

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Identificación taxonómica y genética, basada en análisis morfométricos y el marcador mitocondrial COI, de luciérnagas del género *Photinus* (Lampyridae) en Guatemala**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

Claudia María Pérez Archila

para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala

2022



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Identificación taxonómica y genética, basada en análisis morfológicos y el marcador mitocondrial COI, de luciérnagas del género *Photinus* (Lampyridae) en Guatemala**

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

Claudia María Pérez Archila

para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala

2022

## HOJA DE FIRMAS


Vo.Bo.



(f)

**Ana Catalán, PhD**

Tribunal examinador:



(f)

**Ana Catalán, PhD**



(f)

**Alejandra Zamora, PhD**



(f)

**Gabriela Alfaro, MSc**

Fecha de aprobación del examen de graduación: Guatemala, 19 mayo de 2022.

## Prefacio

En la vida, las decisiones que tomamos nos llevan por caminos inesperados, pero que resultan muy gratificantes. Esa fue mi experiencia realizando mi trabajo de graduación. Más que un trabajo, se convirtió en una puerta que me llevó a muchas otras oportunidades y aprendizajes.

Por eso, quiero comenzar agradeciendo a Dios por presentarme esta oportunidad y a personas que han sido guía e inspiración, tanto personal como profesional.

A mis padres por haber sido ese constante apoyo en cada paso que he dado.

A la doctora Ana Catalán, por habernos dado la maravillosa oportunidad de trabajar en un proyecto multidisciplinario en conjunto con la Ludwig-Maximilians Universität-München.

A la doctora Alejandra Zamora, por habernos brindado todas las herramientas y conocimientos en el laboratorio, además de apoyarnos desde el primer día.

A la doctora Viridiana Vega Badillo, cuyo apoyo fue invaluable en la identificación taxonómica de las luciérnagas.

Al doctor Jiichiro Yoshimoto, por tener siempre las puertas abiertas en el Laboratorio de Entomología Sistemática de la Universidad del Valle de Guatemala.

A nuestra directora, Gabriela Alfaro, por estar siempre dispuesta a apoyarnos como estudiantes y profesionales.

Al doctor Schuster, por siempre contagiarnos ese amor y pasión por los insectos.

A Priscila Juárez y Ericka Santos, por apoyarnos desde el Departamento de Biología.

A José Monzón, por apoyarnos en las fotografías de las luciérnagas.

A la doctora Padilla y Juan Carlos Lol, por apoyar en la metodología de *band-stab*.

A mis compañeros de proyecto Adriana Echeverría y Andrés Gutiérrez.

A Sergio Jerez, estudiantes de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC) y a mi familia por su apoyo en la colecta de luciérnagas.

## Índice

Lista de cuadros .....	vii
Lista de figuras.....	viii
Resumen.....	x
Abstract.....	xi
I. Introducción .....	1
II. Antecedentes .....	2
III. Justificación .....	7
IV. Objetivos .....	8
V. Métodos.....	9
VI. Resultados .....	22
VII. Discusión.....	39
VIII. Conclusiones .....	44
IX. Recomendaciones.....	45
X. Bibliografía .....	46
XI. Anexos .....	52

## Lista de cuadros

<i>Cuadro 1. Sitios de colecta e individuos colectados.</i>	9
<i>Cuadro 2. Morfoespecies y colores asignados a cada localidad.</i>	11
<i>Cuadro 3. Secuencias de cebadores.</i>	17
<i>Cuadro 4. Receta de master-mix para el gen COI.</i>	18
<i>Cuadro 5. Condiciones de amplificación para el gen COI.</i>	18
<i>Cuadro 6. Receta de master-mix original del gen wingless.</i>	19
<i>Cuadro 7. Condiciones originales de amplificación del gen wingless.</i>	19
<i>Cuadro 8. Receta del master-mix "stab" para el gen wingless.</i>	20
<i>Cuadro 9. Condiciones de amplificación "stab" para el gen wingless.</i>	20
<i>Cuadro 10. Cuantificación de las extracciones de ADN de luciérnagas del género Photinus.</i>	33
<i>Cuadro 11. Matriz de datos utilizada en los análisis morfométricos en R. Medidas en milímetros (mm).</i>	55
<i>Cuadro 12. Medidas morfométricas de cada antenómero (mm), aumento 64X.</i>	56
<i>Cuadro 13. Medidas morfométricas de cada palpo maxilar (mm), aumento 64X.</i>	57
<i>Cuadro 14. Resumen de estadísticos del set de medidas morfométricas.</i>	59

## Lista de figuras

- Figura 1.** Ciclo de vida de una luciérnaga del género *Photinus*. a) larva bioluminiscente, b) pupa, c) macho adulto, d) hembra adulta, e) huevos, f) aparato lumínico macho y g) aparato lumínico hembra. \_\_\_\_\_ 2
- Figura 2.** Morfología de un adulto lampírido. a) vista dorsal, b) vista ventral, c) cabeza; Oj = ojo, Cl = clípeo, PLb = palpo labial, Mnd = mandíbulas, PMx = palpo maxilar, Fa = fosa antenal, Esc = escapo, di = distancia interocular y ei = espacio interocular. Morfología del edeago: d) vista dorsal, e) vista ventral y f) vista lateral. \_\_\_\_\_ 3
- Figura 3.** Mapa de los sitios de muestreo del estudio. \_\_\_\_\_ 10
- Figura 4.** Diagramas de explicación de medidas morfométricas. \_\_\_\_\_ 14
- Figura 5.** Diagrama de correlación Spearman entre caracteres morfométricos. Las estrellas dentro de los cuadros indican la significancia estadística según el valor p: \* = 0.05, \*\* = 0.01, \*\*\* = 0.001. \_\_\_\_\_ 22
- Figura 6.** Análisis de componentes principales (PCA) de los caracteres morfométricos establecidos (excluyendo los caracteres altamente correlacionados con otros: la longitud\_total y el largo\_ojo). \_\_\_\_\_ 23
- Figura 7.** Dendrograma de las especies de *Photinus* determinadas en este estudio, con base en los caracteres morfométricos establecidos (excluyendo los caracteres altamente correlacionados con otros: la longitud\_total y el largo\_ojo). Cada color representa a cada especie (verde = sp1, anaranjado = sp2, morado = sp3, azul = sp4 y amarillo = sp5). \_\_\_\_\_ 24
- Figura 8.** Vistas dorsales de las cinco especies identificadas en este estudio: A) sp1 especie cercana a *Photinus picticollis*, B) sp2 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, C) sp3 especie cercana a *Photinus cinctellus*, D) sp4 especie cercana *Photinus pulchellus* o *P. affinis* a y E) sp5 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*. \_\_\_\_\_ 29
- Figura 9.** Vistas ventrales de las cinco especies identificadas en este estudio: A) sp1 especie cercana a *Photinus picticollis*, B) sp2 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, C) sp3 especie cercana a *Photinus cinctellus*, D) sp4 especie cercana *Photinus pulchellus* o *P. affinis* a y E) sp5 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*. \_\_\_\_\_ 30
- Figura 10.** Vistas dorsales, laterales y ventrales de los edeagos de las cinco especies identificadas en este estudio: A) sp1 especie cercana a *Photinus picticollis*, B) sp2 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, C) sp4 especie cercana *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, D) sp3 especie cercana a *Photinus cinctellus* y E) sp5 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*. \_\_\_\_\_ 31
- Figura 11.** Vistas dorsales y ventrales de las hembras de tres especies identificadas en este estudio: A) sp1 especie cercana a *Photinus picticollis*, B) sp4 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, C) sp3 especie cercana a *Photinus cinctellus*. \_\_\_\_\_ 32
- Figura 12A.** Reconstrucción filogenética del género *Photinus*, incluyendo las especies de este estudio, con base en el método de Máxima Verosimilitud y utilizando el gen COI. El soporte de los nodos se estimó con 1000 iteraciones de ultrafast Bootstrap (UFB). Cada color es distintivo por especie: verde = sp1, anaranjado = sp2, morado = sp3, azul = sp4 y rojo = outgroups. \_\_\_\_\_ 35
- Figura 13B.** Reconstrucción filogenética del género *Photinus*, incluyendo las especies de este estudio, con base en el método de Máxima Verosimilitud y utilizando el gen COI. La longitud de



