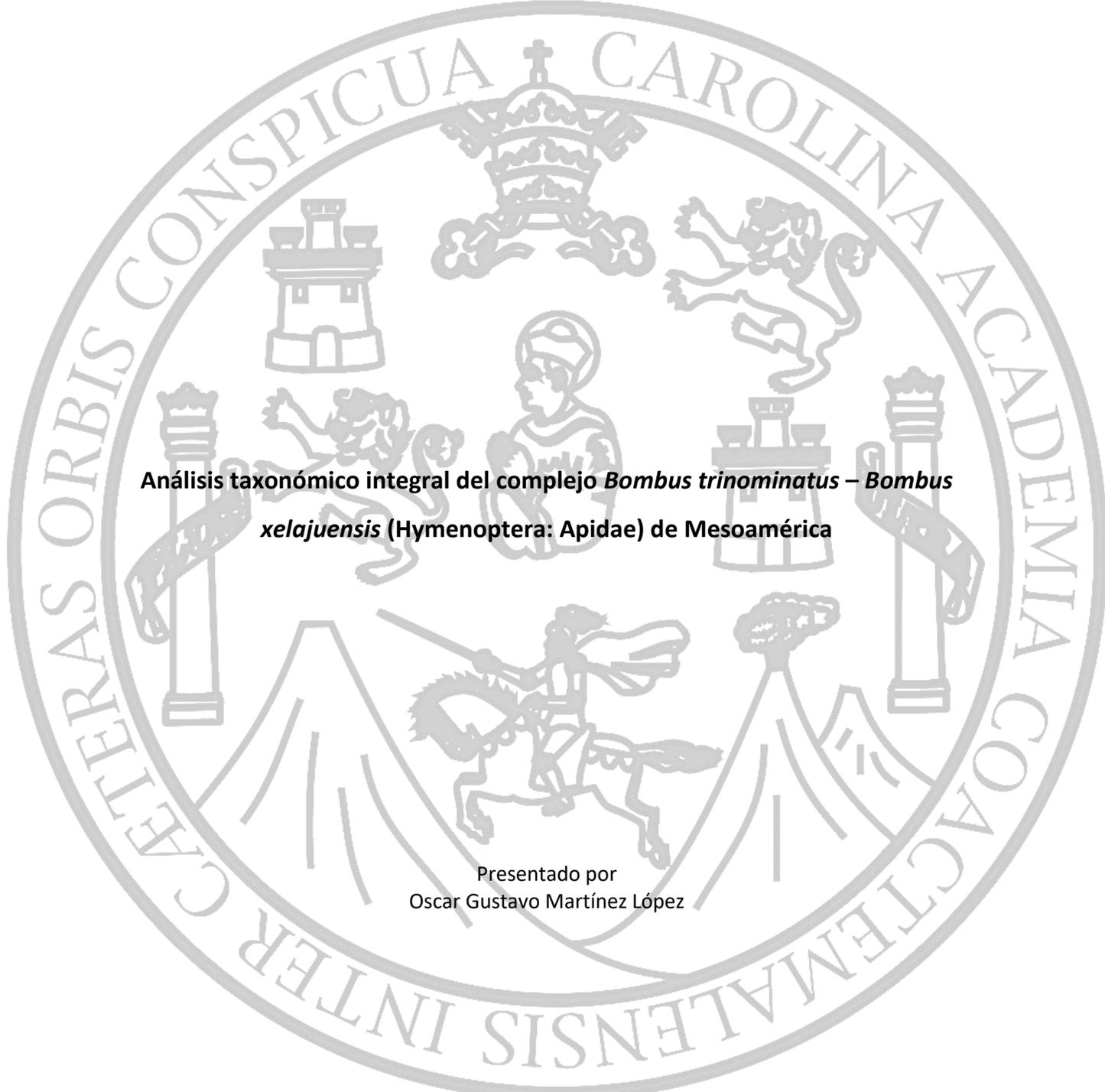


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central figure of a man on horseback, holding a staff, surrounded by various symbols including a crown, a lion, a castle, and a mountain. The Latin motto "CÆTERAS ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

Análisis taxonómico integral del complejo *Bombus trinominatus* – *Bombus xelajuensis* (Hymenoptera: Apidae) de Mesoamérica

Presentado por
Oscar Gustavo Martínez López

Para optar al título de
Biólogo

Guatemala, septiembre de 2019

Análisis taxonómico integral del complejo *Bombus trinominatus* – *Bombus xelajuensis*
(Hymenoptera: Apidae) de Mesoamérica

Oscar Gustavo Martínez López

Carrera: Biología

Guatemala, septiembre de 2019

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

JUNTA DIRECTIVA

Decano:	M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto
Vocal Primero:	Dr. Juan Francisco Pérez Sabino
Vocal Segundo:	Dr. Roberto Enrique Flores Arzú
Vocal Tercero:	Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera
Vocal Cuarto:	Br. Giovanni Rafael Funes Tovar
Vocal Quinto:	Br. Carol Merari Caceros Castañeda
Secretaria Académica:	Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi madre, quién a través de sus enseñanzas y sus andanzas me llevo a conocer Guatemala. Ella se esmero en hacer de mi la persona que soy el día de hoy, sus aventuras como arqueóloga me llenaron de una admiración por el amor que le tenía a nuestra tierra y la naturaleza que en ella reside. Madre, donde quiera que estés, estaré eternamente agradecido contigo, te amaré y estaré orgulloso de ser tu hijo. Guíame a través de tu espíritu incansable, que amaba la conservación y la historia de nuestra Guatemala.

Quiero agradecer a mi hermano Allan, desde pequeño me cuidaste y me ayudaste con mis estudios. No olvidaré como en el primer año de la carrera me apoyaste comprándome libros para poder estudiar. Gracias por tu apoyo, tu esfuerzo y tu paciencia para ser ese hermano que esta conmigo en las buenas y en las malas.

Quiero agradecer a mi hermano Patrick, me apoyaste en mis años de estudiante dándome los medios para que pudiera ser independiente, pudiera trabajar y pudiera estudiar al mismo tiempo. En los momentos más difíciles económicamente me apoyaste muchísimo y sé que puedo contar con vos en cualquier circunstancia.

Quiero agradecer a mi primo Marvin, gracias a tu apoyo y tus ideas he podido estudiar a los abejorros. Me apoyaste muchísimo en mis últimos años de carrera, dándome trabajo en un tema tan importante como la polinización y la conservación. También me enseñaste el valor de la familia, de la amistad y de tener un corazón noble en todo momento. Sin vos, seguramente estaría aun buscando mi pasión dentro de la biología.

Quiero agradecer a Natalia, Eunice, Carlos y Rémy. Los cuatro me apoyaron en mi formación profesional y todos creyeron en mí y me apoyaron en momentos difíciles. Les agradezco siempre su amistad, su compañerismo y el ser ejemplos a seguir de como hacer bien las cosas como biólogos. Para finalizar, quiero agradecer a muchos compañeros y compañeras de la carrera, que hicieron que fuera un viaje increíble el estudiar en la Universidad, pero especialmente a Samanta, Andrea, Paula, Cristi y Lee. Ustedes me apoyaron y nos vi crecer como biólogos, estoy contento de ser su colega y amigo.

Índice

1. Resumen.....	7
2. Introducción	8
3. Antecedentes.....	9
3.1 Taxonomía y su importancia	9
3.2 Concepto de especie	10
3.3 Taxonomía integral y su importancia.....	10
3.4 Herramientas en el estudio integral.....	11
3.4.1 Estudios morfométricos.....	11
3.4.2 Estudios genéticos	12
3.4.3 Estudios de divergencia de nicho ecológico	13
3.5 Estudios sobre abejas y declives poblacionales	14
3.6 Estudios taxonómicos del género <i>Bombus</i> Latreille en la región.....	15
3.6.1 El problema taxonómico en los abejorros de la región y en el complejo <i>B. trinominatus</i> Dalla Torre - <i>B. xelajuensis</i> Van Asperen.....	16
3.7 Estudios morfométricos para el género <i>Bombus</i>	17
3.8 Estudios genéticos del género <i>Bombus</i>	17
3.9 Estudios biogeográficos del género <i>Bombus</i>	18
4. Justificación	19
5. Objetivos.....	20
6. Hipótesis	20
7. Materiales y Métodos.....	21
7.1 Colecta de datos.....	21
7.1.1 Sitio de estudio	21
7.1.2 Especímenes	22
7.1.3 Medición de puntos anatómicos de la venación de las alas de los especímenes	23
7.1.4 Extracción y amplificación.....	24
7.1.5 Modelado de nicho ecológico	25
7.2 Análisis de datos.....	25
7.2.1 Morfometría Geométrica	25
7.2.2 Filogenia	25
7.2.3 Divergencia de nicho ecológico.....	26
8. Resultados.....	28
9. Discusión	33
10. Conclusiones	36

11.	Recomendaciones	37
12.	Referencias	37
13.	Anexos	44

1. Resumen

Las estimaciones recientes del número de especies que existen en el planeta rondan entre 3.6 a 13.6 millones de especies, de las cuales se han descrito 1.5 a 1.8 millones. Del número de especies descritas, muchas presentan conflictos taxonómicos y especialmente especies emparentadas. Esto indica que el trabajo y la resolución de conflictos taxonómicos son necesarios en todos los taxones conocidos. El desarrollo de otras disciplinas biológicas y la integración de un concepto flexible de especie propuesto por Queiroz en 2007 ha generado herramientas y un concepto de especie base para el estudio de la biodiversidad. En este contexto, las abejas son un grupo importante de polinizadores que presentan una gran cantidad de conflictos taxonómicos. Asimismo, los declives poblacionales que están siendo documentados para algunas especies de abejas, como los abejorros, solo son estimaciones ya que en algunos casos se desconoce la correcta identificación de diferentes poblaciones o especies. Por lo tanto, este estudio se enfocó en el uso de geometría morfométrica de alas, filogenia basada en un marcador molecular (COI) y modelaje de nicho ecológico para resolver el conflicto taxonómico que existe en el complejo de especies *Bombus trinominatus* y *Bombus xelajuensis*. A partir de los tres análisis y evocando una respuesta integral, se tiene evidencia de que el complejo de especies *B. trinominatus* – *B. xelajuensis* realmente está conformado por 2 especies diferentes. Por lo tanto, es válido, nombrar a los abejorros que se encuentran del lado oeste del Istmo de Tehuantepec como *B. trinominatus* y del lado este como *B. xelajuensis*. Esto demuestra la importancia de utilizar un enfoque integral para resolver especies cercanamente emparentadas y probablemente de reciente divergencia, especialmente para proveer información taxonómica para la conservación de estos abejorros en Mesoamérica.

2. Introducción

En la actualidad, se estima que la cantidad de especies que existen en el planeta ronda entre 3.6 millones hasta 13.6 millones de especies (Hawksworth & Kalin-Arroyo, 1995, p.111), pero un número aproximado podría ser 10 millones, de los cuales se han descrito 1.5 a 1.8 millones (Wilson, 2003, p. 78). Además, se estima que hay alrededor de 6,000 taxónomos a nivel mundial (Wilson, 2003, p. 78). Por lo tanto, el trabajo taxonómico pendiente es basto y falta mucho por clasificar en todos los taxones conocidos. Esto se suma a la necesidad de una correcta identificación de especies, lo que hace que la taxonomía en la actualidad sea una disciplina fundamental para la exploración y comprensión de la biodiversidad.

En las últimas décadas los estudios taxonómicos y la gente interesada en la taxonomía se han ido reduciendo (Padial, Miralles, De la Riva & Vences, 2010, p. 10; Schlick-Steiner, Steiner, Seifert, Stauffer, Christian, Zuccarelo & Crozier, 2010, p. 422). Además, la falta de un criterio definido sobre el concepto de especie (Brower, 2002, p.5; Queiroz, 2007, p. 879; Schlick-Steiner *et al.*, p. 422) y la cantidad de especies que existen en el planeta (Padial *et al.*, 2010, p. 10) hace que la tarea en esta disciplina sea monumental.

Sin embargo, esta disciplina biológica puede beneficiarse del desarrollo de la tecnología, del trabajo taxonómico integral y de la unión de otras disciplinas (*e.g.* sistemática molecular, filogeografía, biogeografía, ecología) (Leliaert, Verbruggen, Vanormelingen, Steen, López-Bautista & Clerck, 2014, p.189; Padial *et al.*, 2010, p. 2-3). Esto sumado a un criterio más flexible del concepto de especie (Leliaert *et al.*, 2014, p. 182; Queiroz, 2007, p. 885; Schlick-Steiner *et al.*, 2010, p. 430) serán claves para la correcta identificación, clasificación y descripción de las especies.

Los abejorros del género *Bombus* Latreille, son un grupo monofilético de abejas que consisten de aproximadamente 250 especies alrededor del mundo (Cameron, Hines & Williams, 2007, p. 162; Williams, 1998, p. 79). Estos polinizadores tienen una gran importancia económica y ecológica (Goulson & Darvill, 2008, p. 192-193). Sin embargo, varias especies dentro de este grupo presentan conflictos taxonómicos (*e.g.* complejo de especies de los sub-géneros *Bombus* sensu stricto y *Thoracobombus*) y sus poblaciones se

encuentran en declive (Goulson & Darvill, 2008, p. 201- 202; Cameron *et al.*, 2007, p. 180-181; Williams, Cameron, Hines, Cederberg & Rasmont, 2008, p. 51-56).

Por lo tanto, este estudio se enfocó en el uso de la integración de técnicas morfométricas, (morfometría geométrica), moleculares (análisis filogenético basado en ADN mitocondrial) y conservadurismo de nicho ecológico basado en el modelaje de nicho ecológico, para resolver el conflicto taxonómico que existe en el complejo de especies de abejorros *Bombus trinominatus*- *Bombus xelajuensis* basado en un concepto unificado de especie propuesto por Queiroz (2007). A este tipo de propuesta se le denomina como un estudio taxonómico integral según Schlick-Steiner *et al.* (2010).

