E. sp. ruidum</i> 1	1	CNIN-2002	Honduras, 2km SSW, Atlántida, Tela.	KU570635	KU570549	-
<i>E. sp. ruidum</i> 1	9	ACGAB812-09, 27-09, 47-09, 70-09,71-09,72-09,74-09,75-09	Costa Rica, Guanacaste, Santa Rosa Nancite, 10.8, -85.65.	KC419177, 244, 906, 918, GU709078-79, 217, 27	-	-
<i>E. sp. ruidum</i> 1	1	ACGAJ226-11	Costa Rica, Guanacaste, Santa Rosa, 10.78, -85.51.	KC419710	-	-
<i>E. sp. ruidum</i> 1	1	ACGAE182-10	Costa Rica, Cacao-1044, 10.838, -85.619.	HQ546172	-	-
<i>E. sp. ruidum</i> 1	2	ACGAC854-10, 56-10	Costa Rica, Nancite, 10.807, -85.699.	KC417596, 418782	-	-
<i>E. sp. ruidum</i> 1	3	ACGAB846-09, 48-09, 76-09	Costa Rica, Santa Rosa-Nancite, 10.8, -85.65.	KC417529, 595, GU709215, AGI56835	-	-
<i>E. sp. ruidum</i> 1	4	ACGAF378-11,379-11,452-11, 453-11	Costa Rica, Guanacaste, Junquillal, 10.969, -85.685.	KC418834, 419102, 759, 799,	-	-
<i>E. sp. ruidum</i> 1	2	W1LCO, W2LCO	Venezuela, Acevedo, Caucagua, 10°17'48 N 66°23'7" W	KU570660-61	-	-
<i>E. sp. ruidum</i> 1	5	Erui_Colomb_19-22, 24	Colombia, Meta, El Caduceo, San Martin.	KU570640-44	-	-
<i>E. sp. ruidum</i> 2	3	CNIN-1738, 1814-15	México, Nayarit, Compostela, Fortuna de Vallejo, 20.9948 -105.1192.	KU570584-85	KU570522, 29-30	KU570486
<i>E. sp. ruidum</i> 2	5	CNIN-1739-41, 1816-17	México, Jalisco, Pto. Vallarta, Palo María.	KU570576, 86-87	KU570523-25, 531-32	KU570487
<i>E. sp. ruidum</i> 2	6	17442, 44-47, Chame2_1Jal1	México, Jalisco, Est. Biol. Chamela, camino Chachalaca, 19.4993 - 105.0383.	KU570577-80, 605	-	KU570479-80
<i>E. sp. ruidum</i> 2	6	E_rui2_Izapa3b, 5,	México, Chiapas, Rosario Izapa.	KU570606-10	.	-