las ramas corresponde a la escala con el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. El soporte de los nodos se estimó con 1000 iteraciones de ultrafast Bootstrap (UFB). Cada color es distintivo por especie: verde = sp1, anaranjado = sp2, morado = sp3, azul = sp4 y rojo = outgroups. _____	36
<b>Figura 14A.</b> Reconstrucción filogenética del género <i>Photinus</i> , incluyendo las especies de este estudio, con base en el método bayesiano y utilizando el gen <i>COI</i> . La longitud de las ramas corresponde a la escala con el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. El soporte de los nodos se estimó con 1000 iteraciones de ultrafast Bootstrap (UFB). Cada color es distintivo por especie: verde = sp1, anaranjado = sp2, morado = sp3, azul = sp4 y rojo = outgroups. _____	37
<b>Figura 15B.</b> Reconstrucción filogenética del género <i>Photinus</i> , incluyendo las especies de este estudio, con base en el método bayesiano y utilizando el gen <i>COI</i> . La longitud de las ramas corresponde a la escala con el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. El soporte de los nodos se estimó con 1000 iteraciones de ultrafast Bootstrap (UFB). Cada color es distintivo por especie: verde = sp1, anaranjado = sp2, morado = sp3, azul = sp4 y rojo = outgroups. _____	38
<b>Figura 16.</b> Gráficos qqPlot del set completo de datos morfométricos. _____	62
<b>Figura 17.</b> Boxplots del set completo de datos morfométricos. Los puntos de colores sobrepuestos muestran los individuos de cada localidad. _____	73
<b>Figura 18.</b> Gel de agarosa al 1% de muestras amplificadas para el gen <i>COI</i> . Carriles: 1 y 15 = escalera 1kb DNA Ladder (Promega); 2 = CC02, 3 = CC03, 4 = CC26, 5 = CC27, 6 = VA06, 7 = VA07, 8 = VA08, 9 = VA10, 10 = BP15, 11 = BP16, 12 = BP17, 13 = control negativo, 16 = ER02, 17 = ER03, 18 = ER26, 19 = ER32, 20 = LA5, 21 = LA18, 22 = LA30, 23 = RH8, 24 = RH13, 25 = RH24 y 26 = control negativo. _____	84
<b>Figura 19.</b> Gel de agarosa al 2% de muestras amplificadas para el gen <i>wingless</i> . Carril 1 = escalera Perfect DNA™ 50pb Ladder (Novagen); 3 = CC26, 5 = ER32, 7 = CC26(1), 9 = CC26(2), 11 = CC26*, 12 = control negativo. _____	85
<b>Figura 20.</b> Gel de agarosa al 2% de muestras amplificadas para el gen <i>wingless</i> luego de haber realizado el band stab. Carril 1 = escalera Perfect DNA™ 50pb Ladder (Novagen); 2 = CC26, 3 = CC26, 4 = CC26*, 5 = ER32, 6 = ER32(2) y 7 = control negativo. _____	86
<b>Figura 21.</b> Gel de agarosa al 1% de muestras amplificadas para el gen <i>COI</i> y <i>wingless</i> con temperatura de anillamiento 51-52 °C. Carril 1 = escalera 1kb DNA Ladder (Promega); 2 = CC02, 3 = CC02, 4 = CC02, 5 = control negativo <i>COI</i> , 6 = CC02 y 7 = CC02, 8 = CC02 y 9 = control negativo <i>wg</i> . _____	87
<b>Figura 22.</b> Gel de agarosa al 1% de muestras amplificadas para el gen <i>wingless</i> con el protocolo de touchdown PCR. Carril 1 = escalera 1kb DNA Ladder (Promega); 2 = CC27, 3 = BP15, 4 = ER32, 5 = VA10, 6 = control negativo. _____	87
<b>Figura 23.</b> Reconstrucción filogenética con método ML. El soporte de los nodos se muestra con los valores de SH-aLRT/UFB. _____	88
<b>Figura 24.</b> Reconstrucción filogenética con método bayesiano. El soporte de los nodos se muestra con los valores de probabilidad posterior (PP). _____	89

## Resumen

Las luciérnagas son un grupo de insectos bioluminiscentes con alrededor de 110 géneros y más de 2,200 especies a nivel mundial. En Guatemala se reconocen al menos 14 géneros, pero no hay un registro actualizado de especies y, en general, se conoce muy poco de la biología de luciérnagas de la región. La identificación de especies ha resultado especialmente difícil por varias razones, incluyendo falta de datos genéticos y descripciones taxonómicas desactualizadas. En este sentido, este es el primer estudio que se propone identificar taxonómicamente y genéticamente especies del género *Photinus* colectadas en Guatemala. Para esto se llevaron a cabo mediciones y análisis morfométricos utilizando MorphoTools2, además de estudios taxonómicos actualizados y reconstrucciones filogenéticas de máxima verosimilitud y bayesianas, basadas en el marcador mitocondrial COI. Se identificaron cinco morfoespecies con base en morfología y genética. Además, se presentan árboles filogenéticos actualizados del género *Photinus*, en los cuales se posiciona a las especies colectadas y se muestra evidencia que apoya la hipótesis de un posible origen Centroamericano de especies norteamericanas. La metodología empleada en este estudio tiene potencial aplicación a otros taxones, con el fin de ampliar el conocimiento sobre lampíridos y tomar mejores decisiones sobre su conservación.

**Palabras clave:** *Photinus*, COI, filogenética, taxonomía, Lampyridae, MorphoTools2.

## Abstract

Fireflies are a group of bioluminescent insects with around 110 genera and more than 2,200 species worldwide. In Guatemala, at least 14 genera are recognized, but there is no updated record of species and in general, very little is known about the biology of fireflies in the region. Species identification has proven especially difficult for several reasons, including a lack of genetic data and outdated taxonomic descriptions. This is the first study that aims to taxonomically and genetically identify species of the genus *Photinus* collected in Guatemala. For this, measurements and morphometric analysis were carried out using MorphoTools2, in addition to updated taxonomic studies and phylogenetic maximum likelihood and Bayesian reconstructions based on COI. Five morphospecies were identified based on morphology and genetics. In addition, updated phylogenetic trees of the genus *Photinus* are presented, in which the collected species are positioned and evidence supporting the possible origin of North American species in Central America is shown. The methodology used in this study has potential application to other taxa, in order to broaden knowledge about lampyrids and make better decisions about their conservation.

**Key words:** *Photinus*, COI, phylogenetics, taxonomy, Lampyridae, MorphoTools2.

## I. Introducción

Las luciérnagas son un grupo de insectos carismáticos, reconocidas casi siempre por su bioluminiscencia. A nivel mundial, hay reportados 110 géneros y más de 2,200 especies descritas. A pesar de su diversidad, muy poco se conoce sobre la biología, ecología y comportamiento de este grupo. La identificación por medios genéticos y taxonómicos de luciérnagas ha resultado especialmente difícil de resolver, sobre todo porque la mayoría de especies no cuentan con sus códigos de barras genéticos y las descripciones originales son antiguas. Por lo tanto, este tipo de estudios es relevante tomando en cuenta que muchas especies se siguen descubriendo y describiendo.

En el segundo capítulo de este trabajo, se presentan los principales antecedentes y estudios previos relacionados a las luciérnagas, el género *Photinus*, la taxonomía, la genética y la demografía. En Guatemala, se tiene publicado solamente un estudio que representa la fenología de varias especies de luciérnagas en un pequeño bosque cerca de la ciudad. Además de este vacío de información, se encontró que muchas luciérnagas que permanecen en las colecciones del país, siguen sin ser identificadas a nivel de especie. Debido a este vacío de información básica, fue que se inició este estudio con el fin de identificar varias especies del género *Photinus*, que están presentes en Guatemala, a través de análisis morfométricos, taxonómicos y genéticos.

En el quinto capítulo se explican los tres tipos de análisis que se utilizaron para llegar a una identificación clara y precisa de las especies colectadas. Los análisis morfométricos permitieron tener una idea general de cómo se agrupan las especies colectadas de acuerdo a su morfología. Luego, el análisis taxonómico nos llevó a una investigación bastante extensa en cuanto a literatura, recurriendo a descripciones realizadas en el siglo XVIII y a corroborar esta información con especímenes tipo, en museos. Finalmente, los análisis genéticos basados en el gen COI permitieron reconstruir y actualizar la filogenia del género *Photinus*, incluyendo las especies colectadas en este estudio.

En el sexto y séptimo capítulo, se muestran los principales resultados morfométricos, taxonómicos y genéticos generados. Se discute sobre las especies identificadas y la importancia de generar y unificar varios tipos de datos en la identificación de especies de luciérnagas. Finalmente, en el octavo capítulo se presentan las conclusiones de este trabajo, en donde se resalta las especies identificadas en este estudio y la potencial aplicación de este tipo de análisis para otros taxones.

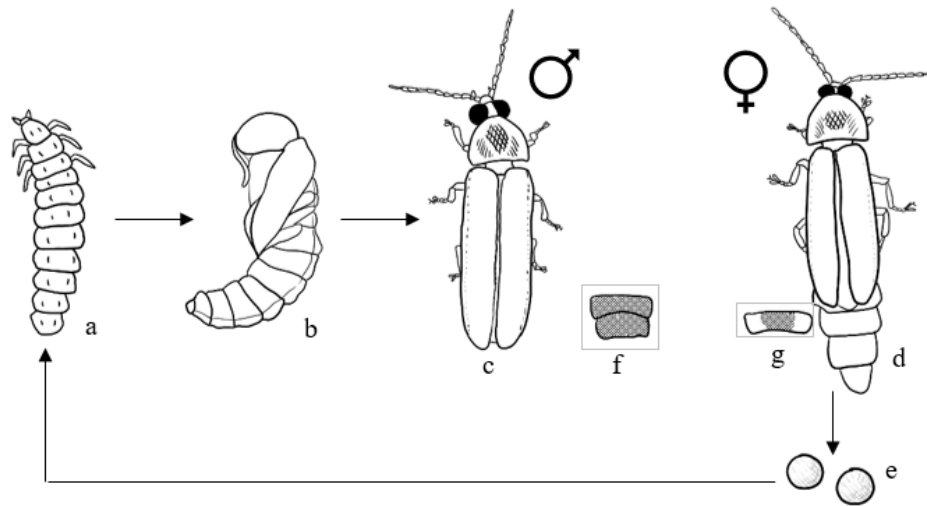
En los últimos capítulos del trabajo, se incluyen algunas recomendaciones, la bibliografía completa utilizada, y anexos con cuadros y figuras secundarias en donde se puede ampliar los resultados y análisis presentados, así como un glosario con términos principalmente asociadas a la morfología de luciérnagas.

## II. Antecedentes

### A. Familia Lampyridae

Las luciérnagas (Lampyridae Rafinesque, 1815) son una familia diversa de escarabajos (orden Coleoptera) cosmopolitas. En el mundo existen alrededor de 145 géneros y 2,200 especies descritas (Ge *et al.*, 2021; Martin *et al.*, 2019, 2021; Silveira *et al.*, 2020); aunque la clasificación taxonómica de este grupo ha sido confusa y cambiante (Martin *et al.*, 2019). Están distribuidas en todo el mundo (Koken *et al.*, 2022), pero son más abundantes en regiones tropicales y neotropicales (da Silva Nunes *et al.*, 2021). La mayoría está presente en zonas relativamente húmedas, mientras que pocas se distribuyen en zonas áridas (Zaragoza-Caballero, López-Pérez, *et al.*, 2020). Además de su variabilidad morfológica, también son ecológicamente heterogéneos pues viven en distintos hábitats: márgenes de bosque o campos abiertos cercanos a fuentes de agua, mientras que otras pocas son semi o totalmente acuáticas; algunas incluso se encuentran en áreas urbanas (da Silva Nunes *et al.*, 2021).