3. Antecedentes

3.1 Taxonomía y su importancia

La taxonomía es la ciencia que caracteriza, clasifica y nombra taxones (German National Academy of Sciences Leopoldina, 2014, p. 6; Schlick-Steiner *et al.*, 2010, p. 422). La taxonomía se divide en taxonomía alfa y beta. La taxonomía alfa estudia categorías menores (por ejemplo, especies), mientras que la beta estudia categorías superiores (por ejemplo, familias y órdenes) (Schlick-Steiner *et al.*, 2010, p. 421). La taxonomía alfa es central en la biología ya que muchos campos de esta utilizan las especies como unidades centrales de sus estudios. La necesidad taxonómica se ha incrementado con la crisis biótica de la actualidad, tanto para ayudar a programas de conservación como para la documentación de la biodiversidad antes de perderse (Schlick-Steiner *et al.*, 2010, p. 421).

La importancia de la correcta identificación y descripción de especies, permite el desarrollo de estudios detallados sobre la diversidad de sus poblaciones, a escalas bioquímica, genética y ecológica (Costello, May & Stork, 2013, p. 413), lo que contribuye a los planes de conservación de la biodiversidad actual y futura (Duennes, 2010, p. 2). Es importante entonces definir, cuáles son los conceptos de especie en el cual la taxonomía se ha basado y cuál es el concepto utilizado en este trabajo.

3.2 Concepto de especie

El concepto biológico de especie es de suma importancia, ya que es una de las unidades fundamentales de la taxonomía (*e.g.* Queiroz, 2007; Schlick-Steiner *et al.*, 2010). Sin embargo, existen diferentes conceptos de especie propuestos por los científicos. Estos pueden ser conceptos filogenéticos, ecológicos, evolutivos, biogeográficos y una mezcla de varias definiciones que son hasta cierto punto incompatibles y confusas (*e.g.* Brower, 2002, p.8), lo que genera que se puedan obtener diferentes conclusiones a partir de ellos (Queiroz, 2007, p.879) y que existan por estas razones más de 20 definiciones de especie (Schlick-Steiner *et al.*, 2010, p. 422).

Queiroz (2007), propone una definición de especie basada en linajes de metapoblaciones evolucionando separadamente y la considera como un concepto básico unificador. Esto quiere decir que los conceptos de especie propuestos por diferentes científicos pueden ser utilizados sin que entren en conflicto, ya que dependerán del nivel que el taxónomo esté estudiando un organismo y en el cual esté basado su hipótesis de trabajo.

Por lo tanto, mientras más herramientas (*e.g.* morfometría, genética, ecología) utilice un estudio taxonómico, este proporcionará mejores conclusiones y fortalecerá la hipótesis del trabajo (Schlick-Steiner *et al.*, 2010, p. 4). Esto posteriormente contribuirá a las iniciativas de conservación que se basen en información más completa de una especie (Gonzales, Griswold & Engel, 2013, p. 650). Asimismo, estos estudios deben de tener una interpretación integral teniendo en cuenta el concepto básico unificador (Queiroz, 2007), lo cual será vital para esta investigación.

3.3 Taxonomía integral y su importancia

Estudios con varios enfoques y utilizando varias disciplinas biológicas han sido llamados estudios combinados, multidisciplinarios, multidimensionales, colaborativos o integrativos (Schlick-Steiner *et al.*, 2010, p. 422). Sin embargo, todos estos nombres han sido reemplazados por el de taxonomía integral (Schlick-Steiner *et al.*, 2010, p. 422).

Schlick-Steiner *et al.* (2010) describen las tres razones por las cuales los estudios taxonómicos integrales han tenido auge en los últimos años: la primera razón es que

muchos métodos basados solo en morfología fallan en poder delimitar especies. La segunda razón es que, aunque la morfología si puede en varios casos delimitar especies, otros enfoques pueden ayudar y acelerar el proceso. La tercera razón es que el uso de varias disciplinas ayuda a la taxonomía a ir más allá de solo nombrar especies y ayuda a comprender los procesos que las han moldeado.

Además, los usos de este enfoque tienen varias ventajas; el dejar de utilizar solo una fuente de evidencia taxonómica y apoyarse en más disciplinas permite que la calidad y cantidad de información que se puede obtener a partir de datos morfológicos, genéticos y de otras disciplinas sea más completa (Gonzalez, Griswold & Engel, 2013, p. 650; Meier, 2008, p. 118-119).

Esto no quiere decir que la taxonomía clásica sea reemplazada, sino que reduce la cantidad y tiempo invertido en visitar un conflicto taxonómico **una y otra vez** (Schlick-Steiner *et al.*, 2010, p. 422). Por lo tanto, se puede realizar una investigación de delimitación de especies que, coordinándose con diferentes disciplinas, trabajen en resolver un problema desde varios ángulos, lo que permite tener hipótesis taxonómicas más robustas y esto a su vez ayuda a tener inventarios biológicos de mejor calidad (Schlick-Steiner, *et al.*, 2010, p. 422). Por lo tanto, se revisarán brevemente las herramientas a utilizar para el presente estudio integral y la teoría subyacente.

3.4 Herramientas en el estudio integral

3.4.1 Estudios morfométricos

El análisis de la forma es importante en diferentes estudios biológicos. Una variedad de procesos biológicos produce diferencias en la forma entre individuos y sus partes. Algunos factores que explican estas variaciones pueden ser: enfermedades o golpes, desarrollo ontogénico, adaptación local a factores geográficos, o diversificación evolutiva en un período de tiempo extenso (Zelditch, Swiderski, Sheets & Fink, 2004, p. 1).

La morfometría es una herramienta cuantitativa que analiza y compara matemáticamente diferentes formas de las estructuras en los organismos. Esto

permite analizar estadísticamente la forma y diferencia de las estructuras estudiadas, para posteriormente ilustrar y explicar la variación en la forma de las mismas (Gelsvartas, s.f., p. 1; Zelditch, *et al.*, 2004, p. 1-2).

3.4.1.1 Morfometría tradicional

La morfometría tradicional mide las distancias lineares (tales como largo, ancho y alto) de un organismo. Estas medidas se utilizan junto a estadística multivariada para describir patrones de variación en la forma dentro y en el conjunto de grupos. La ventaja de este método es su simplicidad, pero el mayor problema es que usualmente las distancias lineares están correlacionadas con el tamaño de los individuos y esto hace que el análisis de la forma se complique (alometría). Otro problema es que las medidas tomadas de dos formas diferentes (*e.g.* dos alas de diferentes especies de abejas) podrían producir resultados iguales si los datos no incluyen la localización de donde fueron tomadas las medidas (*e.g.* punto A en una ala y punto K en otra) con respecto a las demás (*e.g.* punto F, OR, E ver Figura 3) (Gelsvartas, s.f., p. 1; Zelditch, *et al.*, 2004, p. 5).

3.4.1.2 Morfometría geométrica

La morfometría geométrica en cambio utiliza un conjunto de puntos de referencia (“landmarks”) para describir la forma (Gelsvartas, s.f., p. 1; MacLeod, 2001, p. 2; Zelditch, *et al.*, 2004, p. 11). A diferencia de la geometría tradicional, la ventaja de utilizar la morfometría geométrica radica en que esta permite obtener y analizar información sobre la localización espacial de la variación morfológica (magnitud, posición y extensión espacial del organismo) (Zelditch, *et al.*, 2004, p. 8). La morfometría geométrica permite utilizar análisis que separan las variaciones en la posición, orientación y escala entre los especímenes, lo que es necesario para poder realizar más análisis en la forma de los especímenes (Zelditch, *et al.*, 2004).

3.4.2 Estudios genéticos

En general, los análisis genéticos utilizados a nivel mundial para construcción de filogenias y delimitación de especies, incluyen varias técnicas moleculares y citológicas (*e.g.* microsatélites, ADN nuclear, ADN mitocondrial, cariotipos). Uno de los marcadores moleculares que ha tenido éxito en la delimitación de especies es el basado en ADN-mitocondrial citocromo oxidasa I, (COI) (Meier, 2008, p. 108; Waugh,

2007, p. 190). Este ha demostrado ser efectivo en la identificación de especies y además ha permitido identificar grupos que han tenido problemas con la taxonomía clásica (Leliaert, *et al.*, 2014; Sheffield, Hebert, Kevan & Packer, 2009), por lo cual se le ha denominado el código de barras de la vida, al menos para animales.

Aunque las herramientas moleculares han sido utilizadas con bastante éxito para delimitar especies, Lecocq, *et al.*, (2015) señalaron los problemas que se presentan al solo utilizar este único criterio: a) Las secuencias de ADN que se analizan son escogidas arbitrariamente. b) Los procesos de especiación no siempre están caracterizados por la acumulación de muchas diferencias genéticas, mientras que poblaciones con-específicas pueden demostrar alta divergencia genética. c) El aislamiento reproductivo puede suceder más rápidamente que la diferenciación en los marcadores genéticos.

3.4.3 Estudios de divergencia de nicho ecológico

El nicho es un concepto en ecología y evolución que tiene varias propuestas sobre su concepto, Wiens & Graham (2005) introducen en su texto el más utilizado actualmente, propuesto por Hutchinson en 1957: el nicho es un conjunto de condiciones bióticas y abióticas en donde una especie tiene la capacidad de persistir y mantener poblaciones con un tamaño estable.

Es importante destacar, que existe una diferencia entre el llamado nicho fundamental y el nicho realizado. El primero describe las condiciones abióticas (*e.g.* humedad, temperatura, salinidad) en donde una especie persiste mientras que el segundo se refiere a las condiciones en donde una especie persiste dado la presencia de otras especies (por ejemplo, predadores y/o competidores) (Wiens & Graham, 2005, p. 519).

Muchos aspectos del nicho fundamental pueden ser conservados durante una escala geológica de tiempo (Wiens, *et al.*, 2010, p. 1311). La tendencia de las especies a retener estos aspectos de su nicho fundamental en el tiempo se le denomina conservadurismo de nicho (Wiens & Graham, 2005, 519). La importancia del conservadurismo de nicho en los procesos de especiación está relacionada con eventos alopátricos, es decir el surgimiento de nuevos linajes a partir de la separación

de una especie ancestral en distintas poblaciones aisladas debido a barreras geográficas (Wiens & Graham, 2005, p. 521).

El estudio pionero para comenzar a evaluar esta hipótesis fue el de Peterson, *et al.* (1999). En este estudio utilizaron 3 grupos diferentes de organismos (mariposas, aves y mamíferos), siendo el Istmo de Tehuantepec la barrera geográfica que los separa. Este estudio evidenció las similitudes climáticas del nicho en el espacio para los 3 grupos a ambos lados del Istmo de Tehuantepec. A partir de esta evidencia, se han realizado más estudios tratando esta hipótesis en otros grupos taxonómicos (*e.g.* urracas (Aves: Corvidae) McCormack, Zellmer & Knowles, 2010; armadillos (Mammalia: Dasypodidae) Arteaga, McCormack, Eguiarte & Medellín, 2011) donde se discuten las bases teóricas de esta hipótesis (Wiens & Graham, 2005, p. 520; Peterson, 2011).

3.5 Estudios sobre abejas y declives poblacionales

Existen más de 20,000 especies de abejas en el mundo (Michener, 2007, p. 67), muchas de ellas son polinizadores vitales tanto de plantas nativas como de plantas cultivadas (Potts, Biesmeijer, Kremen, Neumann, Schweiger & Kunin, 2010, p. 345). Asimismo, las abejas en la región Mesoamericana tienen un importante significado histórico y antropológico (Ayala, Gonzalez & Engel, 2013, p. 135).

A pesar de ser tan importantes como polinizadores, las abejas presentan dos problemas biológicos importantes. El primero es la existencia de varios conflictos taxonómicos a nivel de especie, ya que muchas de las especies fueron descritas por antiguos taxónomos que utilizaban lentes de mano o estereomicroscopios con óptica limitada. Ellos se basaban únicamente en caracteres morfológicos (diferencias en color o tamaño) y revisaban solo uno o unos cuantos especímenes (Gonzalez, Griswold & Engel, 2013, p. 646). El segundo es que, en las últimas décadas, se ha visto un declive en las poblaciones de abejas a nivel mundial. Algunas razones que pueden explicar este declive son las actividades antropogénicas tales como la fragmentación del hábitat, los pesticidas, la contaminación ambiental, la expansión de monocultivos, el contagio de patógenos, la introducción de especies no nativas y el cambio climático, entre otras (Dirzo, *et al.*, 2014; Goulson, 2010;

Goulson, 2003; Herrera, Ploquin, Rodríguez-Pérez & Obeso, 2014; Kerr, Pindar, Galpern, Packer, Potts, Roberts, Rasmont, Schweiger, Colla, Richardson, Wagner, Gall, Sikes & Pantoja, 2015; Kirilenko & Hanley, 2007; Potts, *et al.*, 2010; Williams & Osborne, 2009).

Los declives poblacionales en diferentes especies de abejas han arrojado datos desalentadores, tal es el caso de 4 especies de abejorros en Norteamérica que han tenido un declive en su abundancia relativa hasta en un 96% (Cameron *et al.*, 2011, p. 662). Estudios más recientes, han demostrado que varias especies de abejorros en esta región presentan categorías de vulnerable y en peligro crítico según los criterios de la Unión Internacional para la Conservación (UICN) (Hatfield *et al.*, 2015) basados en contracciones de sus rangos geográficos históricos en contraposición con los actuales. Estos estudios han hecho énfasis en que es necesario tener mejor información taxonómica y más acceso a la información sobre abejas, para, posteriormente poder implementar estrategias de conservación para estos importantes polinizadores (Gonzalez, Griswold & Engel, 2013, p.650).

Asimismo, estudios recientes sobre el efecto del cambio climático sobre los abejorros, realizados por Rasmont *et al.* (2015) y por Kerr *et al.* (2015), demuestran que los abejorros en Europa y América del Norte fallan en adaptarse a los cambios climáticos, lo que podría causar amplias reducciones en su distribución geográfica y podrían tener baja o nula dispersión hacia áreas más favorables en el futuro. Eso podría ser también el caso en la región mesoamericana, ya que son importantes polinizadores en áreas naturales y agrícolas (Hatfield, Jepsen, Mader, Black & Shepherd, 2012, p. 4).

3.6 Estudios taxonómicos del género *Bombus* Latreille en la región

Según Labougle (1990), los estudios que habían existido en la región hasta esa fecha, incluían aspectos taxonómicos de abejorros de México y Centroamérica propuestos por varios autores (Cockerell, Fox, Franklin, Friese, Frison, Peters, Schwarz) durante finales del siglo XIX y mediados del siglo XX. Labougle (1990) se propuso revisar el estado taxonómico de los abejorros de la región mesoamericana y generar una clave taxonómica para identificarlos. Este estudio fue el punto base para posteriores estudios sobre abejorros en diferentes países de la región.