		6b,7b,16b_Chis						
<i>E. sp. ruidum</i> 2	3	CNIN-1758-62, PMorelos_25-26	México, Quintana Roo, Puerto Morelos.		KU570581, 611-12	KU570526		KU570481
<i>E. sp. ruidum</i> 2	2	CNIN-1893-94	México Oaxaca, Asunción Ixtaltepec, Mazahua, 16.633 -94.950.		KU570596-97	-		KU570493
<i>E. sp. ruidum</i> 2	6	CNIN-1861, 63-65, 84-85	México, Oaxaca, Asunción Ixtaltepec, Santiago Ixtaltepec, 16.694 -94.904.		KU570590-93	KU570534-36		KU570490-91
<i>E. sp. ruidum</i> 2	2	CNIN-1866, 68	México, Oaxaca, Santo Domingo Ingenio, La Blanca, 16.588 -94.692.		KU570594-95	-		KU570483-84
<i>E. sp. ruidum</i> 2	6	CNIN-1886-87, 95, 97, 1967, 69	México, Oaxaca, Santa María Huatulco, Bajo Teyula, 15.733 -96.297.		-	KU570537-38, 41-44		KU570485, 92
<i>E. sp. ruidum</i> 2	1	CNIN-1898	México, Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Copoya, 16.713 -93.117.		-	-		KU570482
<i>E. sp. ruidum</i> 2	2	CNIN-1735, 1819	México, Chiapas, Chiapa de Corzo, Emiliano Zapata, 16.665 -92.952.		KU570575, 88	KU570521, 33		KU570478, 88
<i>E. sp. ruidum</i> 2	8	CNIN-1489-90, 1974-79	México, Yucatán, Camino a Celestún, 26.912 -89.961		KU570573-74, 99-604	-		KU570494-95
<i>E. sp. ruidum</i> 2	2	CNIN-1806, 08	Costa Rica, Parque Nal. Cahuita, 9.734 -82.828.		KU570582-83	KU570527-28		-
<i>E. sp. ruidum</i> 2	3	CNIN-1996-98	Costa Rica, Heredia, Est. Biol. La Selva, 10.429 -84.009.		KU570598, 613	KU570539, 40		KU570496
<i>E. sp. ruidum</i> 2	6	CNIN-1822, CR4-1,4-2,1, 2, 3	Costa Rica, Heredia, Est. Biol. La Selva, 10.430 -84.007.		KU570589, 614-618	-		KU570489
<i>E. sp. ruidum</i> 2	1	ER8ALCO	Ecuador, Imbarura, 00° 52' 6.6" N 78° 27' 49" W		KU570619	-		-
<i>E. sp. ruidum</i> 2	1	ER9ALCO	Ecuador, Esmeraldas, 00° 52' 5.7" N 79° 39' 14.5" W		KU570620	-		-
<i>E. sp. ruidum</i> 2	1	ER10ALCO	Ecuador, Esmeraldas, 00° 31' 49.9" N 79° 32' 18.1" W		KU570621	-		-
<i>E. sp. ruidum</i> 2	1	ER15ALCO	Ecuador, Esmeraldas, 00° 18' 10.8" N 79° 27' 25.8" W		KU570622	-		-
<i>E. sp. ruidum</i> 2	1	ER16ALCO	Ecuador, Esmeraldas, 00° 55' 09.5" N 79° 39' 54.5" W		KU570623	-		-
<i>E. sp. ruidum</i> 2	1	ER17ALCO	Ecuador, Pichincha, 00° 07' 28.4" N 079° 14' 16.9" W		KU570624	-		-
<i>E. sp. ruidum</i> 2	1	ER11ALCO	Ecuador, Pichincha, 00° 9' 42.65" S, 79° 14' 3.7" W		KU570625	-		-
<i>E. sp. ruidum</i> 2	1	ER13ALCO	Ecuador, Santa Elena 1°70'65.2" N 80°79'54.9" W		KU570626	-		-
<i>E. sp. ruidum</i> 2	1	ER18ALCO	Panama, Barro Colorado		KU570628	-		-
<i>E. sp. ruidum</i> 2		CB225LCO	Colombia, Yotoco, 3°52'53" N 76°26'13" W		KU570627	-		-
<i>E. sp. ruidum</i> 3	4	CNIN-1851, 1987-89	México, Guerrero, Copala, Est. Microondas Fogos, 16°34'03"N 98°53'17"W		KU570669, 71-73	KU570567-69		KU570507-09