Las luciérnagas son insectos holometábolos y polípagos (Murphy & Moiseff, 2019), reconocidos debido a la bioluminiscencia que presentan sus estados larvarios y muchos adultos (Riley *et al.*, 2021; Wilcox & Wilson, 2021). Su ciclo de vida se presenta en la **Figura 1**, en el cual se observan cambios morfológicos dramáticos a lo largo de su desarrollo.



**Figura 1.** Ciclo de vida de una luciérnaga del género *Photinus*. a) larva bioluminiscente, b) pupa, c) macho adulto, d) hembra adulta, e) huevos, f) aparato lumínico macho y g) aparato lumínico hembra.

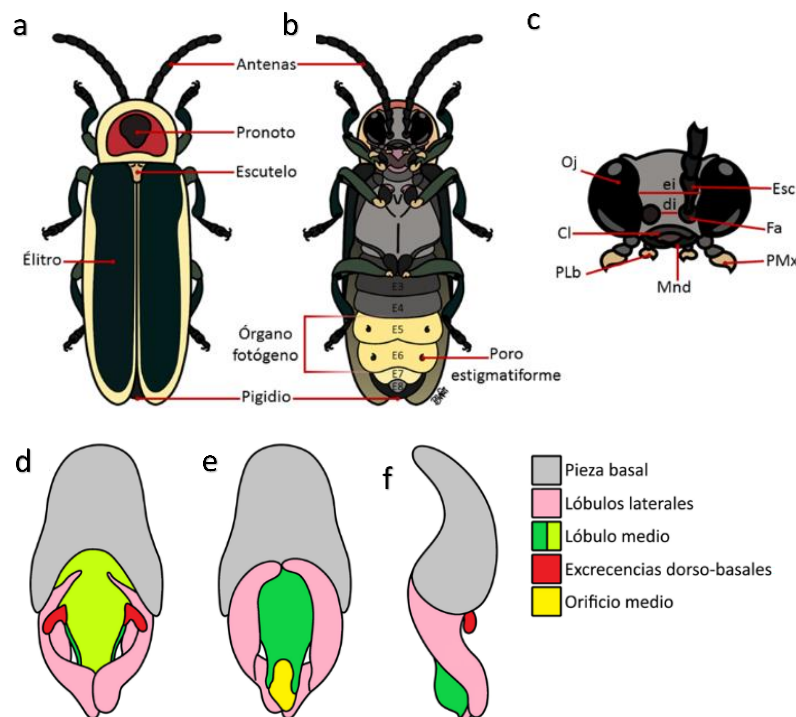
Fuente: elaboración propia, adaptado de (Lewis & Cratsley, 2008).

### B. Género *Photinus*

El género *Photinus* fue descrito en 1833 por Castlenau y posteriormente en 1857 por Lacordaire. Siguiendo la nomenclatura descrita por (Martin *et al.*, 2019), el género forma parte de la subfamilia Lampyrinae y la tribu Photinini. Es uno de los géneros que posee mayor riqueza de especies en la familia Lampyridae. Por ejemplo, en un estudio reciente se reportaron al menos un 54.7% (127 especies) de luciérnagas de México pertenecientes al género *Photinus* (Pérez-

Hernández *et al.*, 2022). Según Zaragoza-Caballero (2005): “Son luciérnagas con el clípeo libremente articulado a la frente; sutura fronto-clipeal membranosa; cuerpo oval o paralelo; antenas de ordinario filiformes, regularmente rebasando las coxas posteriores; aparato luminoso casi siempre presente; edeago trilobulado, corto, lóbulo medio con o sin un par de excrecencias dorso-basales”. Para una mejor comprensión, se creó un glosario (Anexo A) y una descripción más completa del género *Photinus* (Anexo B).

La caracterización de especies del género *Photinus* es difícil ya que es uno de los más abundantes. Además, el cuerpo de sus especies tiene forma variada, sus ojos tienen distintos tamaños, las antenas varían en forma y longitud, lo mismo que los últimos segmentos abdominales. La mayoría de especies de hábito nocturno tiene un aparato luminoso en los esternitos 5-6 y ojos desarrollados, pero también hay otras especies con el abdomen totalmente negro y ojos reducidos. El único carácter en común son las excrecencias dorsales en el lóbulo medio del edeago, aunque también está presente en los géneros *Ellychnia* y *Macrolampis* (Zaragoza-Caballero, 1995, 2005). Por estas razones, tanto la morfología de adultos y del edeago (**Figura 2**), se han tomado como base para la identificación de las especies de lampíridos (Green, 1961).



**Figura 2.** Morfología de un adulto lampírido. a) vista dorsal, b) vista ventral, c) cabeza; Oj = ojo, Cl = clípeo, PLb = palpo labial, Mnd = mandíbulas, PMx = palpo maxilar, Fa = fosa antenal, Esc = escapo, di = distancia interocular y ei = espacio interocular. Morfología del edeago: d) vista dorsal, e) vista ventral y f) vista lateral.

Fuente: (Zaragoza-Caballero, López-Pérez, *et al.*, 2020).

Adicionalmente, este género muestra una alta diversidad de comportamientos, habiendo tanto especies bioluminiscentes y especies que han perdido esta característica (Stanger-Hall & Lloyd, 2015a). Entre las especies bioluminiscentes, las especies del género *Photinus* muestran una gran gama de patrones de luz (Lloyd, 1966).

### **C. Bioluminiscencia**

Las luciérnagas son el grupo terrestre de organismos más diverso que produce bioluminiscencia. La bioluminiscencia se define como un complejo sistema de señalización en animales, que se utiliza como una señal aposemática o como señal sexual (Branham, 2003). Hay que resaltar que la bioluminiscencia está presente en todas las larvas, pero no en todos los adultos (Faust, 2017). Se plantea la hipótesis de que, durante la etapa larvaria, la bioluminiscencia es una señal aposemática, ya que las larvas poseen unas sustancias tóxicas llamadas lucibufaginas (sustancias esteroideas con un sabor desagradable para los depredadores). Las lucibufaginas han sido caracterizadas principalmente en algunas especies de Norteamérica (ej. *Photinus pyralis*) (T. R. Fallon *et al.*, 2018).

Adicionalmente, se hipotetiza que el aposematismo pudo haber sido el origen de la bioluminiscencia en luciérnagas y que luego evolucionó como una señal sexual en adultos, aunque ha habido ganancias y pérdidas de este comportamiento en distintos linajes evolutivos (Martin *et al.*, 2015, 2017). La luz producida es resultado de una reacción química que se lleva a cabo en el órgano de luz e involucra el magnesio, el ATP y la luciferina en presencia de la enzima bioluminiscente luciferasa (T. R. Fallon *et al.*, 2018; Martin *et al.*, 2017).

### **D. Estudios moleculares**

El código de barras de la vida (*DNA barcoding*, en inglés) consiste en una técnica molecular que se basa en el uso de fragmentos cortos de ADN relativamente conservados que permiten caracterizar genéticamente distintas especies. En términos generales, una región candidata a ser utilizada como código de barras debe cumplir con tres criterios: 1) contener una variabilidad y divergencia genética significativa a nivel de especies, 2) poseer sitios o regiones flanqueantes conservados para desarrollar cebadores universales con aplicaciones taxonómicas y 3) la secuencia debe ser corta, entre 400-800 pb, para facilitar la extracción y amplificación (Kress & Erickson, 2008).

Algunos de los marcadores más utilizados actualmente son los marcadores mitocondriales. Los genes mitocondriales son preferidos y ampliamente utilizados en animales como marcadores universales para la técnica del *DNA barcoding*, ya que poseen herencia matrilineal y no se ven afectados por eventos de recombinación. Adicionalmente, múltiples mitocondrias están presentes en una célula, por lo que se tienen más copias en comparación de una copia de un gen nuclear de cada parental. Algo muy importante es que el ADN mitocondrial puede ser recuperado de muestras degradadas o muy pequeñas (Tahir & Akhtar, 2016). El gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa Subunidad I (COI) posee una alta tasa de mutación en animales, lo cual causa una alta variación intraespecífica y permite la identificación de especies (D. R. Maddison, 2012; Tahir & Akhtar, 2016).

A diferencia de los genes mitocondriales, el uso de genes nucleares como códigos de barras es un poco más reciente. Algunas ventajas que dan estos marcadores nucleares es que la longitud de los códigos de barras suele ser más corta que los mitocondriales y esto facilita la amplificación de ADN. Sin embargo, estos genes son más conservados que los mitocondriales, especialmente los

del ARNr nuclear. Esto los hace indicados para resolver relaciones filogenéticas en niveles taxonómicos más altos (Hui *et al.*, 2021; Paracchini *et al.*, 2018; Wahlberg & Johanson, 2018). La proteína wingless ha sido ampliamente utilizado para estudios de inferencia filogenética en insectos (D. R. Maddison, 2012). Se ha utilizado para resolver relaciones filogenéticas entre Lampyridae y el género *Photinus*. Se encontró que este gen tiene una buena resolución en distintos niveles taxonómicos y tanto en divergencias recientes como profundas (Stanger-Hall & Lloyd, 2015).

En cuanto a estudios moleculares previos del género *Photinus*, se han establecido relaciones filogenéticas principalmente entre especies de luciérnagas de Norteamérica (Sander & Hall, 2015; Stanger-Hall *et al.*, 2007; Stanger-Hall & Lloyd, 2015a). Además, en muchos de estos estudios en los cuales se incluyen distintos taxones, se han utilizado secuencias del gen COI como principal código de barras (Sander & Hall, 2015; Selvakumar *et al.*, 2016; Stanger-Hall *et al.*, 2007). En casos en los que la identificación de luciérnagas a nivel de especie era ambigua, se utilizaron también loci nucleares como *rudimentary* (CAD) y *wingless* (wg) (Lower *et al.*, 2017). Los loci wg, COI y 16s también fueron utilizados en un análisis filogenético de la luciérnaga diurna, *Photinus interdius*, en Panamá (Vencl *et al.*, 2017).