En Guatemala, Enríquez, Yurrita, Ayala, Marroquín & Griswold (2012) publicaron un listado del género *Bombus* de Guatemala, donde listan a 12 especies de abejorros. El estudio más reciente es el de Dardón, Yurrita & Vásquez (2016), que trata sobre un catálogo de abejas del género *Bombus* de Guatemala y en el cual reportan 13 especies de abejorros para el país.

3.6.1 El problema taxonómico en los abejorros de la región y en el complejo *B. trinominatus* Dalla Torre - *B. xelajuensis* Van Asperen

Actualmente, se han encontrado varias incertidumbres taxonómicas (*e.g.* especies crípticas, nuevas especies) dentro de las distintas especies de abejorros en Mesoamérica. Por ejemplo, dentro del subgénero *Pyrobombus* Dalla Torre, están las especies *B. ephippiatus* Say y *B. wilmattae* Cockerell (Duennes, Lozier, Hines & Cameron, 2012), dentro del sub-género *Cullumanobombus* Vogt, están las especies *B. macgregori* Labougle & Ayala y *B. menchuae* Van Asperen (Van Asperen, 1995; Natural History Museum, 2015) y dentro del sub-género *Thoracobombus* Dalla Torre, hay varios complejos de especies como *B. pensylvanicus* DeGeer y *B. sonorus* Say, así como *B. trinominatus* y *B. xelajuensis* (Van Asperen, 1992; Natural History Museum, 2015).

El abejorro conocido como *Bombus trinominatus* está citado en la literatura como endémico de los altos de Oaxaca (Labougle, 1990, p. 51). El abejorro *Bombus xelajuensis*, fue citado en la literatura como una especie que habita las montañas del altiplano guatemalteco (Van Asperen, 1992, p. 163) y Vásquez, Yurrita & Escobedo (2010, no publicado) adicionaron nuevas localidades en Guatemala (volcanes Tacaná y Tajumulco). En la descripción de la población de *B. trinominatus* del altiplano guatemalteco –a la cual denominó *B. xelajuensis* – Van Asperen (1992) identificó claramente un patrón de coloración diferente en los tergos y el escudo distinto a la población perteneciente de los Altos de Oaxaca. Además, obtuvo separación de los grupos mediante medidas cefálicas (espacio malar, longitud radial, distancia de los ocelos laterales al ojo compuesto).

En colectas del año 2010, se cita a una especie similar a las del complejo *B. trinominatus* - *B. xelajuensis* pero sin poder identificarla claramente (Vásquez, Yurrita & Escobedo, 2010, no publicado). Martínez (2010) encontró un espécimen en el volcán Tajumulco con la posibilidad de que fuera *B. trinominatus*; sin embargo, diferencias morfológicas (como es mencionado por Van Asperen, 1992) generaron en este la duda de si efectivamente ambos abejorros son la misma especie o si son diferentes especies.

Dardón, Yurrita, Landaverde, Vásquez & Escobedo (2015, no publicado), con base en caracteres morfológicos y un análisis de agrupamiento jerárquico con el método de Neighbor-Joining concluyeron que *B. xelajuensis* es válido y diferente a *B. trinominatus*,

3.7 Estudios morfométricos para el género *Bombus*

La variación entre los puntos anatómicos de referencia (*e.g.* puntos de intersección en las venas de las alas de insectos) puede reflejar diferencias entre las especies. Por ejemplo, las longitudes de la venación de las alas son afectadas por un factor poligénico, por lo que un cambio en las frecuencias alélicas debido a la separación geográfica podría manifestarse mediante estas variaciones cuantitativas (Zimmerman, Palsson & Gibson, 2000, p.671).

Para los abejorros, la morfometría geométrica de las alas ha permitido separar taxones bastante cercanos, por lo que puede ser una herramienta útil para la correcta identificación de especímenes que se encuentren cercanamente emparentados o que sean muy parecidos (Owen & Whidden, 2013; Owen, Whidden & Plowright, 2010; Aytekin, Terzo, Rasmont & Çağatay, 2007). Sin embargo, la morfometría geométrica ha sido poco utilizada en la taxonomía de abejorros a pesar de ser muy prometedora (Lecocq, *et al.*, 2015, p.2).

3.8 Estudios genéticos del género *Bombus*

El estudio genético más completo sobre abejorros a nivel mundial es el de Cameron, *et al.* (2007). Ellos utilizaron diferentes marcadores moleculares y 218 especies de *Bombus* para construir la filogenia más completa conocida del grupo. Asimismo, se ha trabajado en la

resolución de los problemas taxonómicos entre los subgéneros de *Bombus* (Williams, *et al.*, 2008) y en América se ha trabajado a nivel de especie para dilucidar la situación taxonómica del complejo *B. ephippiatus*- *B. wilmattae* (Duennes, Lozier, Hines & Cameron, 2012) y *B. brasiliensis* (Santos, Santos & Silveira, 2015).

Un estudio importante de mencionar es el de Williams *et al.* (2012), dirigido especialmente a la resolución de especies crípticas del subgénero *Bombus* (*sensu stricto*) utilizando el marcador molecular COI, la teoría coalescente (GYMC = General Yule-Coalescent Model) y el respectivo análisis filogenético. Este modelo trata de identificar y delimitar especies, utilizando los cambios en las ramificaciones de los árboles que contienen múltiples especies y poblaciones (Monaghan, Wild, Elliot, Fujisawa, Balke, Inward, Lees, Ranaivosolo, Eggleton, Barraclough, & Vogler, 2009, p.299). Los patrones de ramificación dentro de los grupos genéticos reflejan los procesos neutros coalescentes que ocurren dentro de las especies, mientras que las ramificaciones entre los grupos genéticos reflejan el tiempo de los eventos de especiación (Monaghan, *et al.*, 2009, p.299) por eso es importante contar con otras secuencias del clado monofilético preferentemente. En este estudio pudieron reconocer varios grupos que habían sido difíciles de separar solo con taxonomía clásica (Williams, *et al.*, 2012).

Para Guatemala, Dardón, *et al.* (2015, no publicado) utilizaron análisis morfométricos de distintas partes de las especies de abejorros reportadas para Guatemala, así como secuenciación del gen citocromo oxidasa I (COI) para evaluar las relaciones filogenéticas de este grupo con especímenes únicamente de Guatemala (Dardón, Yurrita, Landaverde, Vásquez & Escobedo, 2015, 1- 108). En este trabajo, ellas concluyen que existe evidencia de diferencias en las medidas morfométricas que tomaron para el complejo de especies *B. trinominatus* – *B. xelajuensis*, con lo que separan a ambas especies.

3.9 Estudios biogeográficos del género *Bombus*

Aunque no existen estudios que evalúen el nicho ecológico o el conservadurismo de nicho ecológico (*i.e.* biogeografía ecológica) para los abejorros, si hay trabajos biogeográficos que tienen relación con esta hipótesis (*i.e.* biogeografía histórica). El trabajo de Hines (2008) es el más completo sobre biogeografía histórica, tiempos de divergencia y patrones

de diversificación en *Bombus*. El estudio fue basado en estimaciones genéticas realizadas por Cameron, *et al.* (2007). Asimismo, se tiene un estudio sobre patrones de distribución de abejorros Neotropicales y Andinos (Abrahamovich, Díaz & Morrone, 2004). En este estudio, uno de sus resultados fue la identificación de barreras geográficas para estos organismos en la región, identificando el Istmo de Tehuantepec y Panamá en el norte y Puna en la región Sudamericana (Abrahamovich, Díaz & Morrone, 2004, p. 114-115).

Un trabajo importante para la región Mesoamericana es el de Duennes, *et al.* (2012), en donde se utilizaron microsatélites para obtener información sobre las poblaciones de abejorros de *B. ephippiatus* y *B. wilmattae*. Ellos sugirieron que los procesos tectónicos y las barreras geográficas, como el Istmo de Tehuantepec y la depresión de Nicaragua, han servido para moldear la distribución y divergencia evolutiva en las diferentes poblaciones de estas especies. Estas barreras geográficas mantienen aisladas a las poblaciones, lo que estaría contribuyendo al proceso de especiación y probablemente se propongan nuevas especies a partir de un estudio más completo (Duennes, comunicación personal 2015).

4. Justificación

La delimitación de especies, especialmente de aquellas cercanamente emparentadas es impráctica cuando se utilizan únicamente caracteres morfológicos discretos (Bickford, Lohman, Sodhi, Ng, Meier, Winker, Ingram & Das, 2006, p. 151). Además, los trabajos en donde se utiliza una sola herramienta tienden a presentar problemas prácticos y de interpretación biológica (*e.g.* morfometría en el grupo *Bombus lapidarius* de Lecocq, *et al.* (2015); DNA-Barcoding y la importancia de no solo depender de estos análisis discutidos en Meier (2008)).

Por lo tanto, los conflictos taxonómicos, del género *Bombus* en Mesoamérica pueden ser abordados, obteniendo resultados más completos utilizando un estudio taxonómico integral, basado en diferentes herramientas que se ha demostrado que permiten dilucidar especies y complejos de especies. Este estudio utilizó este enfoque para tratar de resolver el conflicto taxonómico en el complejo *B. trinominatus* - *B. xelajuensis*.

La resolución de este conflicto, puede contribuir directamente a iniciativas que promuevan el conocimiento y la conservación de tan importantes insectos (Gonzalez, Griswold & Engel, 2013). Además, puede ser un estudio ejemplo para poder resolver conflictos taxonómicos en otros grupos importantes que necesitan ser urgentemente estudiados en la región y en el país.

5. Objetivos

5.1 OBJETIVO GENERAL

5.1.1 Evaluar el complejo de especies *Bombus trinominatus* y *Bombus xelajuensis* de Mesoamérica bajo un enfoque taxonómico integral para la resolución del estado taxonómico.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1 Determinar si el patrón en puntos anatómicos de referencia de las alas (puntos de las uniones de las venas longitudinales y transversales) diferencia a las especies *Bombus trinominatus* y *Bombus xelajuensis*.

5.2.2 Establecer la relación filogenética de las poblaciones del complejo de especies *Bombus trinominatus* - *Bombus xelajuensis* a lo largo de su distribución utilizando el marcador COI y un análisis filogenético.

5.2.3 Contrastar el grado de conservadurismo/divergencia de nicho ecológico entre los linajes que se identifiquen en el complejo de especies *Bombus trinominatus* - *Bombus xelajuensis*.

6. Hipótesis

Debido a que el Istmo de Tehuantepec actúa como barrera a la dispersión para el complejo *Bombus trinominatus*- *Bombus xelajuensis*, existen 2 linajes, uno al oeste del Istmo y otro al este, los cuales se diferencian en tres distintos niveles biológicos: filogenético, morfológico y de nicho ecológico, dependiendo del tiempo transcurrido desde su separación.

A partir de esto los escenarios son los siguientes:

- Si la separación es reciente, solo se diferenciarán genéticamente.

- Si la separación no es reciente, se diferenciarán en al menos 2 niveles: filogenético y morfológico o en los 3 niveles propuestos.

Y por lo tanto:

- El linaje que se forme al oeste del Istmo de Tehuantepec abarcará especímenes de los estados de Guerrero, Oaxaca, Tlaxcala y Veracruz.
- El linaje que se forme al este del Istmo de Tehuantepec abarcará especímenes del estado de Chiapas y de los departamentos de Huehuetenango, San Marcos, Totonicapán y Quetzaltenango.

7. Materiales y Métodos

7.1 Colecta de datos

7.1.1 Sitio de estudio

La Zona de Transición Mexicana comprende la zona de solapamiento entre las faunas Neártica y Neotropical, la cual se extiende desde el sur y suroeste de los Estados Unidos hasta las tierras bajas del sur de Nicaragua (Halffter, Llorente-Busquets & Morrone, 2008, p. 69). Una parte de esta región, denominada como Tierras Altas de Mesoamérica, está comprendida entre el istmo de Tehuantepec en México y la depresión de Nicaragua (Sullivan, Arellano, & Rogers, 2000, p.756). Esta región presenta una relación biológica compleja, gracias a su topografía y a la historia biogeográfica que involucran eventos de intercambio biológico y diversificación *in situ* por los cambios climáticos y geológicos (Halffter, *et al.*, 2008, p.69; Leon-Paniagua, Navarro-Sigüenza, Hernández-Baños, & Morales, 2007, p. 653).