<i>E. sp. ruidum</i>	3	2	CNIN-1809, 10	México, Oaxaca, Mpio. San Pedro Mixtepec, 8km N Pto. Escondido, Rancho Yerba Santa, 15.940 -97.071.	KU570667-68	KU570560-61	KU570504-03
<i>E. sp. ruidum</i>	3	3	CNIN-1889-91, 1970, 71	México, Oaxaca, Santa María Tonameca, San Juanito o La Botija, 15.796 -96.796.	KU570670-75	KU570562-66	KU570505-06
<i>E. sp. ruidum</i>	2						
<i>X. sp. ruidum</i>	3	3	CNIN-1993-95	México, Oaxaca, Pinotepa Nacional, Lagunilla, 16.353 -98.218.	KU570763-65	KU570748-50	KU570510-12
<i>E. sp. ruidum</i>	4	3	CNIN-1734, 36-37, 1812-13	México, Oaxaca, Mpio. Tonameca, 3km N Mazunte, 15.685073, -96.565049	KU570662-64	KU570550-53	KU570497-99
<i>E. sp. ruidum</i>	4	4	CNIN-1880, 82, 1972-73	México, Oaxaca, Santa María Tonameca, Cuatode, 15.732, -96.509.	KU570665-66	KU570554-57	KU570500
<i>E. sp. ruidum</i>	4	2	CNIN-1991-92	México, Oaxaca, Santa María Tonameca, entrada a Piedras Negras, 15.725 -96.66.	-	KU570558-59	KU570501-02
<i>E. gibbum</i>	1	1	CNIN-2003	Nicaragua, Región Autónoma del Atlántico Sur, Reserva Natural Kahka Creek 12.657 -83.743.	KU570676	KU570570	KU570520
<i>E. gibbum</i>	1	1	ASLAM1629_11	Nicaragua, Chontales, 15 km N Sato Tomas, 12.203, -85076	NA	-	-
<i>E. gibbum</i>	1	1	ASLAM1785_12	Nicaragua, Chontales, 2.5km NE Santo Domingo, 12.276, -85.064	NA	-	-
<i>E. gibbum</i>	1	1	ASLAM2059_12	Honduras, Atlantida, 12km SW La Ceiba, 15.694, -86.864	NA	-	-
<i>E. gibbum</i>	2	2	ASLAM419-11, 423-11	Honduras, Gracias a Dios, Las Marias, 15.718, -84.878	JF863496, JF863500	-	-
<i>E. tuberculatum</i>	1	1	CNIN-1743	México, Jalisco, Tecolotlán, Sierra de Quila, 20.274 -104.062.	-	KU570571	-
<i>E. tuberculatum</i>	1	1	CNIN-1733	México, Chiapas, Tuxtla Gutierrez, ZOOMAT, 16.725 -93.093.	KU570682	-	-
<i>E. tuberculatum</i>	2	2	CNIN-1487-88	Yucatán, Kabah, 20.247 -89.747.	KU570683-84	-	-
<i>E. edentatum</i>	1	1	CNIN-2046	Brasil, Minas Gerais, Passos, Parque Emilio Piantino.	KU570701	-	-
<i>E. opaciventre</i>	3	3	CNIN-2049-51	Brasil, Minas Gerais, Passos, Parque Emilio Piantino, -20.714 -46.592.	KU570702-04	-	-
<i>E. brunneum</i>	1	1	CNIN-2047	Brasil, Minas Gerais, Passos, Parque Emilio Piantino, -20.714 -46.592.	KU570705	-	-
<i>E. brunneum</i>	1	1	CNIN-2040	Perú, Loreto, 15 km W; Mazán, Santa Cruz	-	KU570572	-
<i>E. tuberculatum</i>	9	9	E_tuber_Chet31, 32, 3_1, 1, 2, 117-120	México, Quintana Roo, Chetumal	KU570685-93	-	-
<i>E. edentatum</i>	7	7	E_edent_Colombia_7-11, 1_1,1_2	Colombia , Meta, El Caduceo, San Martín	KU570694-700	-	-
<i>Rhytidoponera metallica</i>	1	1			DQ353374	-	-

Typhlomyrmex
rogenhoferi

1

DQ353356

-

-

S1. Characteristics of the three markers examined in this study.