## **E. Estudios taxonómicos**

La literatura sobre biología y ecología de luciérnagas, en general, es prácticamente escasa en Guatemala y Centroamérica. Sin embargo, existe abundante literatura sobre taxonomía de luciérnagas en México y Estados Unidos, por lo cual esta información será una de las bases de este estudio. Según McDermott (1966) en el continente americano, la familia Lampyridae estaba representada por alrededor de 1134 especies, pertenecientes a 40 géneros (Zaragoza-Caballero, 1995). Actualmente, a nivel mundial estas cifras ascienden a aproximadamente 145 géneros y alrededor de 2200 especies descritas (Ge *et al.*, 2021; Martin *et al.*, 2021; Silveira *et al.*, 2020).

El conocimiento taxonómico de lampíridos en la región Mesoamericana, principalmente en México, inicia con contribuciones de Linneo (1767) y Fabricius (1775, 1781, 1801). El aporte más generoso de la fauna de Lampyridae en Guatemala la realizó Henry Stephen Gorham, quien durante 1880-1884 describe unas 21 especies del género *Photinus* que tienen parte de su distribución en algunos lugares de Guatemala (Zaragoza-Caballero, 1995). Las descripciones originales de estas especies se encuentran en *Biologia Centrali-Americana* (Godman *et al.*, 1915).

Muchas de las descripciones taxonómicas y sistemáticas de luciérnagas de la región, provienen de México. Actualmente, existe abundante bibliografía que incluye la descripción de especies nuevas, morfología y morfometría, claves dicotómicas, fotografías de especímenes y otros datos ecológicos (Zaragoza-Caballero, 1995, 2005, 2012, 2015; Zaragoza-Caballero, Cifuentes-Ruiz, *et al.*, 2020; Zaragoza-Caballero *et al.*, 2021; Zaragoza-Caballero, López-Pérez, *et al.*, 2020; Zaragoza-Caballero & Gutiérrez Carranza, 2018; Zaragoza-Caballero & Navarrete-Heredia, 2014). En contraste, descripciones taxonómicas actualizadas de las especies de Guatemala y centroamericanas son aún inexistentes. Por esta razón, los estudios mencionados previamente constituyen una referencia base para la identificación de las luciérnagas de Guatemala, por la proximidad geográfica y la distribución compartida de algunas especies.

## **F. Estudios poblacionales en la región**

Los estudios demográficos a nivel regional se han realizado con una de las especies de luciérnagas con más amplia distribución: *Photinus pyralis* (Catalán *et al.*, 2019). Esta especie se encuentra sobre todo en Estados Unidos, en donde se ha encontrado desde Connecticut hasta Texas



(T. R. Fallon *et al.*, 2018); también hay reportes en algunos estados de México (Zaragoza-Caballero, López-Pérez, *et al.*, 2020), en Suramérica (Venezuela y Brasil) según registros del *Bavarian State Collection of Zoology* y en Panamá, según un dato del *Smithsonian Tropical Research Institute* (STRI) (datos proporcionados personalmente). Esta evidencia sugiere que *P. pyralis* puede estar presente en Guatemala (com. pers. A. Catalán, 2019); sin embargo, hasta la fecha esto no ha sido confirmado con estudios a nivel molecular, taxonómico o biogeográfico.

## **G. Estudio fenológico en Guatemala**

En Guatemala, se llevó a cabo el primer estudio a largo plazo, a lo largo de ocho años, sobre fenología de luciérnagas tropicales. Se realizó un censo semanal, en un campo y bosque montanos (1840 msnm) cerca de un riachuelo en Puerta Parada, Guatemala. En el área de estudio se encontraron doce especies de luciérnagas, incluyendo una especie diurna la cual no produce luz (*Ellychnia* sp.). De las once especies bioluminiscentes, tres se consideraron raras: *Photuris* sp., *Photinus* sp. 4 y *Photuris* sp. 2. En cuanto a *Photuris* sp. 1 y *Photinus* sp. 6, fueron las especies más comunes en Puerta Parada, pues no están ecológicamente restringidas en comparación con las otras especies. La caracterización del patrón de luz en forma de “J” (Faust, 2017) en la zona sugiere que *Photinus* sp. 6 podría tratarse de *Photinus pyralis*. En el estudio, también se hace mención de una observación de *Photinus* sp. 6 en un bosque nuboso cerca de La Unión, Zacapa, en marzo de ese mismo año (Schuster, 1997).

### III. Justificación

Las luciérnagas son insectos carismáticos reconocidos principalmente por su bioluminiscencia y su importancia ecológica, medicinal, tecnológica y cultural. En el campo de la biomedicina, la luciferasa de las luciérnagas ha sido ampliamente utilizada en técnicas de estudio celular y molecular asociadas a enfermedades humanas. Ecológicamente, contribuyen a la estabilidad de la red trófica, pues son tanto presas como depredadores (especialmente las larvas, aunque su estudio ha sido limitado, al igual que el de las hembras). También se consideran bioindicadores de la salud de un ecosistema, debido a su sensibilidad a la contaminación lumínica y la degradación de cuerpos de agua. Sin embargo, en los últimos años se ha registrado un declive importante en las observaciones de luciérnagas en varios sitios (C. Fallon *et al.*, 2019).

Adicionalmente, la falta de información sobre la taxonomía, genética y ecología de las luciérnagas hace que la identificación de especies sea una tarea difícil, sobre todo para los no expertos. Eso es especialmente cierto en la región zoogeográfica del Neotrópico, que alberga casi 1200 especies conocidas de luciérnagas (Silveira *et al.*, 2020), especialmente si se considera la posible presencia de especies crípticas (Lloyd, 1966). Además, la mayoría de las especies de luciérnagas neotropicales solo se conocen a partir de sus descripciones taxonómicas originales basadas en la morfología de machos (da Silva Nunes *et al.*, 2021), que datan del siglo XIX o XX (ej. *Biologia Centrali-Americana*) y a menudo son insuficientes para diagnosticar especies con total certeza (Silveira *et al.*, 2020).

Este estudio provee la identificación taxonómica y genética de algunas especies de luciérnagas del género *Photinus*, uno de los más abundantes y difíciles de definir entre los coleópteros de la familia Lampyridae (Zaragoza-Caballero, 2015) en Guatemala. Adicionalmente, métodos moleculares como el código de barras de la vida representan una herramienta importante para la identificación de la especie, identificación de posibles especies crípticas y resolución de dudas taxonómicas (Kress & Erickson, 2008), sobre todo en un taxón cuya clasificación ha sido bastante pragmática y basada principalmente en características morfológicas (Stanger-Hall *et al.*, 2007).

Adicionalmente, este tipo de análisis genéticos puede brindar información importante que permita hacer inferencias sobre las prioridades de conservación a lo largo de su distribución (McMahon *et al.*, 2014; Miličić *et al.*, 2021) y conocer más sobre su historia evolutiva (Selvakumar *et al.*, 2016). Finalmente, cabe mencionar que estudios que incorporan tanto información morfológica como molecular, proveen mejores interpretaciones que los que se enfocan solamente en una fuente de información (Hillis *et al.*, 1996). Por lo tanto, se necesitan estudios integrales que documenten la diversidad de luciérnagas, al tiempo que proporcionen herramientas para identificar y discriminar entre especies de luciérnagas, con el fin de facilitar la investigación básica y aplicada de lampíridos en el Neotrópico.

## IV. Objetivos

### A. General

- Identificar genéticamente y taxonómicamente especies de luciérnagas del género *Photinus* en Guatemala.

### B. Específicos

- Identificar luciérnagas del género *Photinus* con base en análisis taxonómicos y morfométricos.
- Identificar luciérnagas del género *Photinus* con el método de código de barras de la vida, utilizando un marcador molecular mitocondrial (COI) y un marcador nuclear (*Wg*).
- Elaborar árboles filogenéticos actualizados del género *Photinus* que incluyan las especies colectadas en este estudio.

## V. Métodos

### A. Sitios de colecta

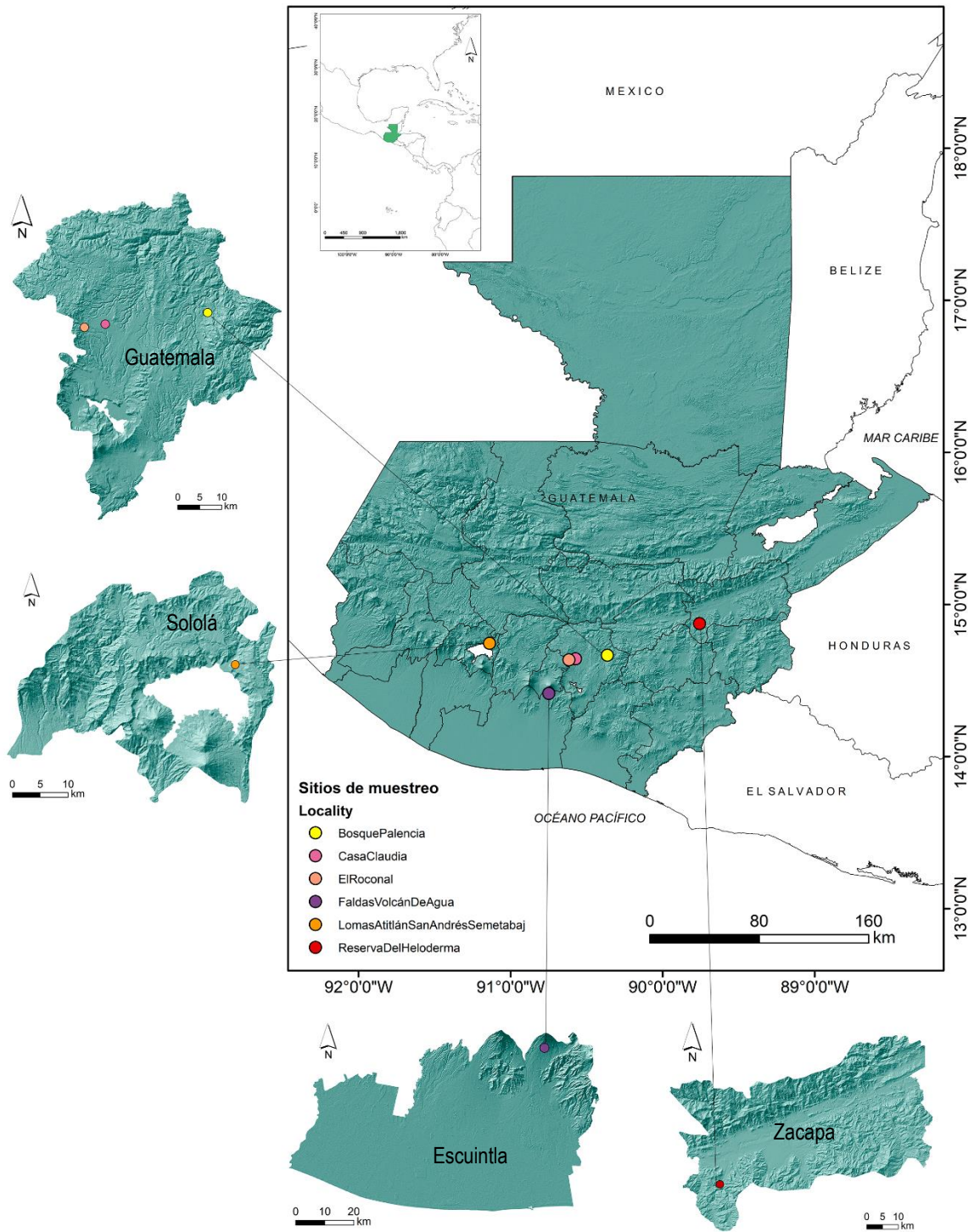
Se colectaron en total 205 individuos en seis localidades, de los cuales aproximadamente 188 fueron identificados posteriormente como parte del género *Photinus*. Se tomaron las coordenadas de cada localidad y se asignó un código único de identificación a cada individuo (**Cuadro 1**). Las colectas fueron realizadas entre mayo y septiembre del 2021, aproximadamente desde las 18:00 hasta las 20:00 h, aunque se reportó mayor actividad al atardecer para la mayoría de las localidades. Se registraron los códigos de cada individuo, localidades, coordenadas y temperatura del lugar, así como el género, especie y pseudoespecie (en caso no fuera posible la identificación).