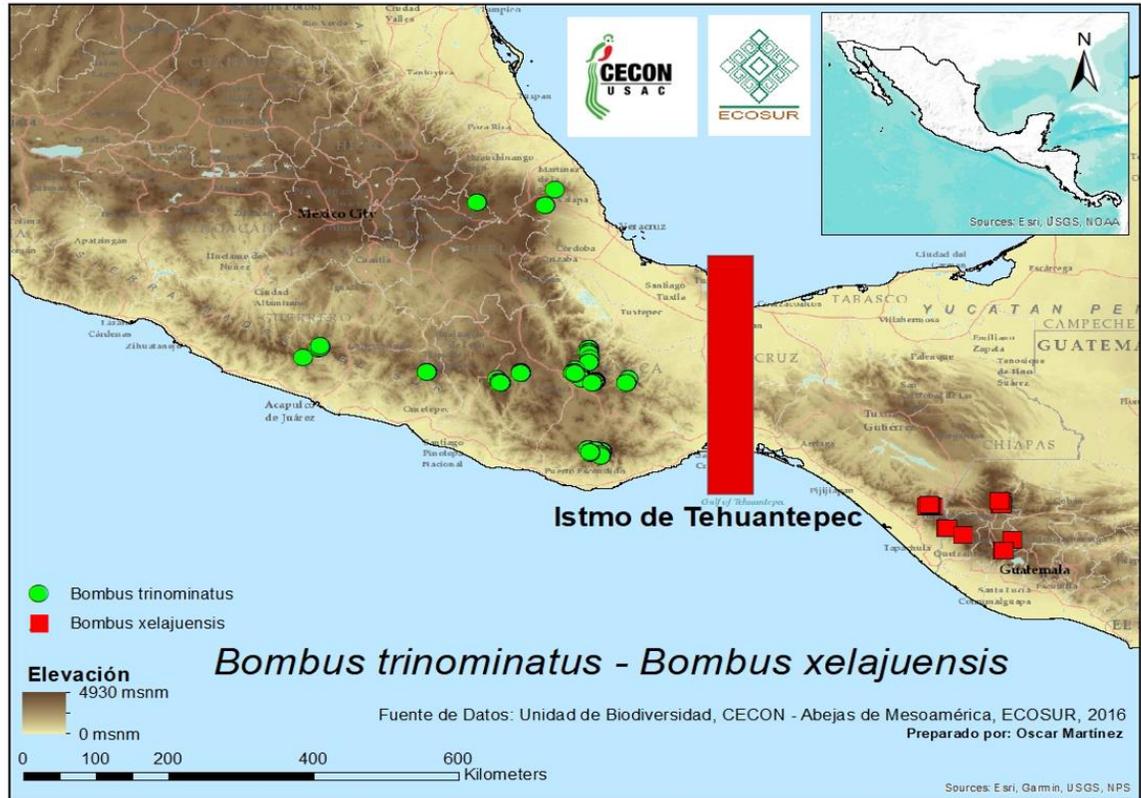


Figura 1. Distribución de abejorros conocidos como *B. trinominatus* (complejo *B. trinominatus* – *B. xelajuensis*) en Mesoamérica

7.1.2 Especímenes

Las poblaciones de abejorros conocidos como *B. trinominatus*– *B. xelajuensis*, se extienden hacia el este y el oeste del Istmo de Tehuantepec de acuerdo al material de las colecciones de ECOSUR y CECON (**Figura 1**). Para el análisis morfológico y genético, se utilizaron especímenes que fueron colectados en las temporadas 2010, 2013 en Guatemala y 2013 – 2014 en México, empleando redes entomológicas. Los individuos colectados en Guatemala se encuentran depositados en la Colección de Abejas Nativas de Guatemala (CANG), Centro de Estudios Conservacionistas, CECON, Guatemala y los individuos mexicanos en la colección (ECOAB) de la Unidad de Ecosur, San Cristóbal de las Casas, México, presentando en ambas colecciones códigos únicos.

Para el modelaje de nicho ecológico, se utilizaron todos los especímenes que fueron revisados y determinados por parte de los taxónomos de Ecosur, los cuales provenían de diferentes colecciones a nivel mundial (American Museum of Natural

History, British Museum of Natural History, California Academy of Sciences, Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, National Museum of Natural History, Natural History Museum of Los Angeles, Snow Entomological Museum, ECOAB, CANG, colección privada de Van Asperen), para poder tener la base de datos más completa sobre el complejo de especies.

7.1.3 Medición de puntos anatómicos de la venación de las alas de los especímenes
Para el análisis morfométrico se utilizaron 30 organismos identificados por el autor y los taxónomos de Ecosur como *Bombus trinominatus*, colectados en las montañas de Oaxaca, Guerrero, Veracruz y Tlaxcala en México. Asimismo, se utilizaron 30 organismos identificados como *Bombus xelajuensis* por el autor y taxónomos de Ecosur, colectados en el altiplano guatemalteco (**Anexos Cuadro 5**). Para ambas especies se usaron solo obreras ya que es el material que más se tiene disponible. El corte, montaje de alas y posterior pegado de alas de vuelta al espécimen, así como las mediciones en el estereomicroscopio fueron realizados en el laboratorio de ECOAB. Se utilizó un estereomicroscopio Leica M205C y Cámara Leica MC170HD con regla milimétrica para tomar las fotos de las alas. El estereomicroscopio fue calibrado de la siguiente manera para todas las fotos: El ocular del estereomicroscopio (0.5X), objetivo (1X), magnificación (1X). El programa para tomar las fotos (Leica Application Suite ver 3.0) tenía las siguientes características: Brillo 40%, Ganancia 2.2X, Gamma 0.60, Saturación 150.00. Los puntos utilizados fueron los propuestos por Owen, Whidden & Plowright (2010) (**Figura 2**).

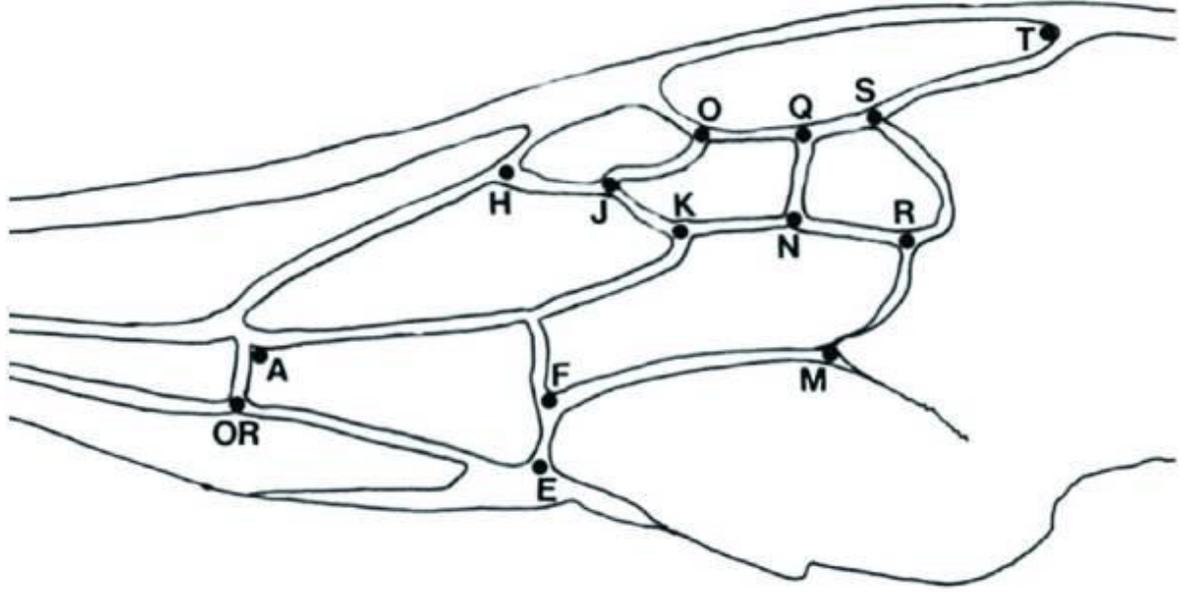


Figura 2. Puntos propuestos por Owen, Whidden y Plowright (2010).

7.1.4 Extracción y amplificación

Para el análisis genético se utilizó la subunidad 1, del marcador de ADN-mitocondrial citocromo oxidasa c (COI). Los primers que utilizan los nodos del Centro Canadiense de Código de Barras para este tipo de estudios fueron los desarrollados por Hebert, Penton, Burns, Janzen & Hallwachs (2004) que constan de 648 pares de bases: “forward” (LEP-F1) 5'-ATTCAACCAATCATAAAGATAT-3' y “reverse” (LEP-R1) 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAA-3'. El protocolo de extracción y amplificación que utilizan en el Centro Canadiense de Código de Barras está debidamente detallado en Ivanova, deWaard & Hebert (2006) para extracción y purificación de ADN e Ivanova & Grainger (2006) para la amplificación utilizando el primer anteriormente mencionado. Estos protocolos son utilizados y se pueden consultar en el sitio web del Centro Canadiense de Código de Barras ADN (<http://ccdb.ca/>). Con esto se tuvieron las secuencias crudas del gen COI para su posterior limpieza, edición manual, uso y análisis.

Se enviaron a secuenciar 22 individuos que representaban la distribución geográfica y localidades que se tenían del complejo de especies: Huehuetenango, San Marcos, Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Tlaxcala y Veracruz (**Anexos Cuadro 6**). Las muestras de los abejorros tomadas del primer par de patas, fueron enviadas a

secuenciar al laboratorio de extracción, amplificación y secuenciación de ADN de la Unidad de Ecosur en Chetumal, Quintana Roo, siendo este uno de ellos nodos del Centro Canadiense de Código de Barras.

7.1.5 Modelado de nicho ecológico

Para contrastar el grado de divergencia del nicho ecológico, se utilizaron 675 especímenes con coordenadas geográficas corroboradas por el autor, estos son todos los datos disponibles que existen de presencia de los abejorros *B. trinominatus* y *B. xelajuensis* para la región. Estos datos provienen de diferentes colecciones y están concentrados en la base de datos de ECOAB de Ecosur. Se detallará el procedimiento en la sección de análisis de datos.

7.2 Análisis de datos

7.2.1 Morfometría Geométrica

Para crear y analizar los puntos en la venación de las alas se utilizó el programa CLIC (Morphometrics in Medical Entomology – Collection of Landmarks for Identification and characterization, J- Dujardin ver 98-06). Posteriormente se hicieron los análisis geométricos siguientes: análisis de procrustes: método más utilizado para superponer las imágenes y calcular el centroide (promedio de valores entre las coordenadas de “x” y “y” de los puntos tomados de las imágenes); siendo la base para los análisis geométricos posteriores. Análisis de Componentes Principales (ACP) llamados también “Warp scores”: se buscan los patrones de diferenciación en la forma (en este caso de los patrones en la venación) para encontrar diferencias significativas entre el complejo de especies y Análisis Discriminante: técnica multivariada que busca analizar si existen diferencias significativas entre grupos de objetos respecto a las variables que se miden. Todos estos análisis fueron realizados en Morpho J (An integrated software package for geometric morphometrics, Klingenberg, C, 2001).

7.2.2 Filogenia

Se utilizaron las secuencias editadas manualmente y alineadas de ADN mitocondrial (COI) (algoritmo ClustalW) en el programa BioEdit (Hall, 2013) de especímenes del complejo de especies *B. trinominatus* - *B. xelajuensis*, así como de al menos 5 especies del mismo clado monofilético, *B. weisi* Friese, *B. fervidus*

Fabricius, *B. californicus* Smith, *B. diligens* Smith y *B. medius* Cresson recomendado en los estudios realizados por Williams (2012; 2015 comentario personal). Previo a correr el modelo, se reconocieron los haplotipos únicos en Collapse 1.2 (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Collapse.shtml>). Posteriormente, se realizaron los análisis filogenéticos bayesianos utilizando el programa BEAST (Drummond, Suchard, Xie & Rambaut, 2012) a partir del mejor modelo de sustitución nucleotídica utilizando el programa jModelTest ver 2.1.10 (Darriba, Taboada, Doallo, & Posada, 2012; Guindon & Gascuel, 2003) el cual fue GTR+G bajo el criterio de información bayesiano (BIC), frecuencia de bases “estimada”, Modelo de heterogeneidad: gamma, Partición de codones en posiciones (1+2)3, con un modelo de reloj “log-normal” relajado y un ritmo de 1.0. Se corrieron 1 mil 500 millones de generaciones muestreando cada 150 mil veces para generar 10,000 árboles de consenso en BEAST. Después se visualizaron los árboles con las mejores probabilidades posteriores en el programa FigTree (Rambaut, 2012) y se editaron para visualizar como resultados en el programa Inkscape 0.92 (<https://inkscape.org/es/>). Posteriormente, se analizaron los árboles filogenéticos utilizando la teoría coalescente y el análisis de la misma con el Modelo Generalizado Yule y Coalescencia (GMYC por sus siglas en inglés, Fujisawa & Barraclough, 2013) en R ver 3.5.3 (R Core Team, 2019). Este método, además de estar diseñado para utilizar información de un solo locus, clasifica las ramas de los árboles filogenéticos como intra o interespecíficos maximizando la probabilidad de un modelo, basado en un constante ritmo de especiación y también de no extinción. (Talavera, Dincă & Vila, 2013, p. 1-2). Los resultados de cada paso de estos procedimientos se encuentran anexados en formato digital de la tesis.

7.2.3 Divergencia de nicho ecológico

Se generó un modelo de distribución potencial a través del algoritmo de máxima entropía utilizando el programa MaxEnt (Phillips, Anderson & Schapire, 2006), basado en la información del árbol filogenético y los grupos morfométricos (unidades taxonómicas operacionales). Para realizar este modelo, se utilizaron puntos de colecta georreferenciados y los datos climáticos (WorldClim) asociados a estos puntos (Cuadro 1) (Hijimans, Cameron, Parra, Jones, & Jarvis, 2005).

Para delimitar las variables climáticas que se utilizaron en el modelo, se realizó un análisis de correlación de Pearson de las variables climáticas empleando el programa PAST (Hammer, Harper & Ryan, 2001) y se eliminaron las variables altamente correlacionadas ($r > 0.80$) y se seleccionaron aquellas que fueron relevantes para la interpretación biológica del conjunto de especies (Peterson, 2011).

Cuadro 1. Variables climáticas de WorldClim

Variable	Descripción
Bio 1	Temperatura promedio anual
Bio 2	Promedio Anual del Rango Diurno
Bio 3	Isotermalidad
Bio 4	Temperatura en las estaciones (Desviación Estándar)
Bio 5	Máxima temperatura del mes más caluroso
Bio 6	Mínima temperatura del mes más frío
Bio 7	Rango de temperatura anual
Bio 8	Promedio de temperatura del mes más húmedo
Bio 9	Promedio de temperatura del cuatrimestre más seco
Bio 10	Promedio de temperatura del cuatrimestre más húmedo
Bio 11	Promedio de temperatura del cuatrimestre más frío
Bio 12	Precipitación anual
Bio 13	Precipitación del mes más húmedo
Bio 14	Precipitación del mes más seco
Bio 15	Precipitación en las estaciones (coeficiente de variación)
Bio 16	Precipitación del cuatrimestre más húmedo
Bio 17	Precipitación del cuatrimestre más seco
Bio 18	Precipitación del cuatrimestre más caluroso
Bio 19	Precipitación del cuatrimestre más frío

* Disponible en: <https://www.worldclim.org/bioclim>

Para poner a prueba la hipótesis de conservadurismo de nicho, se utilizó el método propuesto por McCormack, Zellmer & Knowles (2010) y corroborado por otros resultados (Arteaga, McCormack, Eguiarte & Medellín, 2011). Para realizar

este método, se extrajeron los datos crudos de los puntos de ocurrencia que se tenían del complejo de especies *B. trinominatus* – *B. xelajuensis*. Posteriormente se generaron al azar predicciones de fondo (que están basados en los lugares de ocurrencia generados en los modelajes de nicho ecológico), en los lugares de ocurrencia de estos especímenes. Luego, se extrajo esta información en un Análisis de Componentes Principales, evaluando la diferencia entre las medias de cada linaje en cada eje con respecto a la diferencia en la media de cada linaje generado con las predicciones al azar de fondo para los mismos ejes. Asimismo, se generó una distribución nula recalculando la divergencia de fondo utilizando un análisis de jackknife con reemplazo. Se rechazó la hipótesis nula con un nivel de confianza de alpha de 0.05. Estos análisis se realizaron utilizando los programas siguientes: R versión 3.5.3 (R Core Team, 2016) y ArcGIS versión 10.5 (ESRI, 2016).