Gene	n	bp	VS	PIS
COI (all)	184	632	285	250
COI (<i>no numts</i>)	136	632	267	236
Cyt <i>b</i> (all)	66	705	303	194
Cyt <i>b</i> (<i>no numts</i>)	56	705	278	180
COI+ Cyt <i>b</i>	33	1337	451	305
H3	41	260	5	2

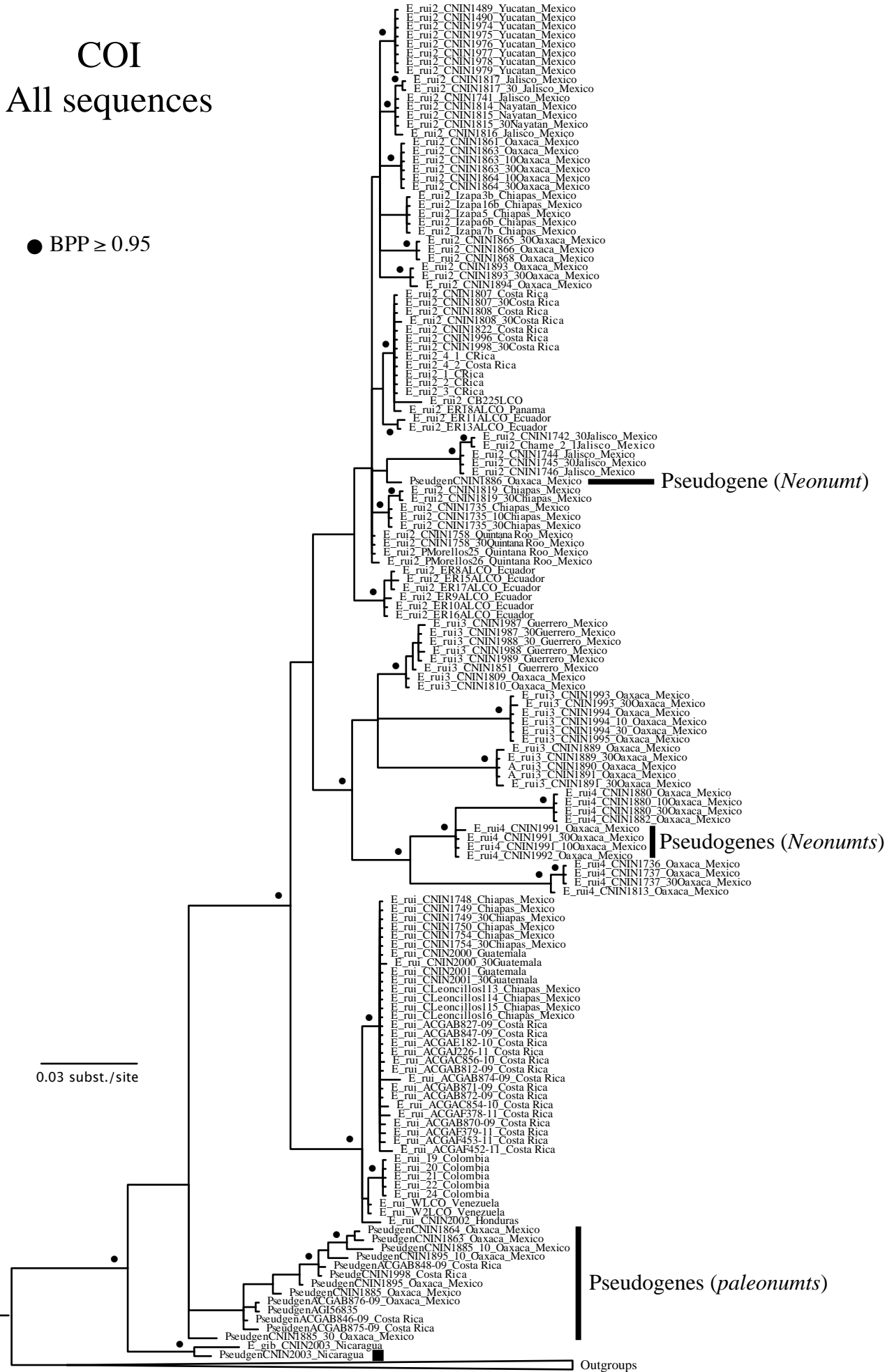
all = complete data set; *no numts* = data set without *numts* and potential hybrids; n = number of sequences; H = number haplotypes; bp = number of base-pairs; number of variable sites; number of parsimoniously informative sites.