**Cuadro 1.** Sitios de colecta e individuos colectados.

Localidad	Código único ID	Coordenadas (latitud, longitud)	n	Fechas de colecta (dd/mm/aaaa)
<b>El Roconal</b>	ER	14.6360477, -90.6159431	32	15/05/2021 29/05/2021 02/06/2021
<b>Casa Claudia</b>	CC	14.642556, -90.573236	31	23/05/2021 24/05/2021
<b>Bosque Palencia*</b>	BP	14.6660431, -90.36331492	22	13/05/2021
<b>Reserva del Heloderma</b>	RH	14.8738028, -89.7569861	46	23/07/2021 24/07/2021
<b>Faldas del Volcán de Agua</b>	VA	14.414657, -90.748566	19	4/09/2021
<b>Lomas de Atitlán, San Andrés Semetabaj</b>	LA	14.7444444, -91.1386111	55	26/06/2021 28/06/2021 30/06/2021

n = número de individuos colectados del género *Photinus*. \*Nota: coordenadas aproximadas, no se cuenta con las coordenadas específicas de esta localidad, ya que los individuos fueron colectados por una persona ajena al grupo de investigación y no se logró contactar con ella para obtener más información.

El mapa que incluye los sitios de colecta y relieve (**Figura 3**) se realizó con el software ArcMap 10.3 disponible en el Laboratorio SIG y de Percepción Remota del Centro de Estudios Ambientales y Biodiversidad de la Universidad del Valle de Guatemala (CEAB-UVG).



**Figura 3.** Mapa de los sitios de muestreo del estudio.

## B. Colecta en campo

Las luciérnagas se colectaron con una red entomológica o con la mano, en ocasiones cuando las luciérnagas volaban a nivel del suelo o se posaban en una superficie. Se registraron los siguientes datos: fecha, hora, localidad, tipo de hábitat y cuando fuera posible, se tomaron videos del patrón de luz. Cada uno de los individuos colectados fue conservado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, el cual estaba identificado con el código del individuo, con etanol al 95%. Luego, si no era posible refrigerarlos a -20 °C, se conservaban en una hielera o refrigerador a 4 °C. Finalmente, todas las muestras fueron trasladadas a un refrigerador a -20 °C en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología en la Universidad del Valle de Guatemala.

## C. Identificación de los individuos

Inicialmente, se identificaron en campo algunas luciérnagas con base en una combinación de características morfológicas y de comportamiento. Se asignó una morfoespecie y color distintivo (que será utilizado a partir de ahora en cada análisis) a cada especie identificada (sp1, sp2, sp3 y sp4) en cada localidad (VA; RH; CC, BP y ER; LA), respectivamente (**Cuadro 2**). Sin embargo, con observaciones posteriores se identificó una quinta morfoespecie (sp5) para la localidad RH. Para confirmar la identificación de los especímenes, se tomaron algunos individuos de cada localidad (entre dos y cinco, dependiendo del total de individuos disponibles) y se analizaron en el Laboratorio de Entomología Sistemática del CEAB-UVG, tomando una serie de medidas y fotografías dorsales y ventrales.

**Cuadro 2.** Morfoespecies y colores asignados a cada localidad.

Localidad	Morfoespecie asignada	Color distintivo
VA	sp1	Verde
RH	sp2	Anaranjado
	sp5	Amarillo
CC, BP y ER	sp3	Morado
LA	sp4	Azul

## D. Análisis morfométricos y taxonómicos

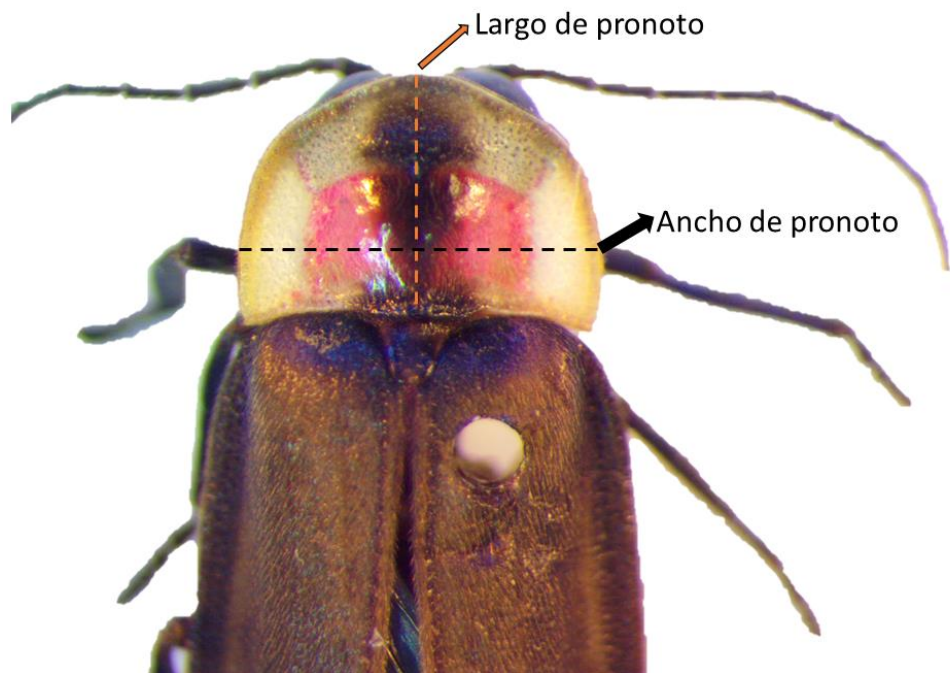
### 1. Medidas morfométricas

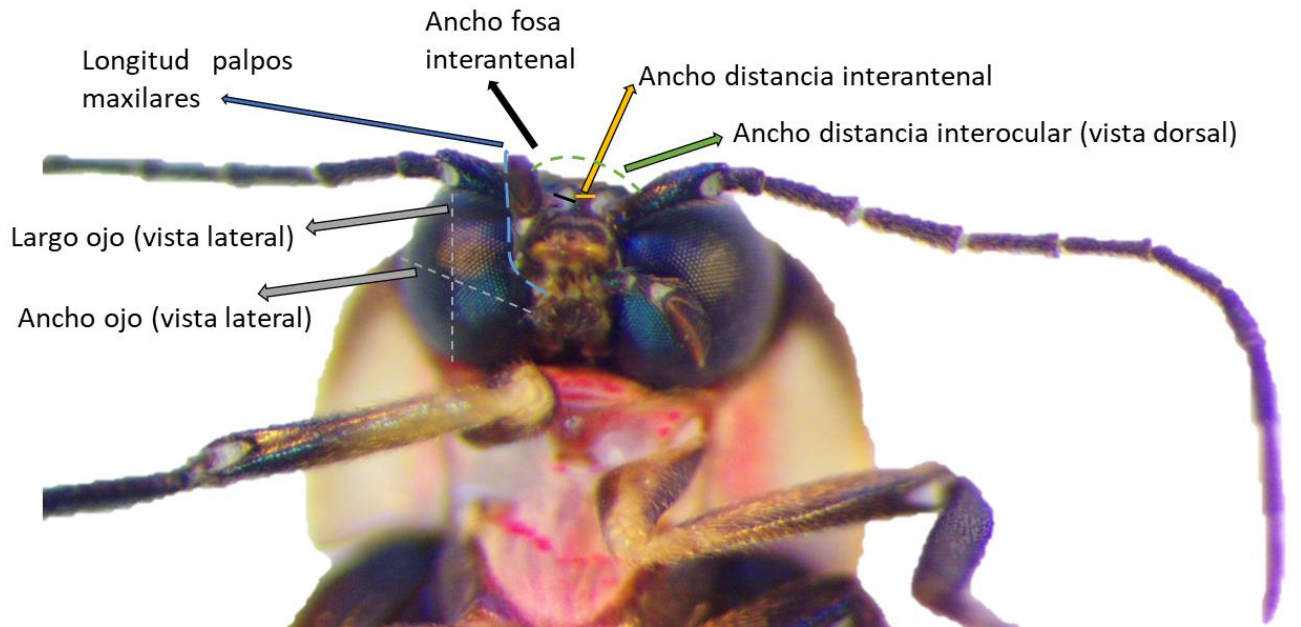
Se utilizó un estereoscopio con grátula para tomar las medidas morfométricas (entre paréntesis se explica la forma en que fueron medidas). La **Figura 4** representa dichas medidas.