8. Resultados

En el Análisis de Componentes Principales (PCA) para las alas de los abejorros *B. trinominatus* (color verde) y *B. xelajuensis* (color rojo) (**Figura 3**) separa dos grupos, basados en los componentes principales 1 y 2, los cuales suman en total un 44% de la variación encontrada.

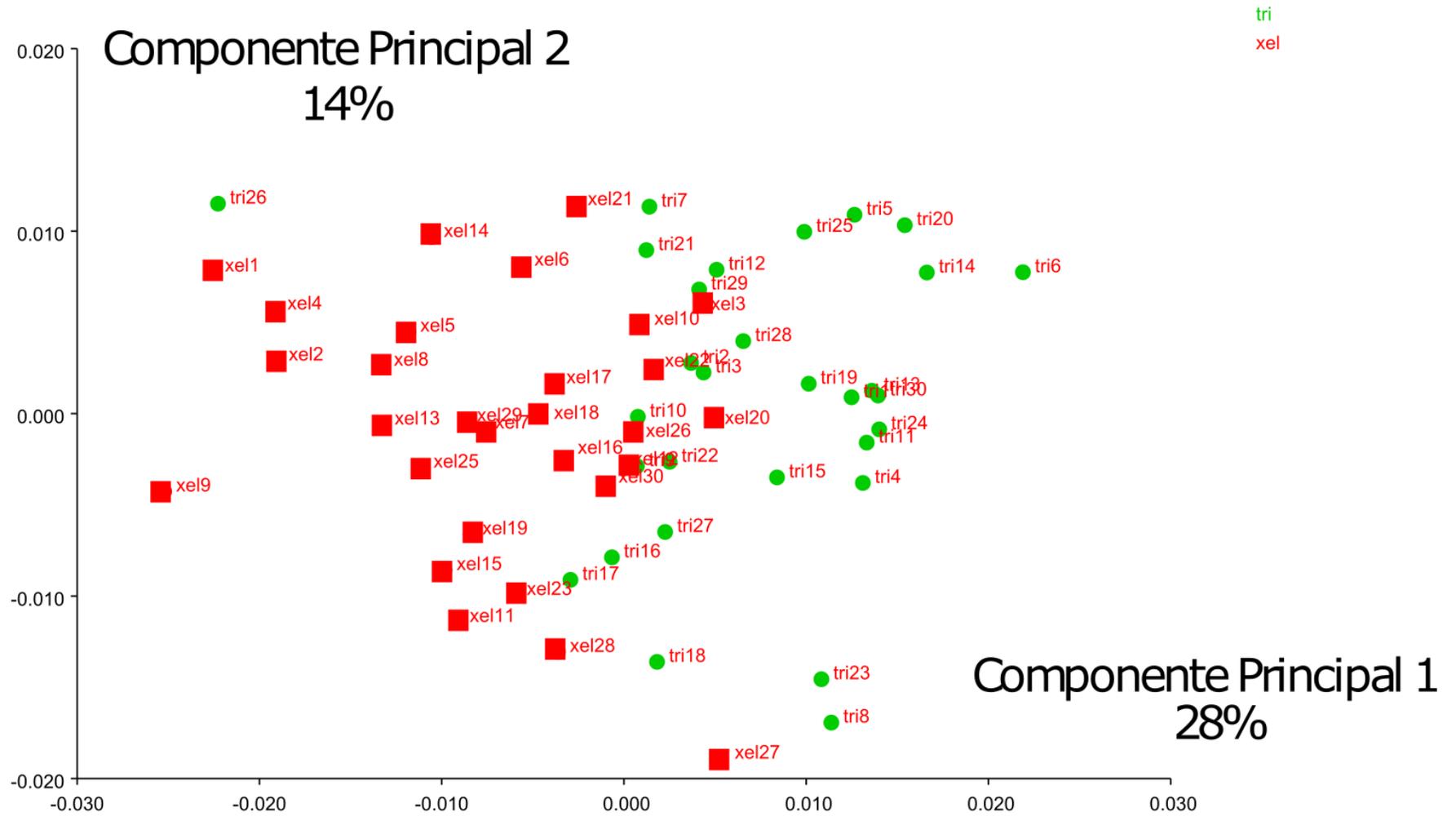


Figura 3. Análisis de Componentes Principales (PCA) de las alas de los abejorros *B. trinominatus* y *B. xelajuensis*

El análisis de grupos (Función discriminante) se realizó para ver la capacidad del análisis para distinguir a los especímenes y asignarlos a un grupo en específico (**Cuadro 2**), así como una validación cruzada (“cross-validation”) entre grupos (**Cuadro 3**). El análisis se realizó con 10,000 permutaciones en Morpho J.

Cuadro 2. Función discriminante para cada grupo de abejorros

Grupo	Grupo 1 (círculos verdes)	Grupo 2 (cuadrados rojos)	% de predicción
<i>Bombus trinominatus</i> *	30	0	100%
<i>Bombus xelajuensis</i> *	1	29	97%

*Estadísticamente significativo $p < 0.0001$

Cuadro 3. Función discriminante por validación cruzada entre grupos

Grupo	Grupo 1 (círculos verdes)	Grupo 2 (cuadrados rojos)	% de predicción
<i>Bombus trinominatus</i> *	26	4	87%
<i>Bombus xelajuensis</i> *	4	26	87%

*Estadísticamente significativo $p < 0.0001$

Basado en el análisis discriminante (Cuadro 2), se puede observar que en un 100% de los casos, el análisis basado en la morfometría de las alas, efectivamente puede distinguir un espécimen como *B. trinominatus*; y en el 97% de los casos a un espécimen como *B. xelajuensis*. Es decir, cada espécimen se asigna basado en sus características morfométricas a un grupo de similares características.

Cuando se realiza una validación cruzada entre grupos (Cuadro 3), en un 87% de los casos, fueron asignados correctamente a la especie correspondiente. Esto quiere decir, que cada espécimen se asignaba a un grupo establecido (*B. trinominatus* o *B. xelajuensis*) basado en sus características morfométricas similares, cuando se analizaban a todos los especímenes al mismo tiempo.

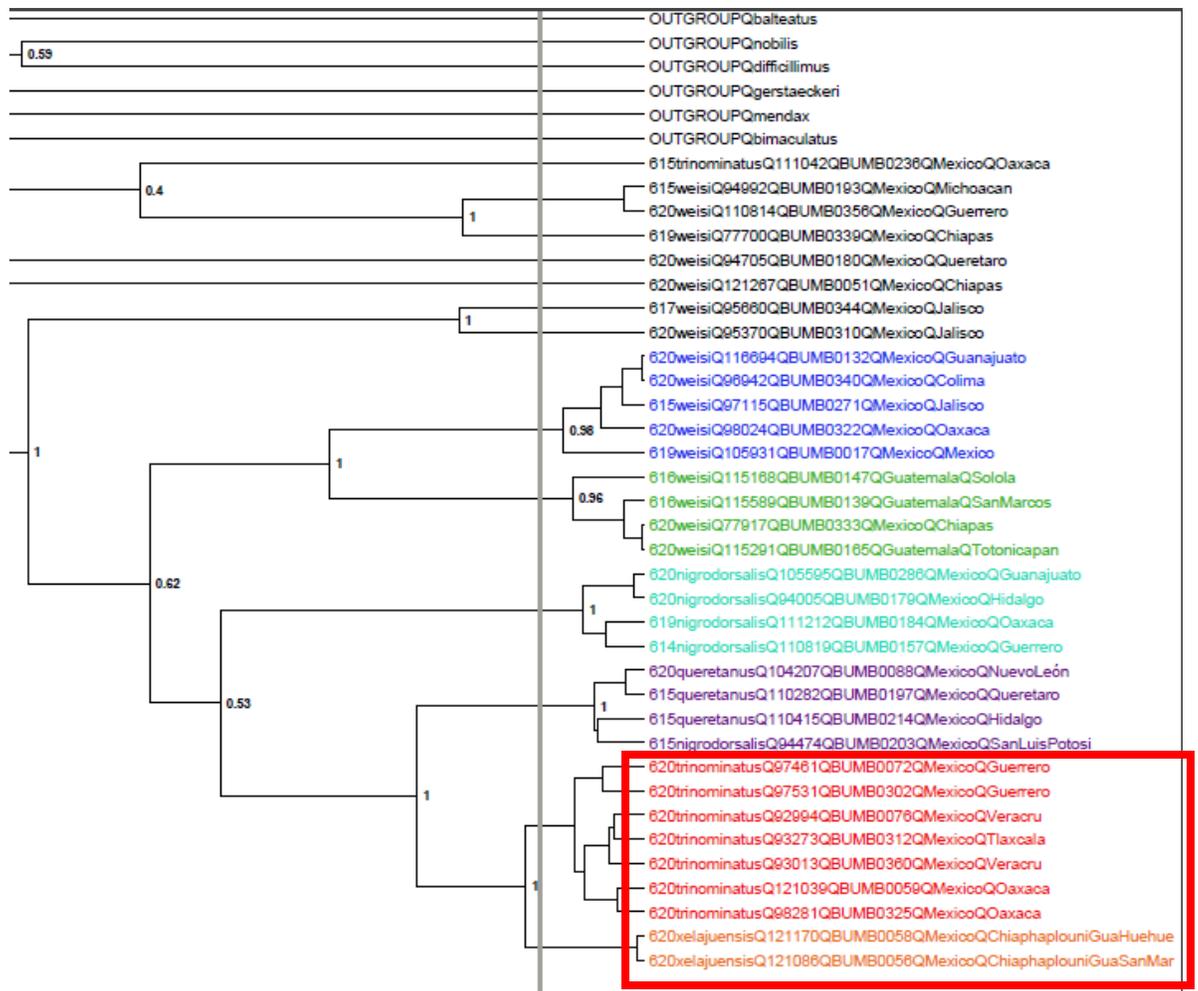


Figura 4. Árbol filogenético bayesiano basado en secuencias (COI) clasificado con GMYC

Se puede observar en el árbol filogenético bayesiano clasificado utilizando el análisis de GMYC los distintos linajes para las diferentes especies utilizadas en este análisis, así como el número de pares de bases utilizados al inicio de cada linaje (e.g. 620 pares de bases para *B. trinominatus* y *B. xelajuensis*). El complejo de especies *B. trinominatus* (color rojo) y *B. xelajuensis* (color naranja) se separan y quedan como especies hermanas cercanamente emparentadas. El linaje de *B. trinominatus* está formado por abejorros de los estados de Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Tlaxcala. El linaje de *B. xelajuensis* está formado por abejorros de Chiapas, San Marcos y Huehuetenango.

Cuadro 4. Valores del Análisis de componentes principales de las variables ambientales recuperados para cada eje

Variable	Descripción	Eje1	Eje2	Eje3
Bio 2	Promedio Anual del Rango Diurno	0.832*	-0.153	0.371
Bio 3	Isotermalidad	-0.355	-0.700	0.547*
Bio 4	Temperatura en las estaciones (Desviación Estándar)	0.779*	0.531	-0.151
Bio 5	Máxima temperatura del mes más caliente	0.649	0.233	0.564*
Bio 12	Precipitación anual	-0.681*	0.541	0.412
Bio 14	Precipitación del mes más seco	-0.394	0.806*	0.205

*variables con mayor % de contribución en cada eje

En el cuadro 4, se observan las variables ambientales seleccionadas para el presente estudio. Estas variables fueron escogidas a partir de la correlación que existía entre las 19 variables ($r > 0.8$) y de su importancia biológica. Se escogieron los primeros 3 ejes para realizar el análisis de divergencia de nicho y conservadurismo ya que en conjunto explican el 87.63% de la variación del Análisis de componentes principales (Figura X).

Las variables que tienen mayor peso en el **eje 1** (41.2%) son: Bio 2, Bio 4 y Bio 12. Para el **eje 2** (29.9%) es Bio 14 y para el **eje 3** (16.5%) son: Bio 3 y Bio 5.

Cuadro 5. Prueba de divergencia de nicho y conservadurismo

	Eje1	Eje2	Eje3
Diferencia observada	0.00000966*C	0.00000371*C	0.00000163*C
Distribución nula	0.0000629 – 0.257	0.000181 - 0.249	0.0000222 – 0.152
Porcentaje de la varianza explicada (%)	41.200	29.900	16.500

*Nivel de significancia $p < 0.05$ con prueba de Wilcoxon signed rank test

C = conservado, D = divergente

En el cuadro 5, se puede observar la prueba de divergencia de nicho y conservadurismo realizada para cada eje. Los valores en negrita corresponden a la diferencia promedio en la distribución de los abejorros *B. trinominatus* y *B. xelajuensis* en el espacio ambiental. La distribución nula corresponde al rango entre el valor menor y mayor de la distribución del espacio ambiental calculado a partir de las diferencias entre los 1000 puntos al azar para cada especie. Basado en la interpretación de McCormack, *et al.* (2010), si el valor

encontrado en la diferencia observada entre una especie y otra es menor a la distribución nula, para el eje 1 existe conservadurismo de nicho (representado como C).

9. Discusión

El uso de diferentes herramientas para resolver problemas taxonómicos ayuda a evitar problemas que surgen a través del uso de una sola herramienta, añade además rigor en la delimitación de especies (Schlick-Steiner, *et al.*, 2010, p.435) y nos da una perspectiva de los procesos de especiación (Fujita, Leaché, Burbrink, McGuire & Moritz, 2012, p. 486). Para este estudio integral, el análisis de tres herramientas para delimitar el complejo de especies *B. trinominatus* y *B. xelajuensis* nos da una perspectiva de los posibles procesos evolutivos y ecológicos que sucedieron y que probablemente siguen sucediendo para estas especies. Los resultados obtenidos sustentan la hipótesis propuesta por Van Asperen de que *B. xelajuensis* es una especie diferente a *B. trinominatus*, así como la hipótesis de este estudio. Se discutirán los resultados en los siguientes apartados basados en los objetivos propuestos para esta investigación.