S3. Pairwise corrected genetic distances from the COI marker between and within the morphospecies delimited in this study.

	E. sp. ruidum 2	E. sp. ruidum 1	E. sp. ruidum 4	E. sp. ruidum 3	E. gibbum	E. tuberculatum	E. edentatum	E. opaciventris	E. brunneum	metallica	trogenhoferi
E. sp. ruidum 2	0.0000-0.0455										
E. sp. ruidum 1	0.0395-0.0717	0.0000-0.0198									
E. sp. ruidum 4	0.0771-0.1124	0.0863-0.1224	0.0000-0.0952								
E. sp. ruidum 3	0.0345-0.0997	0.0339-0.0919	0.0778-0.1133	0.0547-0.0565							
E. gibbum	0.0907-0.1015	0.0774-0.1089	0.1106-0.1411	0.0831-0.1207	0.0000-0.0033						
E. tuberculatum	0.1241-0.1717	0.1153-0.1696	0.1718-0.2029	0.1538-0.1696	0.1542-0.1655	0.0000-0.0097					
E. edentatum	0.1446-0.2065	0.1546-0.2077	0.2204-0.2248	0.1745-0.2088	0.1623-0.1913	0.1888-0.2070	0.0000-0.1600				
E. opaciventris	0.1037-0.1546	0.1324-0.1638	0.1474-0.1858	0.1395-0.1601	0.1049-0.1121	0.1420-0.1547	0.1469-0.1680	0.0032-0.0035			
E. brunneum	0.1323-0.1665	0.1109-0.1545	0.1503-0.1912	0.1543-0.1790	0.1425-0.1569	0.1754-0.1831	0.1546-0.2056	0.1445-0.1528	0.021		
T. metallica	0.1796-0.2111	0.1822-0.2155	0.2207-0.2303	0.1988-0.2179	0.1815-0.1856	0.2214-0.2270	0.2048-0.2385	0.1825-0.1900	0.1940-0.941		
trogenhoferi	0.1998-0.2337	0.1880-0.2386	0.2328-0.2633	0.2191-0.2393	0.2167-0.2214	0.2217-0.2292	0.2427-0.25.97	0.2114-0.2165	0.2242-0.2288	0.2066	