- Longitud total (del ápice del pronoto a la base del élitro)
- Ancho de élitro (del lado derecho, sobre el espacio humeral)
- Largo de élitro (del lado derecho)
- Largo de pronoto (sobre la parte media del pronoto)
- Ancho de pronoto (se midió en la parte más ancha del pronoto)
- Longitud de antena (del lado derecho, se calculó como la suma de la longitud de cada antenómero por separado; se comienza a contar desde el antenómero proximal)
- Ancho de cabeza (lado dorsal, se tomó desde donde empieza un ojo hasta donde termina el otro ojo)

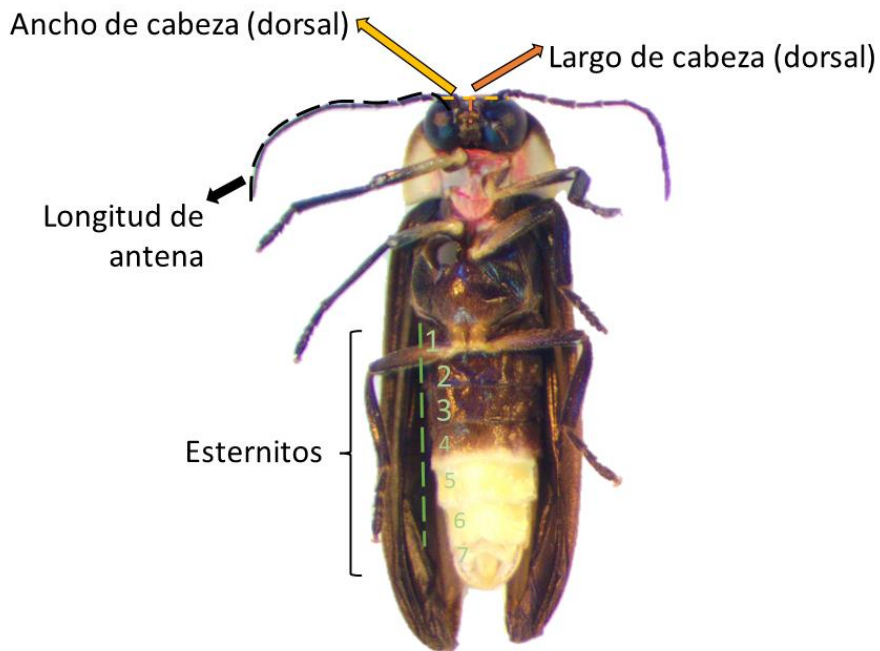
- Largo de cabeza (lado dorsal, se tomó desde donde se visualiza la cabeza en la parte dorsal hasta donde comienzan las mandíbulas)
- Ancho de ojo (lado derecho, se mide en vista lateral)
- Largo de ojo (lado derecho, se mide en vista lateral)
- Longitud de palpos maxilares (lado derecho, se calculó como la suma de la longitud de las cuatro partes del palpo maxilar por separado; se comienza a contar desde el palpo proximal)
- Ancho fosa interantenal (lado derecho, se mide en la parte media de la fosa internantenal)
- Ancho distancia interantenal (se mide en la parte media del espacio interantenal)
- Ancho distancia interocular (lado dorsal)
- Largo de los esternitos 1-7 (se tomó la medida en el extremo derecho de cada esternito)

Adicionalmente, fue necesario establecer las relaciones entre algunas medidas (ej. Largo-ancho élitro, entre otros) tal y como se ha realizado en estudios previos (Zaragoza-Caballero & Navarrete-Heredia, 2014).









**Figura 4.** Diagramas de explicación de medidas morfométricas.

Para evaluar la relación entre las medidas morfométricas, se utilizó el paquete MorphoTools2 (Šlenker *et al.*, 2022) en RStudio. En primer lugar, se determinó la normalidad de los datos con un test de Shapiro-Wilk y se comprobó que las muestras provienen de la misma distribución con gráficos qqPlot (Anexo E, Figura 16). Luego se generaron boxplots con cada caracter y especie (Anexo F, Figura 17).

## 2. Correlación entre caracteres

Debido a que la mayoría de los datos no poseen distribución normal, se realizó un test de correlación Spearman. Las variables que muestren una alta correlación ( $r \geq |0.95|$ ) no se utilizaron en los análisis, ya que pueden distorsionar los resultados al proveer información redundante.

## 3. Análisis de componentes principales (PCA)

Este método no requiere la especificación *a priori* de la pertenencia de las muestras a taxones (grupos). El PCA transforma las variables medidas en componentes principales (variables artificiales). Los primeros componentes extraen la mayor parte de la varianza en las variables medidas (Šlenker *et al.*, 2022). Ya que la matriz de datos contenía valores faltantes (NA) fue necesario hacer un reemplazo de dichos valores mediante una función que calcula el promedio de los valores de dicha variable. Este nuevo subconjunto de datos es el que se utilizó para el PCA.

#### 4. Clasificación jerárquica UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*)

La clasificación jerárquica es otro método que no requiere especificación *a priori* de la pertenencia de muestras en taxones (grupos). Por lo tanto, este método se utilizó con el fin de obtener una idea de la existencia de una estructura en los datos a través de un dendrograma. En análisis morfométricos de este tipo, el método distancia Euclidiana (para caracteres cuantitativos) y el método de agrupamiento UPGMA son los más utilizados.

#### 5. Extracción de edeagos

Se realizó la disección de la genitalia para obtener el edeago<sup>1</sup>. La configuración del edeago se ha tomado como base para el reconocimiento de las especies, entre otras medidas morfométricas (Zaragoza-Caballero, 2005). El protocolo modificado para la extracción y disección de la genitalia de los machos (Somavilla *et al.*, 2018) se muestra a continuación:

- Se tomaron los últimos dos esternitos del abdomen (donde se encuentra el aparato de luz) con pinzas entomológicas.
- Se colocó la estructura entera en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se sumergieron en una solución de KOH 10% aproximadamente a la mitad de su capacidad (asegurándose que cubriera los segmentos) y se calentaron los tubos en agua a 50-60 °C durante 15-20 minutos, hasta que el tejido de quitina se volviera transparente y blando.
- Se realizó un lavado de la genitalia con agua purificada o desmineralizada (de preferencia, ya que en zonas de agua dura el agua de chorro pueden reaccionar con los ácidos en las cavidades corporales y volver frágiles algunas estructuras) y unas gotas de etanol 70%.
- Con ayuda de pinzas entomológicas y agujas modificadas, se eliminó el tejido restante del pigidio y los esternitos, hasta que se logró aislar completamente el edeago.
- Se tomaron fotografías ventrales, laterales y dorsales del edeago con una cámara AmScope MU Series USB2.0 adaptada a un estereoscopio Wild M3B Typ 308700 y se visualizaron las fotos en el software AmScope versión x64, 4.11.17864.20201020.
- Por último, las estructuras restantes de la genitalia fueron almacenadas en tubos Eppendorf con etanol 70% y el edeago se conservó en micro viales de polietileno con tapas de silicón (BioQuip® Products), con una gota de glicerina comercial.

#### 6. Análisis taxonómico

Inicialmente, se recurrió a las descripciones de las especies reportadas para Guatemala en *Biologia Centrali Americana* (BCA). Luego, se hizo una revisión de las especies cuya descripción no fue encontrada en BCA, en los siguientes libros: *Coleopterorum Catalogus* de E. Olivier; *Checklist of the Coleopterous Insects of Mexico, Central America, the West Indies and South America* de Richard E. Blackwelder. Las descripciones faltantes se encontraron en (Gorham, 1880) y (Zaragoza-Caballero, 1995). Como referencias generales, se utilizaron otras guías y claves disponibles para la región: *The Fireflies of Ontario* (Luk *et al.*, 2011) y *Luciérnagas del centro de*

---

<sup>1</sup> Cabe resaltar que las primeras disecciones de edeago se realizaron a partir de individuos que estaban completos; sin embargo, más adelante se utilizaron los pigidios de los individuos a los que se les iba a realizar las extracciones de ADN pues se observó menor contaminación en las cuantificaciones de estos. Se cree que los compuestos presentes en el aparato lumínico podrían causar algún tipo de contaminación en el ADN. Además, se aprovecha el material corporal cuando no se tienen disponibles muchos individuos.

México (Coleoptera: Lampyridae): descripción de 37 especies nuevas (Zaragoza-Caballero, López-Pérez, *et al.*, 2020). Para este análisis fue invaluable el apoyo de la Dra. Viridiana Vega Badillo, para la identificación taxonómica de los individuos colectados.

Finalmente, para confirmar la identificación de las morfoespecies colectadas, se solicitó al Museo de Historia Natural en Londres las fotografías dorsales y ventrales de los especímenes tipo de las especies cercanas que se identificaron.

## **E. Análisis molecular**

### **1. Extracción de ADN**

Se utilizó el kit comercial *Wizard™ Genomic DNA Purification Kit* de la marca Promega y su protocolo estándar para extracción de material genético a partir de tejido animal (Promega Corporation, 2020). El procedimiento completo se detalla a continuación:

- Preparación del tejido: se maceraron entre 10-20 mg del espécimen con un micro pistilo previamente autoclaveado, en un tubo Eppendorf (1.5 ml). Se agregaron 600 µl de la solución de lisis previamente enfriada en el refrigerador a 4 °C (se preparaba una alícuota cada vez que se iba a utilizar, según la cantidad que se requería). Se homogeneizó durante 10 segundos, luego se incubó a 65 °C durante mínimo 15 y máximo 60 minutos, o hasta que el tejido se observó más lisado.
- Lisis y precipitación de proteínas: se añadieron 3 µl de ARN-ase a cada tubo y se mezcló por inversión de 2 a 5 veces. Luego, se incubaron las muestras de 15-30 minutos a 37° C. Se llevaron las muestras a temperatura ambiente y se vortexearon durante 20 segundos. Finalmente, se centrifugaron a 13,200 rpm durante 3 minutos. El siguiente paso fue añadir 200 µl de la solución de precipitación de proteínas y se vortexearon durante 20 segundos. Luego, se dejaron reposar los tubos en una mini refrigeradora a -20 °C durante 5 minutos. Por último, se centrifugaron durante 4 minutos a 13,200 rpm.
- Precipitación de ADN. El precipitado de las proteínas formó un pellet. Con cuidado, se removió el sobrenadante, el cual contiene el ADN, evitando el pellet de proteínas pues podría causar contaminación. Luego, se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio (1.5 ml) que contenía 600 µl de etanol absoluto previamente enfriado. Se mezcló por inversión y en este punto se pudieron observar algunos “hilos” blancos, que corresponden al ADN.