Morfometría de alas del complejo *Bombus trinominatus* - *Bombus xelajuensis*

La morfología de los insectos está influenciada por aspectos genéticos y ambientales, la variación en esta puede proveer información relevante que permita la clasificación de especies (Araña, 2014, p. 2-3). Aún si el tamaño del cuerpo, incluido el tamaño de las alas es altamente variable entre individuos de la misma especie, la forma de las alas parece ser más estable (Araña, 2014, p.5). Si sumamos esto a restricciones filogenéticas y de desarrollo fisiológico, se esperaría que las variaciones encontradas en las alas sean entre cada organismo de su misma especie, y este argumento es usado como base para la clasificación taxonómica basado en este carácter (citando a Sturtevant (1942) por Araña, 2014, p.5). Por lo tanto, los resultados basados en el análisis de componentes principales y en el análisis discriminante indican que existe una diferencia significativa entre los patrones de venación de las alas de los abejorros de *B. trinominatus* respecto a los abejorros reconocidos como *B. xelajuensis*. Estos resultados podrían deberse a las diferencias en el desarrollo fisiológico y genético de ambas especies.

Las diferencias en los especímenes de *B. trinominatus* y *B. xelajuensis* en la clasificación basado en la venación ocurre en un 87% de las veces utilizando la función discriminante por validación cruzada entre grupos. En el estudio de *B. occidentalis* Greene y *B. terricola* Kirby realizado por Owen & Whidden en 2013 se reporta una clasificación del 85% en el análisis discriminante ($p < 0.001$) por lo que, sumado a otras líneas de evidencia ellos separaron estas especies. Otro estudio reciente ha encontrado diferencias morfométricas en las alas de abejorros de una especie de la región (*B. ephippiatus*) de Mesoamérica (Duennes, Petranek, Diez de Bonilla, Mérida-Rivas, Martínez-López, Sagot, Vandame & Cameron, 2016). Este estudio confirma que los abejorros al oeste del Istmo de Tehuantepec son diferentes de los especímenes al este del Istmo. Esto apoya la diferencia morfométrica encontrada en el presente estudio y en otro complejo de especies de abejorros en la región, separados por esta barrera geográfica.

Relación filogenética del complejo de especies *Bombus trinominatus* - *Bombus xelajuensis*

Basado en el marcador COI, fue posible establecer las relaciones filogenéticas del complejo de especies *B. trinominatus* – *B. xelajuensis*. Basado en el modelo GYMC se clasificaron dos linajes diferentes. El primer linaje pertenece a la especie reconocida como *B. trinominatus* utilizando especímenes que se distribuyen en las montañas de la Sierra Madre del Sur en los estados de Guerrero, Veracruz, Tlaxcala y Oaxaca. El segundo linaje pertenece a la especie clasificada por Van Asperen como *B. xelajuensis* utilizando especímenes que se distribuyen en las montañas de la Sierra Madre de Chiapas y las montañas del altiplano guatemalteco en San Marcos y Huehuetenango. En la página de Natural History Museum (2019), basado en las secuencias de COI se indica que *B. xelajuensis* es probablemente una especie diferente a *B. trinominatus*.

Grado de conservadurismo/divergencia de nicho ecológico en el complejo de especies *Bombus trinominatus* - *Bombus xelajuensis*

Basado en los dos linajes que se identificaron y, en los análisis de divergencia y conservadurismo de nicho, se puede discutir que todos los ejes están conservados: **eje 1** (41.2%), **eje 2** (29.9%) y **eje 3** (16.5%). Los procesos de especiación, especialmente de especies cercanamente emparentadas, han demostrado que estas tienden a conservar las

características de su nicho ecológico durante grandes períodos de tiempo (Peterson, 2011, p. 825), lo que apoyaría que este linaje está compuesto de especies cercanamente emparentadas.

Las variables que tienen mayor peso en el **eje 1** son Bio 2, 4 y 12. Esto indica que estas variables son las que estas especies posiblemente comparten mayor similitud en los espacios que ocupan en su nicho ecológico (Jiménez & Ornelas, 2016, p. 25; Wiens, Ackerly, Allen, Anacker, Buckley, Cornell, Damschen, Davies, Grytnes, Harrison, Hawkins, Holt, McCain & Stephens, 2013, p. 1311). Las variables Bio 2 y 4 están asociadas a la temperatura y como esta puede afectar a las especies (O'Donnell & Ignizio, 2012, p. 5). La variable Bio 12 está asociada a la importancia del recurso hídrico en la distribución de las especies (O'Donnell & Ignizio, 2012, p. 7). La variable que tiene mayor peso en el **eje 2** es Bio 14. Esta variable es útil si las condiciones de precipitación extrema durante el año influyen en el rango potencial de distribución de una especie (O'Donnell & Ignizio, 2012, p. 8). En el **eje 3** las variables que tienen mayor peso son Bio 3 y Bio 5. La variable Bio 3 está asociada a qué tanto las temperaturas del día y la noche oscilan con respecto a las oscilaciones de verano e invierno (O'Donnell & Ignizio, 2012, p. 5). La variable Bio 5 puede ser útil cuando la distribución de una especie es afectada por anomalías en la temperatura durante el año (O'Donnell & Ignizio, 2012, p. 6).

No existen estudios sobre los efectos de las variables bioclimáticas a grandes escalas en los abejorros y abejas en general. Sin embargo, en un estudio en el que evaluaban la importancia de la distribución de abejorros en Europa, los autores definían la temperatura y el gradiente de humedad como factores importantes para limitar la distribución de las especies de abejorros (Williams, Araújo & Rasmont, 2007, p.500). Kerr, *et al.*, (2015) observó que los abejorros tienen problemas para adaptarse a diferentes temperaturas que no estén en su óptimo, lo que nos hace dudar que los abejorros de ambas especies puedan desplazarse y establecerse a través del Istmo de Tehuantepec, el cual es una depresión que separa las montañas de Oaxaca con las de Chiapas y presenta vegetación y clima distinto (Goodwin, 1969, p. 13-14; Gutiérrez-García & Vázquez-Domínguez, p.313). Esto nos hace pensar que tenemos dos linajes diferentes en ambos lados de esta barrera. ¿Cómo explicaríamos entonces esta aseveración?

En muchos casos, la separación geográfica puede estar asociada con un conservadurismo de nicho (Wiens & Graham, 2005, p.521). Barreras geográficas que separan especies (especiación alopátrica) pueden causar este efecto, ya que estos lugares no tendrían las condiciones óptimas para mantener un continuo flujo génico, lo que causaría que poblaciones en ambos lados de la barrera se aislaran. Esto fue demostrado por Peterson *et al.* (1999) para mamíferos, aves y mariposas en cada lado del Istmo de Tehuantepec. El estudio de Duennes *et al.* (2016) también señala que el Istmo de Tehuantepec es una barrera geográfica importante para los abejorros, el cual estaría sirviendo como barrera que separaría a las especies del complejo de *B. ephippiatus* al oeste y este del Istmo.

10. Conclusiones

A partir de los tres análisis y evocando una respuesta integral, se tiene evidencia de que el complejo de especies *B. trinominatus* – *B. xelajuensis* son 2 linajes diferentes. Por lo tanto, se tiene evidencia en los tres análisis que los abejorros que se encuentran del lado oeste del Istmo de Tehuantepec son reconocidos como *B. trinominatus* Dalla Torre, 1890 y del lado este se pueden reconocer como *B. xelajuensis* Van Asperen, 1992.

Los tres análisis realizados en esta tesis tienen diferentes grados de dificultad y estos deben de estar acompañados de un conocimiento sólido de las relaciones evolutivas y los procesos biogeográficos que causan la separación de los linajes. La morfometría dio un criterio de separación de especies de hasta un 87% de confiabilidad, lo que demuestra que este criterio es útil para ser utilizado para la separación de estas especies.

Basado en la filogenia si existe evidencia de una separación de las especies *B. trinominatus* y *B. xelajuensis* basado en el ADN mitocondrial (COI). El análisis de conservadurismo de nicho ecológico demuestra que existe conservadurismo en los nichos ecológicos de estas especies. Esto indicaría que son especies cercanamente emparentadas. Probablemente la barrera conocida como Istmo de Tehuantepec, sea la causa de la posible separación de estas especies, ya que no ofrece las condiciones de las variables ambientales encontradas (y conservadas) para que pueda existir un continuo flujo génico entre este complejo.

A partir del uso de tres herramientas, es importante notar que todas dan un resultado en el cual separan a ambas especies. Este punto es importante ya que le da más robustez a la hipótesis de que este complejo de especies en realidad son dos especies diferentes. Las implicaciones que esto tiene en otros campos de la biología podrían ser importantes, especialmente en criterios de conservación donde se solo se utilizan especies válidas para hacer clasificaciones de riesgo de extinción. Este informe provee información que tendrá que ser tomada en cuenta, cuando se reevalúe el estado de conservación de la especie *B. trinominatus* y se incluya como una especie distinta a *B. xelajuensis*.

11. Recomendaciones

Para entender completamente el proceso en el que se encuentra el complejo de especies *B. trinominatus* – *B. xelajuensis*, se recomienda incluir en el análisis filogenético otro gen mitocondrial y al menos 2 genes nucleares. Esto podría fortalecer la evidencia para sustentar la hipótesis de especies distintas.

Es importante que se reevalúe el estado de conservación de ambas especies por la Unión Internacional para la Conservación (UICN) en Mesoamérica, ya que deberá de ser replanteado la distribución de cada especie en estos análisis.

12. Referencias

- Abrahamovich, A., Díaz, N., & Morrone, J. (2004). Distributional patterns of the Neotropical and andean species of the genus *Bombus* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 20(1): 99-117
- Araña, R. (2014). Geometric morphometric analysis of individual variation in bumblebee wings. *International Journal of Ecology and Conservation*, 11: 1-15
- Arteaga, M., McCormack, J., Eguiarte, L., & Medellín, R. (2011). Genetic admixture in multidimensional environmental space: asymmetrical niche similarity promotes gene flow in armadillos (*Dasybus novemcinctus*). *Evolution*, 65(9): 2470-2480
- Ayala, R., Gonzalez, V., & Engel, M. (2013). Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): Diversity, distribution, and indigenous knowledge. Capítulo 9. En: Pot-honey a legacy of stingless bees. New York, USA: Springer
- Aytekin, A., Terzo, M., Rasmont, P., & Çağatay, N. (2007). Landmark based geometric morphometric analysis of wing shape in *Sibiricobombus* Vogt (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille). *Annales de la Société entomologique de France*, 43(1): 95-102
- Beyer, H. (2016). Geospatial modelling environment. Disponible en: www.spataleecology.com/gme

- Bickford, D., Lohman, D., Sodhi, N., Ng, P., Meier, R., Winker, K., Ingram, K., Das, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 22(3): 148-155
- Brower, A. (2002). Cladistics, populations and species in a geographical space: the case of *Heliconius* butterflies. Capítulo 1. En: *Molecular Systematics and Evolution: Theory and practice*. Switzerland: Birkhäuser Basel
- Bumblebee Specialist Group (BBSG). (2014). Annual report. Disponible en: <http://www.xerces.org/wp-content/uploads/2015/03/2014-bbsg-annual-report.pdf>
- Cameron, S., Hines, H., & Williams, P. (2007). A comprehensive phylogeny of the bumblebees (*Bombus*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 91(1): 161-188
- Cameron, S., Lozier, J., Strange, J., Koch, J., Cordes, N., Solter, L., & Griswold, T. (2011). Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2): 662-667
- Costello, M., May, R., & Stork, N. (2013). Can we name Earth's species before they go extinct? *Science*, 339(6118): 413-416
- Dardón, M., Yurrita, C., & Vásquez, M. (2016). Catálogo de las abejas del género *Bombus* Latreille, 1802 (Hymenoptera: Apoidea: Apidae) de Guatemala. *Revista científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 26(1): 9-19
- Dardón, M., Yurrita, C., Landaverde, P., Vásquez, M., & Escobedo, N. (2015). Evaluación e implementación en Guatemala del código de barras de la vida para resolver conflictos taxonómicos en abejorros (*Bombus*). Proyecto Fodecyt No. 032-2012: 1 - 108
- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.
- Dirzo, R., Young, H., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, J., & Collen B. (2014). Defaunation in the Anthropocene. *Science*, 345(6195): 401-406
- Drummond, A., Suchard, M., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973
- Duennes, M. (2010). Phylogeny and color pattern evolution in a New World bumble bee (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*: *Pyrobombus*) species complex. Master Thesis, Urbana, Illinois.
- Duennes, M., Lozier, J., Hines, H. & Cameron, S. (2012). Geographical patterns of genetic divergence in the widespread Mesoamerican bumble bee *Bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(1): 219–231.
- Duennes, M., Petranek, C., Diez de Bonilla, E., Mérida-Rivas, J., Martínez-López, O., Sagot, P., Vandame, Rémy., & Cameron, S. (2016). Population genetics and geometric morphometrics of the *Bombus ephippiatus* species complex with implications for its use as a comercial pollinator. *Conservation Genetics*: 1-20
- Dujardin, J. (2015). Morphometrics in medical entomology – collection of landmarks for identification and characterization. Disponible en: <http://mome-clic.com/>
- Enríquez, E., Yurrita, C., Ayala, R., Marroquin, A., & Griswold, T. (2012). Diversidad de abejas silvestres (Hymenoptera: Apoidea) de Guatemala. En: Cano, E., & Schuster, J. Biodiversidad de Guatemala Volumen 2. Guatemala, Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala.
- ESRI, (2016). ArcGIS 10.5 for Desktop. Disponible en: <http://www.esri.com/software/arcgis>