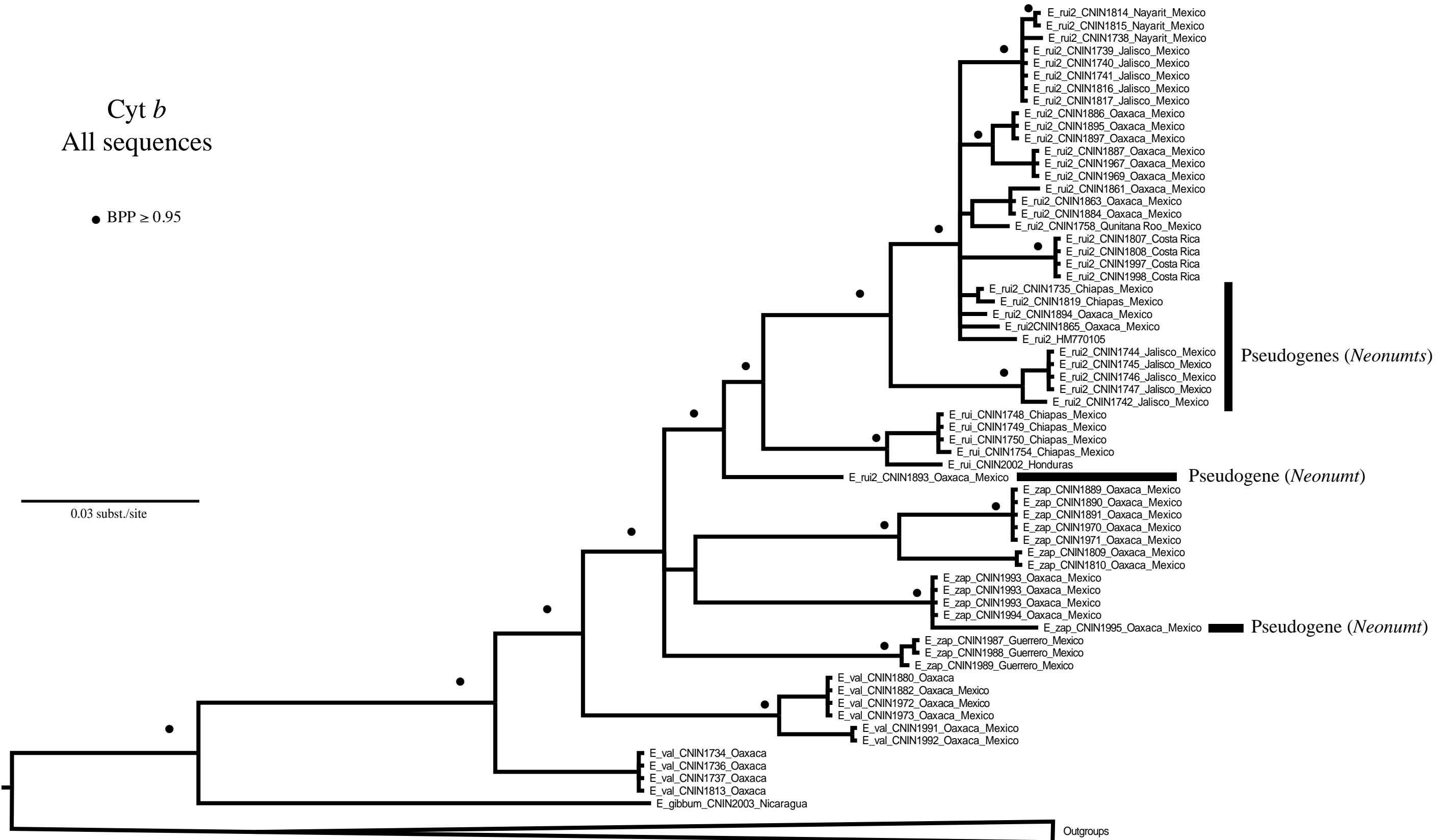
COI All sequences

● BPP ≥ 0.95



Cyt *b*
All sequences

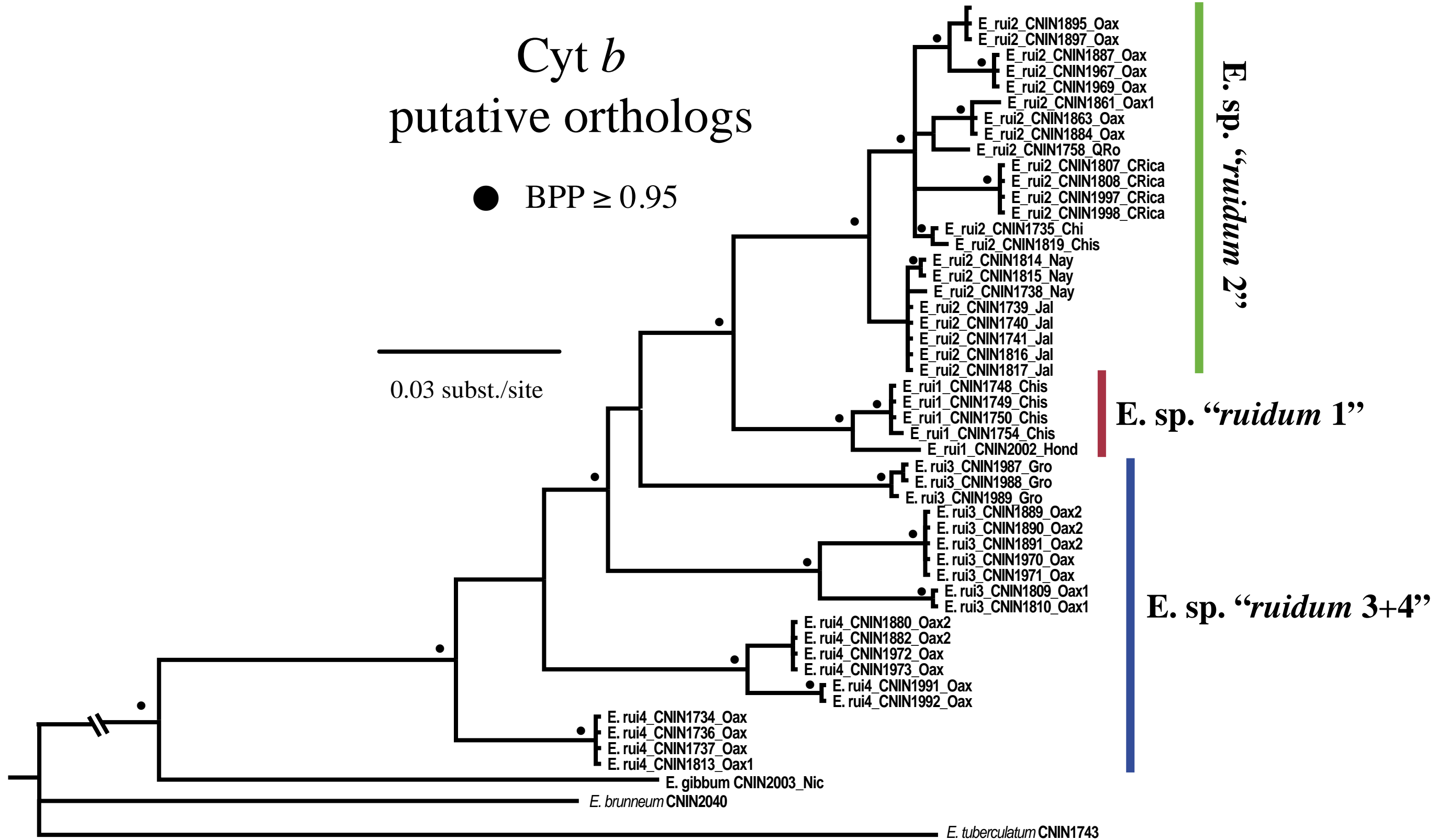
● BPP ≥ 0.95



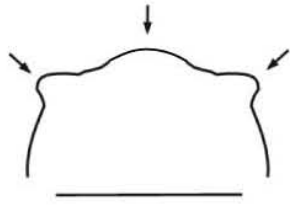
Cyt *b* putative orthologs

● BPP ≥ 0.95

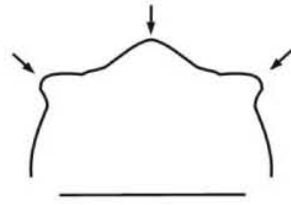
0.03 subst./site



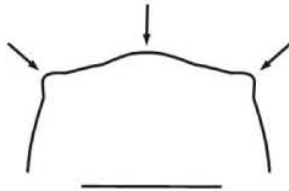




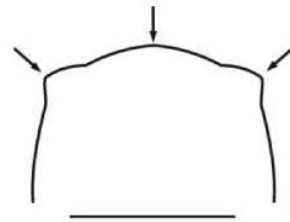
E. sp. ruidum 1



E. sp. ruidum 2



E. sp. ruidum 3



E. sp. ruidum 4