Se centrifugaron los tubos durante 2.5 minutos a 13,200 rpm. El ADN era visible como un pequeño pellet blanco. Con cuidado se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados del pellet de ADN con etanol al 70% (grado reactivo) a temperatura ambiente, cada uno de 300 µl (para mantener el volumen final de 600 µl del protocolo original). Entre cada lavado se centrifugó durante 2 minutos a 13,200 rpm y con cuidado se descartó el sobrenadante, pues el pellet de ADN puede estar suelto en este punto.

Finalmente, se dejó secar el pellet de ADN a temperatura ambiente (entre 25-30 °C), en una incubadora, durante 10-15 minutos o hasta que ya no se observen gotitas de etanol en las paredes del tubo o el pellet.

- Rehidratación de ADN: se agregaron 50 µl de la solución de rehidratación de ADN, incubando los tubos a 65° C durante 30-45 minutos. Alternativamente, algunas muestras se dejaron incubando en la solución de rehidratación toda la noche a 4 °C, hasta que ya se hubiera disuelto el pellet completamente. Finalmente, se almacenaron dos alícuotas de ADN (una con la concentración original y otra diluida a 20 ng/µl) a -20 °C y una alícuota diluida a 20 ng/µl a 4 °C para los análisis posteriores.

## 2. Evaluación de la calidad y pureza del ADN

La calidad y la pureza del ADN extraído se midió utilizando el *Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer*. Se colocó 1 µl de cada muestra en el espectrofotómetro y se obtuvieron los valores de concentración (ng/µl), absorbancias A260/A230 y A260/A280 (**Cuadro 10**).

## 3. Amplificación de ADN

Se amplificaron dos genes para la identificación genética: el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) de ~750 pb y el gen nuclear *wingless* (*Wg*) de ~420 pb. Los cebadores para cada gen fueron diseñados específicamente para luciérnagas (**Cuadro 3**) y ya han sido utilizados con éxito (Stanger-Hall & Lloyd, 2015). A partir de estudios previos (Stanger-Hall *et al.*, 2007; Stanger-Hall & Lloyd, 2015a), se optimizaron la receta del *master-mix* (**Cuadro 4**) y las condiciones de amplificación (**Cuadro 5**) para el gen COI.

**Cuadro 3.** Secuencias de cebadores.

Gen	ID cebador	Secuencias de cebadores (5'-3')	Referencia
COI	C1-J-1500 (LCO)	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	(Baldwin <i>et al.</i> , 1996)
	C1-N-2150 (HCO)	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	
Wg	Wg550F	ATGCGYCAGGAATGTAAGTGCCACGGCATGTC	(Stanger-Hall & Lloyd, 2015)
	WgAbRZ	CAYTGGTGCTGYGARGTAAAATG	

Los productos de amplificación se verificaron con geles de agarosa. En el caso de los productos de amplificación del gen COI, se corrieron geles de agarosa al 1% durante 50 minutos y se utilizó como referencia una escalera de 1kb de Promega, debido a que se esperaba solamente la amplificación de una banda. En cambio, para los productos de amplificación de *Wg*, se corrieron geles de agarosa al 2% durante 80-90 minutos y una escalera de 50pb de Novagen. Lo anterior, debido a que se observó amplificación inespecífica (varias bandas) resultado de cebadores degenerados, por lo cual era necesario distinguir entre bandas cercanas para realizar el método de *band-stab PCR* (Bjourson & Cooper, 1992). Los geles se observaron con luz UV en un transiluminador.

**Cuadro 4.** Receta de master-mix para el gen COI.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	n = 1	n = 24.4 *
Agua ultrapura	-	-	2.2 µl	53.68 µl
GoTaq	-	-	5 µl	122 µl
Primer forward (LCO)	10 µM	0.4 µM	0.4 µl	9.76 µl
Primer reverse (HCO)	10 µM	0.4 µM	0.4 µl	9.76 µl
ADN	20 ng/µl	4 ng/µl	2 µl	2 µl
Volumen total	-	-	10 µl	8 µl master mix + 2 µl ADN

\*Este valor resulta del número total de muestras (22) + blanco + 10% error.

**Cuadro 5.** Condiciones de amplificación para el gen COI.

Gen	Hot start	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Extensión final	Hold	N° Ciclos
COI (LCO-HCO)	95°C (2 min)	94°C (1 min)	44°C (46 s)	72°C (1 min)	72°C (10 min)	4°C	30

#### a. Protocolo de *band-stab* PCR para amplificación inespecífica del gen *wingless* (Wg)

En primer lugar, se amplificó el gen siguiendo la receta de master-mix original (**Cuadro 6**) y el programa original (**Cuadro 7**) para el gen *wingless*. Luego, se dejó correr el gel de agarosa al 2% siguiendo las recomendaciones previamente establecidas. Al observar el gel en el transiluminador (Anexo G, Figura 19), se usó una luz UV media para evitar la degradación del ADN. Utilizando protección personal adecuada, se tomó una punta de 10 µl y se punzó la banda de interés de una a tres veces. En seguida, se introdujo la punta a un tubo que contenía un nuevo *master-mix* (*stab*) previamente preparado (**Cuadro 8**) y se revolvió lo suficiente para lograr introducir el ADN de la punta a la mezcla. También se utilizó una micropipeta para mezclar el ADN que hubiera quedado en la punta.

**Cuadro 6.** Receta de master-mix original del gen wingless.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	n = 1	n = 5
Agua ultrapura	-	-	2.7 µl	13.5 µl
GoTaq	-	-	5 µl	25 µl
Primer forward	10 µM	0.4 µM	0.4 µl	2 µl
Primer reverse	10 µM	0.4 µM	0.4 µl	2 µl
ADN	20 ng/µl	4 ng/µl	1.5 µl	1.5 µl
Volumen total	-	-	10 µl	8.5 µl master mix + 1.5 µl ADN

**Cuadro 7.** Condiciones originales de amplificación del gen wingless.

Gen	Hot start	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Extensión final	Hold	Nº Ciclos
Wg	95°C (2 min)	94°C (1 min)	50°C (50 s)	72°C (40 s)	72°C (5 min)	4°C	32

En segundo lugar, se llevó a cabo un nuevo programa de amplificación (*stab*) (**Cuadro 9**), el cual contiene menos ciclos ya que 1) la concentración de ADN es mayor y 2) ya solo se está amplificando una banda. Finalmente, se corroboró que se amplificara el producto deseado corriendo nuevamente un gel con las condiciones descritas para este gen previamente (Anexo G, Figura 20). Finalmente, se prepararon las muestras para ser enviadas a secuenciar.

**Cuadro 8.** Receta del master-mix "stab" para el gen wingless.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	n = 1	n = 5
Agua ultrapura	-	-	4.2 µl	21 µl
GoTaq	-	-	5 µl	25 µl
Primer forward	10 µM	0.4 µM	0.4 µl	2 µl
Primer reverse	10 µM	0.4 µM	0.4 µl	2 µl
ADN	Proviene del <i>band stab</i>			
Volumen total	-	-	10 µl	10 µl master mix

**Cuadro 9.** Condiciones de amplificación "stab" para el gen wingless.

Gen	Hot start	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Extensión final	Hold	N° Ciclos
Wingless	95°C (2 min)	94°C (1 min)	50°C (50 s)	72°C (40 s)	72°C (5 min)	4°C	25-30

#### 4. Secuenciación de ADN

Algunas de las muestras amplificadas se purificaron con el kit comercial *ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System* de la marca Promega; mientras que otras a través del servicio de purificación de la compañía Macrogen. Seguidamente, las muestras se enviaron para ser secuenciadas con el método Sanger a la compañía Macrogen, en Corea del Sur.

## F. Análisis bioinformático

### 1. Alineamiento de secuencias

Los cromatogramas y secuencias se visualizaron, editaron y alinearon en ambas direcciones utilizando el software Geneious 2022.0.2 (<https://www.geneious.com>). Se editaron manualmente para eliminar fragmentos no informativos (los extremos) y así obtener la mejor calidad de secuencias posible. Las secuencias consenso resultantes de cada individuo se alinearon con las secuencias obtenidas en Geneious Prime para cada gen correspondiente, a través de una búsqueda en la pestaña de NCBI (Photinus AND COI; Photinus AND wg).

## 2. Reconstrucciones filogenéticas

**Árbol de Máxima Verosimilitud (ML):** utilizando el comando *iqtree -s example.phy -bb 1000 -alrt 1000* implementado en el software IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2015) que combina ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) basado en el Criterio de Información Bayesiano (BIC, por sus siglas en inglés), búsqueda del árbol, SH-aLRT y valores de ultrafast Bootstrap (UFBoot) los cuales se generan de 10 a 40 veces más rápido que el Bootstrap estándar y los valores de soporte son menos sesgados (Hoang *et al.*, 2018).

**Árbol Bayesiano:** se utilizó un análisis bayesiano en MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012). La modificación de parámetros se realizó en Mesquite (W. P. Maddison & Maddison, 2019) y fueron los siguientes: Lset nst = 6, Rates = Mcmc ngen = 10,000,000, printfreq = 1000, Samplefreq = 1000, nruns = 2, savbrlens = yes. En la terminal de Linux, se ejecutó el archivo generado y el comando *sump* para obtener el resumen de datos y el comando *sumt* para generar el árbol más probable. También se obtuvieron los valores de *Potential Scale Reduction Factor* (PSRF+) y *Effective Sample Size* (ESSs).