- Fujita, M., Leaché, A., Burbrink, F., McGuire, J., & Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 27(9): 480-488
- German National Academy of Sciences Leopoldina. (2014). Challenges and opportunities of integrative taxonomy for research and society – taxonomic research in the era of OMICS technologies. *Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldine e.V. National Akademie der Wissenschaften (German National Academy of Sciences)*, Halle/Saale: 1-54. Disponible en:
http://www.leopoldina.org/uploads/tx_leopublication/2014_Stellungnahme_Taxonomie_EN_final_01.pdf
- Gelsvartas, J. (s.f.). Geometric morphometrics. Disponible en:
http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/CVonline/LOCAL_COPIES/AV0910/gelsvartas.pdf
- Gonzalez, V., Griswold, T., & Engel, M. (2013). Obtaining a better taxonomic understanding of native bees: Where do we start? *Systematic Entomology*, 38: 645-653
- Goodwin, G. (1969). Mammals from the state of Oaxaca, Mexico, in the American Museum of Natural History. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 141(1): 1 - 314
- Goulson, D. (2003). Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 34: 1-26
- Goulson, D., & Darvill, B. (2008). Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology*, 53: 191-208
- Goulson, D. (2010). Impacts of non-native bumblebees in Western Europe and North America. *Applied Entomology and Zoology*, 45(1): 7-12
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704
- Gutiérrez-García, T., & Vázquez-Domínguez, E. (2012). Consensus between genes and stones in the biogeographic and evolutionary history of Central America. *Quaternary Research*, 79(3): 311-324
- Gutiérrez, E., Maldonado, J., Radosavljevic, A., Molinari, J., Patterson, B., Martínez-C J., Rutter, A., Hawkins, M., Garcia, F., & Helgen, K. (2015). The taxonomic status of *Mazama bricenii* and the significance of the Táchira Depression for mammalian endemism in the Cordillera de Mérida, Venezuela. *PLoS One* 10(6): 1-24
- Halffter, G., Llorente-Bousquets, J., & Morrone, J. (2008). La perspectiva biogeográfica histórica. En: Capital Natural de México vol I: Conocimiento actual de la Biodiversidad. México: Conabio.
- Hall, T. (2013). BioEdit v7.2.5. *Ibis Biosciences*. Disponible en:
<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>
- Hammer, Ø., Harper, D., & Ryan, P. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electrónica*, (4)1: 1-9
- Hatfield, R., Colla, S., Jepsen, S., Richardson, L., Thorp, R., & Foltz, S. (2015). IUCN assessments for North American *Bombus* spp. *The Xerces Society*: 1-56
- Hatfield, R., Jepsen, S., Mader, E., Black, S., & Shepherd, M. (2012). Conserving bumble bees: Guidelines for creating and managing habitat for America's declining pollinators. *The Xerces Society for Invertebrate Conservation*. Portland, Oregon, USA.

- Hebert, P., Penton, E., Burns, J., Janzen, D., & Hallwachs, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41): 14812-14817
- Herrera, J., Ploquin, E., Rodríguez-Pérez, J., & Obeso, J. (2014). Determining habitat suitability for bumblebees in a mountain system: a baseline approach for testing the impact of climate change on the occurrence and abundance of species. *Journal of Biogeography*, 41(4): 700-712
- Hijmans, R., Cameron, S., Parra, J., Jones, & Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25(15): 1965-1978
- Hines, H. (2008). Historical biogeography, divergence times, and diversification patterns of bumble bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Society of systematic biologists*, 57(1): 58-75
- Hutchinson, E. (1957). Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 22: 415-422
- Ivanova, N., & Grainger, C. (2006). Protocols: COI Amplification. *Canadian Centre for DNA Barcoding*. Disponible en: <http://www.dnabarcoding.ca>
- Ivanova, N., deWaard J., & Hebert, P. (2006). Protocols: Glass fiber plate DNA extraction. *Canadian Centre for DNA Barcoding*. Disponible en: <http://www.dnabarcoding.ca>
- Jiménez, R., & Ornelas, J. (2016). Historical and current introgression in a Mesoamerican hummingbird species complex: a biogeographic perspective. *PeerJ*: 2-36
- Kerr, J., Pindar, A., Galpern, P., Packer, L., Potts, S., Roberts, S., Rasmont, P., Schweiger, O., Colla, S., Richardson, L., Wagner, D., Gall, L., Sikes, D., & Pantoja, A. (2015). Climate change impacts on bumblebees converge across continents. *Science*, 349(6244): 177-180
- Kirilenko, A., & Hanley, R. (2007). Using multiple methods to predict climate change impacts on bumblebees in North America. *Proceedings of the Third IASTED International Conference on Environmental Modelling and Simulation*: 42-47
- Klingenberg, C. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2): 353-357
- Labogue, J. (1990). *Bombus* of México and Central America (Hymenoptera: Apidae). *The University of Kansas Science Bulletin*, 54(3): 35-73
- Lecocq, T., Dellicour, S., Michez, D., Dehon, M., Dewulf, A., De Meulemeester, T., Brasero, N., Valterová, I., Rasplus, J., & Rasmont, P. (2015). Methods for species delimitation in bumblebees (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*): towards an integrative approach. *Zoologica Scripta*, 44(3): 1-17
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López-Bautista, J., Zuccarelo, G., & De Clerck, O. (2014). DNA-based species delimitation in algae. *European Journal of Phycology*, 49(2): 179-196
- León-Paniagua, L., Navarro-Sigüenza, A., Hernández-Baños, B., & Morales, J. (2007). Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 653-664
- Macleod, N. (2001). Landmarks, localization, and the use of morphometrics in phylogenetic analysis. *Fossils, Phylogeny, and Form Topics in Geobiology*, 19: 197-233

- Martínez, O. (2010). Riqueza de especies de abejorros (*Bombus*) en tres pisos altitudinales de los volcanes Tacaná y Tajumulco, San Marcos, Guatemala. *Revista en las Voces* (Boletín estudiantil) 5: 1-15. Descontinuado
- McCormack, J., Zellmer, A., & Knowles, L. (2010). Does niche divergence accompany allopatric divergence in *Aphelocoma* jays as predicted under ecological speciation? Insights from tests with niche models. *Evolution*, 64(5): 1231-1244
- Meier, R. (2008). DNA sequences in taxonomy opportunities and challenges. Capítulo 7. The New Taxonomy. *The Systematics Association Special Volume Series*. London, UK.
- Michener, C. (2007). The bees of the world. (2nd. Ed) United States of America, The Johns Hopkins University Press.
- Monaghan, M., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D., Lees, D., Ranaivosolo, R., Eggleton, P., Barraclough, T., & Vogler, A. (2009). Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology*, 58(3): 298-311
- Moreno-Letelier, A., Ortíz-Medrano, A., & Piñero, D. (2013). Niche divergence versus neutral processes: combined environmental and genetic analyses identify contrasting patterns of differentiation in recently diverged Pine species. *PLoS One* 8(10): 1-10
- Natural History Museum. (2019). *Bombus* bumblebees of the world. Disponible en: <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/bombus/>
- Natural History Museum. (2019). *Bombus trinominatus*. Disponible en: <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/bombus/th.html#trinominatus>
- O'Donnell, M., & Ignizio, D. (2012). Bioclimatic predictors for supporting ecological applications in the conterminous United States. *U.S. Geological Survey Data Series 691*. Estados Unidos.
- Owen, R., & Whidden, T. (2013). Discrimination of the bumble bee species *Bombus occidentalis* Greene and *B. terricola* Kirby by morphometric, colour and RAPD variation. *Zootaxa*, 3608(5): 328-344
- Owen, R. (s.f.). Applications of morphometrics to the Hymenoptera, particularly bumblebee (*Bombus*, *Apidae*). Disponible en: <http://www.intechopen.com>
- Owen, R., Whidden, T., & Plowright, R.C. (2010). Genetic and morphometric evidence for the conspecific status of bumble bees, *Bombus melanopygus* and *Bombus edwardsii*. *Journal of Insect Science*, 10: 1-18
- Owen, R., & Whidden, T. (2013). Discrimination of the bumble bee species *Bombus occidentalis* Greene and *B. terricola* Kirby by morphometric, colour and RAPD variation. *Zootaxa*, 3608(5): 328-344
- Padial, J., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(16): 1-14
- Peterson, A., Soberón, J., & Sánchez-Cordero, V. (1999). Conservatism of ecological niches in Evolutionary Time. *Science*, 285(5431): 1265-1267
- Peterson, A. (2011). Ecological niche conservatism: a time-structured review of evidence. *Journal of Biogeography*, 38: 817-827

- Phillips, S., Anderson, R., & Schapire, R. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190(3-4): 231-259
- Pineda, E., & Vandame, R. (2013). Vulnerabilidad de los abejorros nativos y conservación de especies. En Memorias del VIII Congreso Mesoamericano de Abejas Nativas. Disponible en: <http://www.cinat.una.ac.cr/VIIICongresoMesoamericano/docs/Memoria.pdf>
- Potts, S., Biesmeijer, J., Kremen, C., Neumann, C., Schweiger, O., & Kunin, W. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6): 345-353
- Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6): 879-886
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <https://www.r-project.org/>
- Rambaut, A. (2012). Figtree. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J., & Teslenko, M. (2011). MrBayes version 3.2 Manual: tutorials and model summaries. Disponible en: http://mrbayes.sourceforge.net/mb3.2_manual.pdf
- Santos, J., Santos, F., & Silveira, F. (2015). Hitting and unintended target: Phylogeography of *Bombus brasiliensis* Lepeletier, 1836 and the first new Brazilian Bumblebee species in a century (Hymenoptera: Apidae). *PLoS ONE*, 10(5): 1-21
- Schlick-Steiner, B., Steiner, F., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., & Crozier, R. (2010). Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55: 421-438
- Sheffield, C., Hebert, P., Kevan, P., & Packer, L. (2009). DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera:Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources*, 9(1): 196-207
- Sullivan, J., Arellano, E., & Rogers, D. (2000). Comparative Phylogeography of Mesoamerican Highland Rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *The American Naturalist*, 155(6): 755-768
- 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(12): 1101 - 1110
- Tomochika, F., & Barraclough, T. (2013). Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. *Systematic Biology*: 1-49
- Van Asperen de Boer, J.R.J. (1995). *Bombus menchuae* a second species of the subgenus *Dasybombus* from Highland Guatemala. *Entomologische Berichte*, 55(3): 47-50
- Van Asperen de Boer, J. R. J. (1992). *Bombus xelajuensis* – a new species of bumblebee from Guatemala (Hymenoptera: Apidae). *Entomologische Berichte*, 52(11): 162-164
- Vásquez, M., Yurrita, C., & Escobedo, N. (2010). Determinación de la diversidad y distribución de las especies de abejorros (*Bombus*) en las áreas bióticas Chimalteca, Volcánica y Escuintleca en Guatemala. *Proyecto Fodecyt No.013-2009*
- Velthuis, H., & van Doorn, A. (2006). A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37(4):421-451

- Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29(2): 188-197
- Wiens, J. (2004). Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution*, 58(1): 193-197
- Wiens, J., & Graham, C. (2005). Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36: 519-539
- Wiens, J., Ackerly, D., Allen, A., Anacker, B., Buckley, L., Cornell, H., Damschen, E., Davies, T., Grytnes, J., Harrison, S., Hawkins, B., Holt, R., McCain, C., & Stephens, P. (2010). Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecology Letters*, 13: 1310-1324
- Williams, P. (1998). An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Bulletin of The Natural History Museum*, 67(1): 79-152
- Williams, P., Araújo, M., & Rasmont, P. (2007). Can vulnerability among British bumblebee (*Bombus*) species be explained by niche position and breadth? *Biological Conservation* 138(3-4): 493-505
- Williams, P., Cameron, S., Hines, H., Cederberg, B., & Rasmont, P. (2008). A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie*, 39(1): 46-74
- Williams, P., & Osborne, J. (2009). Bumblebee vulnerability and conservation worldwide. *Apidologie*, 40(3): 367-387
- Williams, P., Brown, M., Carolan, J., An, J., Goulson, D., Aytekin, M., Best, L., Byvaltsev, A., Cederberg, B., Dawson, R., Huang, J., Ito, M., Monfared, A., Raina, R., Schmid-Hempel, P., Sheffield, C., Sima, P., Xie, Z. (2012). Unveiling cryptic species of the bumblebee subgenus *Bombus s. str.* worldwide with COI barcodes (Hymenoptera: Apidae). *Systematics and Biodiversity*: 1-36
- Wilson, E. (2003). The encyclopedia of life. *Trends in Ecology and Evolution* 18(2): 77-80
- Zelditch, M., Swiderski, D., Sheets, H., & Fink, W. (2004). Geometric morphometric for biologists: a primer. USA: Elsevier.
- Zimmerman, E., Palsson, A., & Gibson, G. (2000). Quantitative trait loci affecting components of wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics Society of America*, 155(2): 671-683

13. Anexos

Cuadro 6. Prueba de significancia para el análisis discriminante

Valor p	Distancia de Mahalanobis	Grupo 1	Grupo 2
<0.0001	4.219	<i>Bombus trinominatus</i>	<i>Bombus xelajuensis</i>

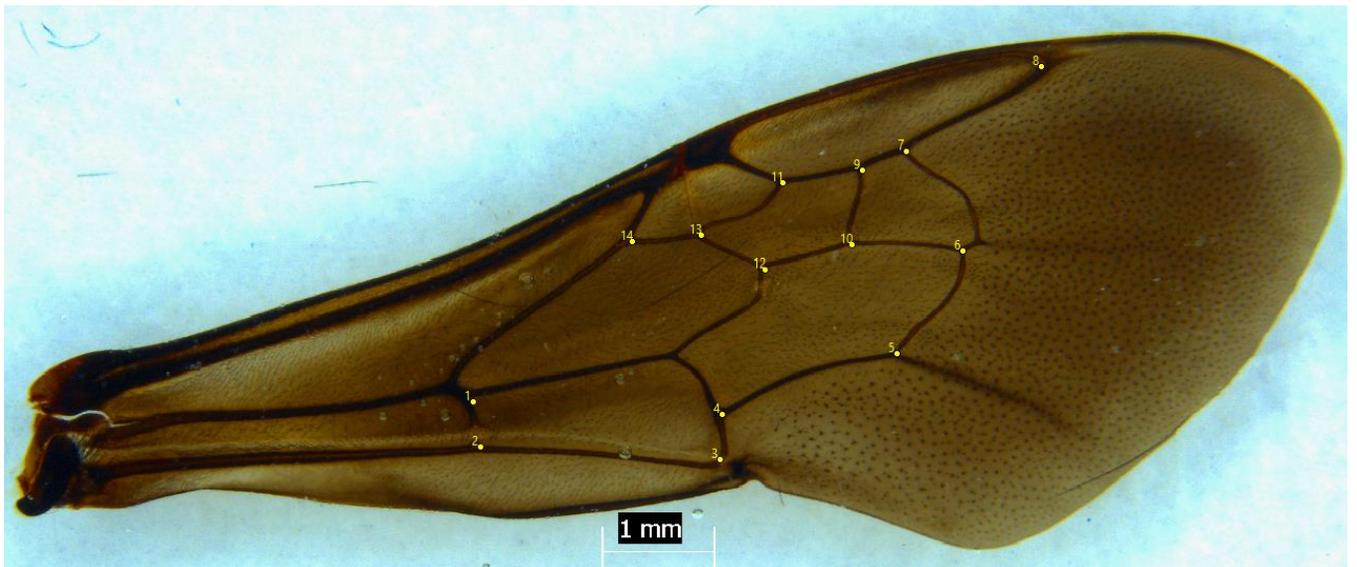


Figura 5. Ejemplo real de toma de puntos con ala de abejorro en el programa CLIC.

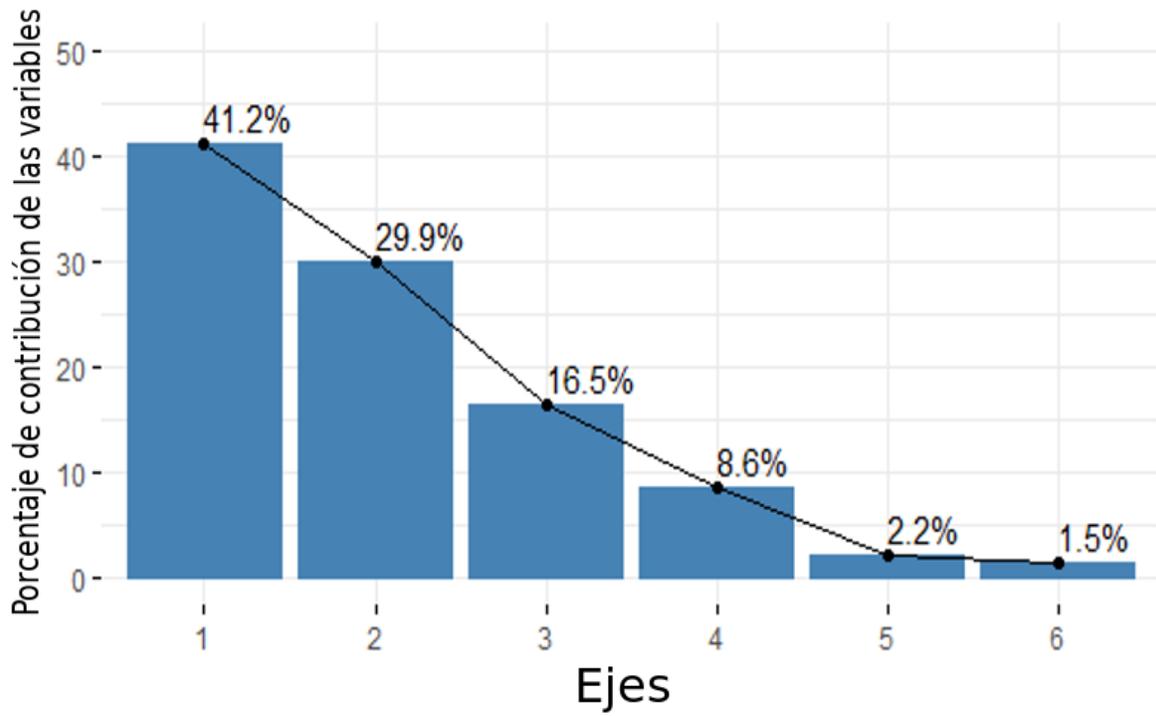


Figura 6. Contribución de las variables para los ejes evaluados en el análisis de divergencia y conservadurismo de nicho

Cuadro 7. Muestras de especímenes tomados para el análisis morfométrico

Código	Institución	Código Análisis Morfometría	País	Departamento/Estado	Municipio	Localidad	Latitud	Longitud
10430	CANG	xel1	Guatemala	San Marcos	Sibinal	La Loma	15.15125	-92.0697
12379	CANG	xel2	Guatemala	San Marcos	Sibinal	La Loma	15.15125	-92.0697
12343	CANG	xel3	Guatemala	San Marcos	Sibinal	La Loma	15.15125	-92.0697
12367	CANG	xel4	Guatemala	San Marcos	Sibinal	Los Pinabetes	15.146083	-92.0758
12366	CANG	xel5	Guatemala	San Marcos	Sibinal	Los Pinabetes	15.146083	-92.0758
12335	CANG	xel6	Guatemala	San Marcos	Sibinal	Los Pinabetes	15.146083	-92.0758
16136	CANG	xel7	Guatemala	San Marcos	Sibinal	La Haciendita	15.151	-92.066
12309	CANG	xel8	Guatemala	San Marcos	Sibinal	La Loma	15.15125	-92.0697
12308	CANG	xel9	Guatemala	San Marcos	Sibinal	La Haciendita	15.142027	-92.0840
9422	CANG	xel10	Guatemala	San Marcos	Sibinal	La Haciendita	15.142027	-92.0840
7599	ECOAB	xel11	Guatemala	Chiapas	El Porvenir	El Porvenir	15.455	-92.305
7610	CANG	xel12	Guatemala	Chiapas	El Porvenir	El Porvenir	15.455	-92.305
7601	CANG	xel13	Guatemala	Chiapas	El Porvenir	El Porvenir	15.455	-92.305
7602	CANG	xel14	Guatemala	Chiapas	El Porvenir	El Porvenir	15.455	-92.305
7603	CANG	xel15	Guatemala	Chiapas	El Porvenir	El Porvenir	15.455	-92.305
9394	CANG	xel16	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Camino a Laguna Magdalena	15.506	-91.416
9396	CANG	xel17	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Separación carretera hacia 7 pinos y Llano Guarchok	15.458	-91.409
9398	CANG	xel18	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Separación carretera hacia 7 pinos y Llano Guarchok	15.458	-91.409
9399	CANG	xel19	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Separación carretera hacia 7 pinos y Llano Guarchok	15.458	-91.409
9400	CANG	xel20	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Separación carretera hacia 7 pinos y Llano	15.458	-91.409

						Guarchok		
9401	CANG	xel21	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Separación carretera hacia 7 pinos y Llano Guarchok	15.458	-91.409
9403	CANG	xel22	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Primer cruce a 7 pinos	15.459	-91.403
9423	CANG	xel23	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Separación carretera hacia 7 pinos y Llano Guarchok	15.458	-91.409
9413	CANG	xel24	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Separación carretera hacia 7 pinos y Llano Guarchok	15.458	-91.409
9404	CANG	xel25	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Primer cruce a 7 pinos	15.459	-91.403
9402	CANG	xel26	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Separación carretera hacia 7 pinos y Llano Guarchok	15.458	-91.409
9414	CANG	xel27	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Separación carretera hacia 7 pinos y Llano Guarchok	15.458	-91.409
9405	CANG	xel28	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Primer cruce a 7 pinos	15.459	-91.403
9407	CANG	xel29	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Primer cruce a 7 pinos	15.459	-91.403
9417	CANG	xel30	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Separación carretera hacia 7 pinos y Llano Guarchok	15.458	-91.409
7814	ECOAB	tri1	México	Oaxaca	San Miguel El Grande	Cerro Yucuninu	17.133	-97.618
7815	ECOAB	tri2	México	Oaxaca	San Miguel El Grande	Cerro Yucuninu	17.133	-97.618
7816	ECOAB	tri3	México	Oaxaca	San Miguel El Grande	Cerro Yucuninu	17.133	-97.618
7817	ECOAB	tri4	México	Oaxaca	San Miguel El Grande	Cerro Yucuninu	17.133	-97.618
7829	ECOAB	tri5	México	Oaxaca	San Juan	Carretera No.175	17.396	-96.509

					Evangelista Analco			
7768	ECOAB	tri6	México	Oaxaca	San Miguel El Grande	Cerro Yucuninu	17.133	-97.618
7769	ECOAB	tri7	México	Oaxaca	San Miguel El Grande	Cerro Yucuninu	17.133	-97.618
7782	ECOAB	tri8	México	Oaxaca	San Sebastián Río Hondo	San Sebastián Río Hondo	16.192	-96.457
7780	ECOAB	tri9	México	Oaxaca	Santiago Tilantongo	Santiago Tilantongo	17.245	-97.355
7779	ECOAB	tri10	México	Oaxaca	San Andrés Paxtlán	San Andrés	16.213	-96.529
7777	ECOAB	tri11	México	Oaxaca	Heroica Ciudad de Tlaxiaco	Capilla del Carrizal	17.169	97.647
7778	ECOAB	tri12	México	Oaxaca	San Andrés Paxtlán	San Andrés	16.213	-96.529
7618	ECOAB	tri13	México	Guerrero	Cochoapa el Grande	Cerro de la Garza	17.256	-98.522
7619	ECOAB	tri14	México	Guerrero	Cochoapa el Grande	Cerro de la Garza	17.256	-98.522
7620	ECOAB	tri15	México	Guerrero	Leonardo Bravo	Carrizal del Bravo	17.587	-99.837
7621	ECOAB	tri16	México	Guerrero	Cochoapa el Grande	Cerro de la Garza	17.256	-98.522
8027	ECOAB	tri17	México	Tlaxcala	Emiliana Zapato	Emiliano Zapata	19.56	-97.898
8028	ECOAB	tri18	México	Tlaxcala	Emiliana Zapato	Emiliano Zapata	19.56	-97.898
10172	ECOAB	tri19	México	Oaxaca	San Miguel Amatlán	al este del pueblo	17.128	-96.446
10173	ECOAB	tri20	México	Oaxaca	San Mateo Río	San José del Pacífico	16.174	-96.492

					Hondo				
10174	ECOAB	tri21	México	Oaxaca	San Pablo Macuiltianguis	Cerro Machin	17.543	-96.515	
10175	ECOAB	tri22	México	Oaxaca	San Miguel Amatlán	Cuajimoloyas	17.121	-96.446	
10176	ECOAB	tri23	México	Oaxaca	San Mateo Río Hondo	San José del Pacífico	16.174	-96.492	
10177	ECOAB	tri24	México	Oaxaca	San Andrés Paxtlán	San Andrés	16.213	-96.529	
10178	ECOAB	tri25	México	Oaxaca	San Miguel Amatlán	Cuajimoloyas	17.121	-96.446	
7836	ECOAB	tri26	México	Oaxaca	San Sebastián Río Hondo	Carretera San Sebastián Río Hondo - Cieneguilla	16.199	-96.437	
7841	ECOAB	tri27	México	Oaxaca	San Sebastián Río Hondo	San Felipe Cieneguilla	16.191	-96.396	
7776	ECOAB	tri28	México	Oaxaca	San Miguel El Grande	Cerro Yucuninu	17.133	-97.618	
7625	ECOAB	tri29	México	Oaxaca	Santiago Tilantongo	Zona Arqueológica Monte Negro	17.262	-97.353	
7620	ECOAB	tri30	México	Guerrero	Leonardo Bravo	Carrizal del Bravo	17.587	-99.837	

Cuadro 8. Muestras de especímenes tomados para el análisis genético

Código	Institución	País	Departamento/ Estado	Municipio	Localidad	Latitud	Longitud
121086	ECOAB	México	Chiapas	El Porvenir	1.1 km Sur El Porvenir	15.45	-92.28
121170	ECOAB	México	Chiapas	El Porvenir	El Porvenir	15.46	-92.3
121039	ECOAB	México	Oaxaca	San Sebastián Río Hondo	Cieneguilla	16.2	-96.36
121048	ECOAB	México	Oaxaca	San Sebastián Río Hondo	Carretera San Sebastián Río Hondo – Cieneguilla	16.2	-96.44
121049	ECOAB	México	Oaxaca	San Sebastián Río Hondo	Carretera San Sebastián Río Hondo – Cieneguilla	16.2	-96.44
121067	ECOAB	México	Oaxaca	San Sebastián Río Hondo	Carretera San Sebastián Río Hondo – Cieneguilla	16.2	-96.44
97461	ECOAB	México	Guerrero	Leonardo Bravo	Carrizal del Bravo	17.59	-99.84
110813	ECOAB	México	Guerrero	Cochoapa El Grande	Cerro de la Garza	17.26	-98.52
92994	ECOAB	México	Veracruz	Acajete	Saucal	19.52	-97.06
110977	ECOAB	México	Oaxaca	Teocuilco de Marcos Pérez	Teocuilco de Marcos Pérez	17.26	-96.7
111102	ECOAB	México	Oaxaca	Totontepec Villa de Morelos	Santa María Huitepec	17.16	-96.02

97933	ECOAB	México	Oaxaca	San Miguel El Grande	Cerro Yucuninu	17.13	-97.62
97430	ECOAB	México	Guerrero	Leonardo Bravo	Puerto Hondo	17.57	-99.86
97531	ECOAB	México	Guerrero	General Heliodoro Castillo	Agua Fría	17.45	-100.06
93271	ECOAB	México	Tlaxcala	Emiliano Zapata	Emiliano Zapata	19.56	-97.9
93273	ECOAB	México	Tlaxcala	Emiliano Zapata	Emiliano Zapata	19.56	-97.9
98281	ECOAB	México	Oaxaca	San Sebastián Río Hondo	San Felipe Cieneguilla	16.19	-96.4
115634/16138	ECOAB/CANG	Guatemala	San Marcos	Sibinal	Carretera hacia la Haciendita	15.15	-92.07
115410/16141	ECOAB/CANG	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Separación carretera hacia 7 pinos y Llano Guarchok	15.46	-91.41
93013	ECOAB	México	Veracruz	Acajete	Saucal	19.52	-97.06
115510/16140	ECOAB/CANG	Guatemala	Huehuetenango	Chiantla	Camino Laguna Magdalena	15.51	-91.42
115635/16139	ECOAB/CANG	Guatemala	San Marcos	Sibinal	Carretera hacia la Haciendita	15.15	-92.07

* Secuencias de COI se encuentran en el archivo thoracotodassecuencias.fas en material electrónico