En ambos casos, se utilizaron dos especies como outgroups: la especie japonesa *Luciola parvula* y la especie norteamericana *Photuris pensylvanica*, con las secuencias obtenidas de la función de NCBI en Geneious. Los árboles fueron editados en el software online ITOL. Se generaron dos tipos de árboles con cada método: uno en el cual se observan los valores de UFBoot y otro en el cual se muestra la escala de divergencia entre las especies. Finalmente, se validaron los árboles comparando las topologías y el soporte de los nodos de cada uno.



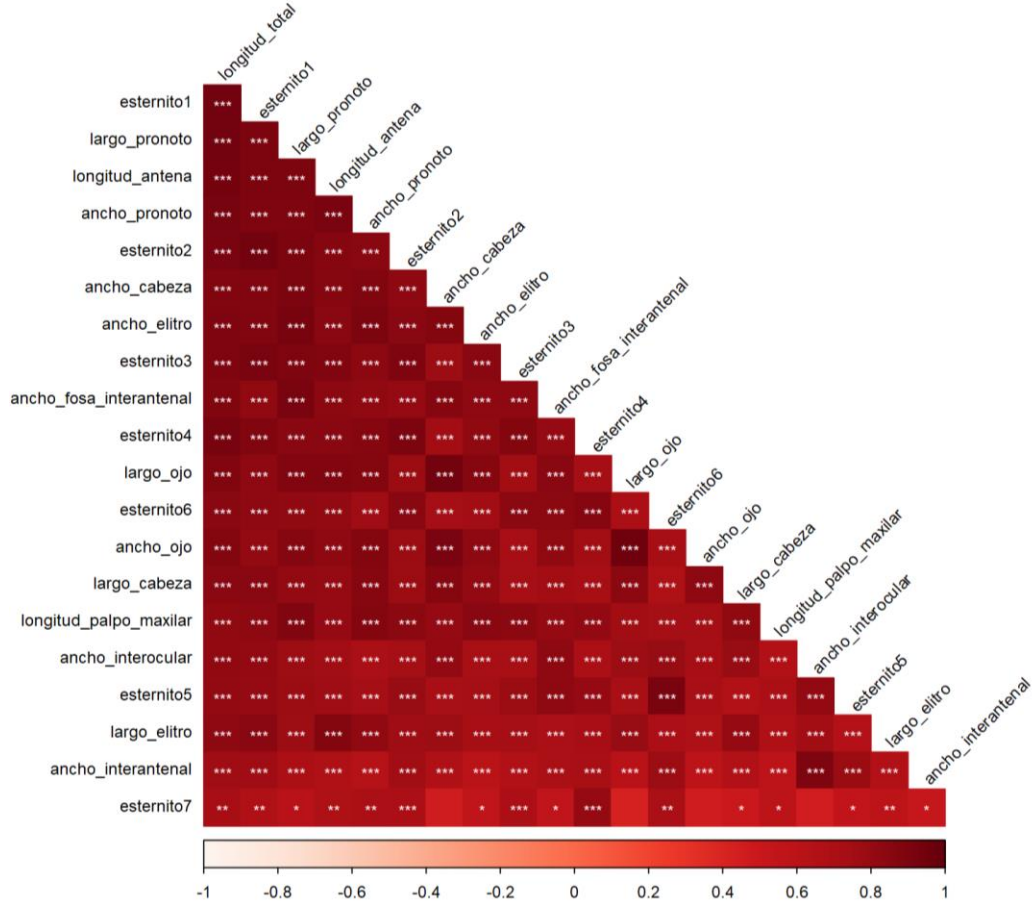
## VI. Resultados

### A. Colecta e identificación de individuos

Del total de 205 individuos colectados en seis localidades, inicialmente 188 individuos fueron identificados de forma preliminar como parte del género *Photinus* debido a una combinación de caracteres: la presencia de garras simples y poros estigmatiformes (**Figura 2**). Posteriormente, la identificación a nivel de género fue verificada por la presencia de las excrescencias basales en el edeago (**Figura 10**). Es importante mencionar que se cuenta con al menos un espécimen hembra (**Figura 11**) para tres (sp1, sp3 y sp4) de las cinco especies.

### B. Análisis morfométricos y taxonómicos

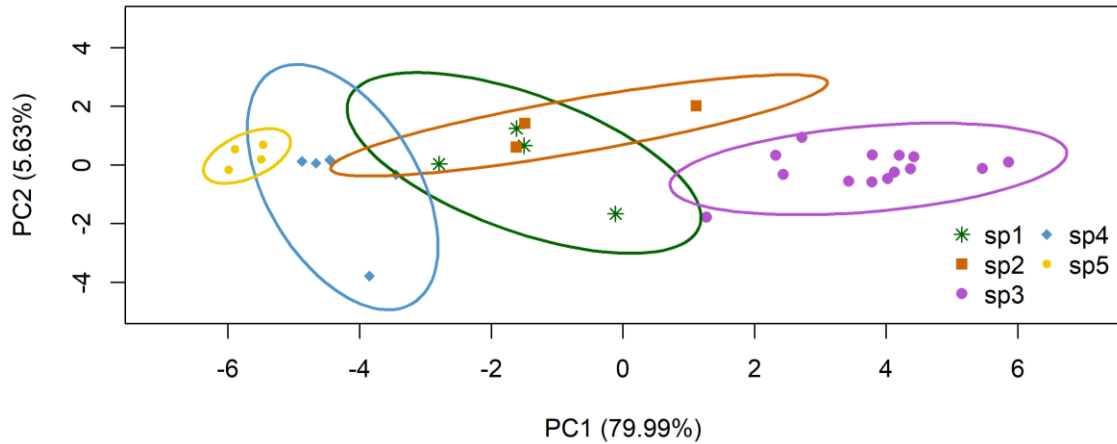
El análisis de correlación (**Figura 5**) nos permitió establecer dos caracteres altamente correlacionados con otros ( $r \geq |0.95|$ ) como la longitud\_total y el largo\_ojo, por lo que se decidió no tomarlos en cuenta para los análisis morfométricos posteriores.



**Figura 5.** Diagrama de correlación Spearman entre caracteres morfométricos. Las estrellas dentro de los cuadros indican la significancia estadística según el valor p: \* = 0.05, \*\* = 0.01, \*\*\* = 0.001.

### C. PCA

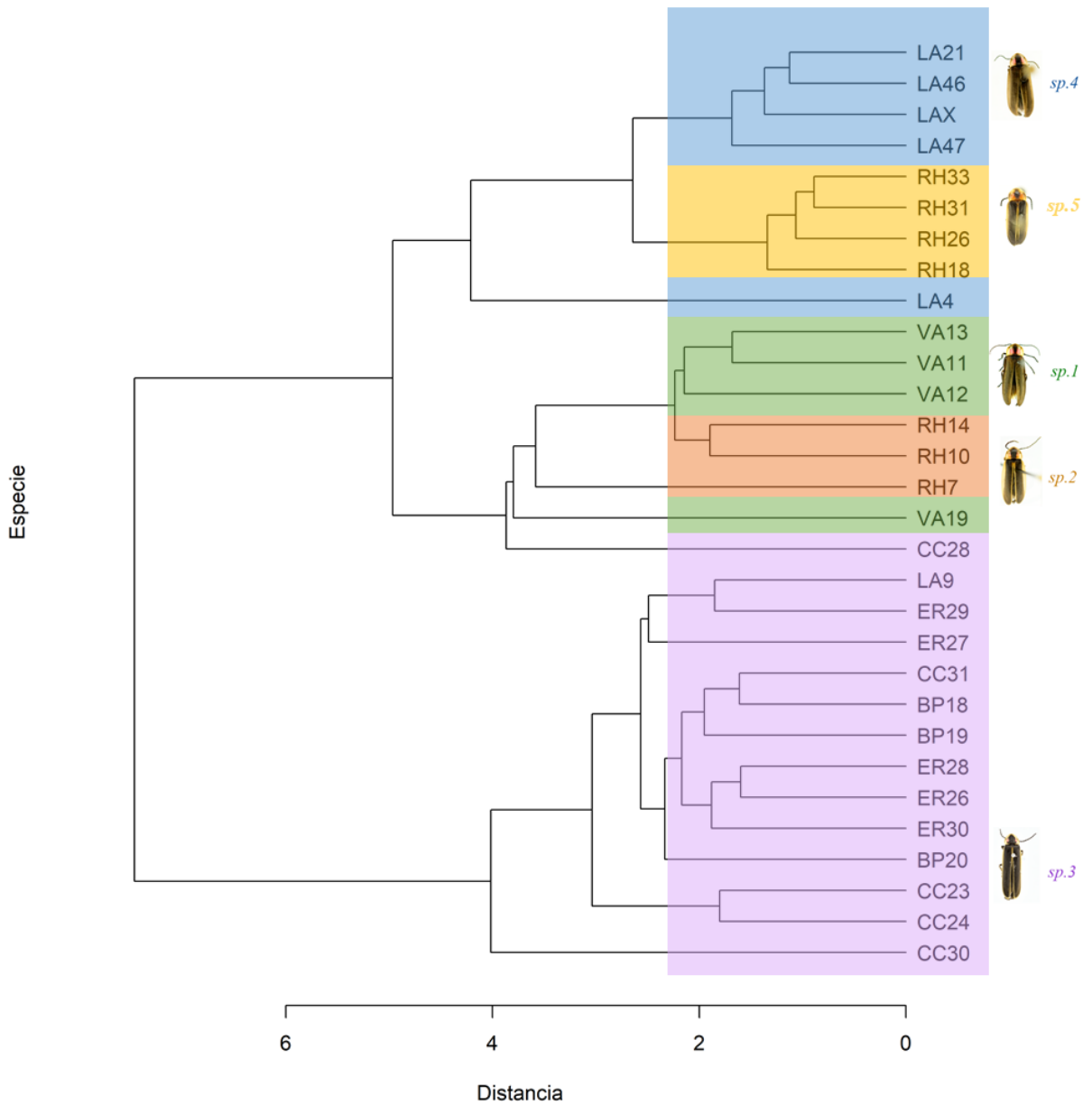
Previo al análisis de PCA, los especímenes fueron clasificados en cinco morfoespecies. Esta clasificación *a priori* se basó en una revisión morfológica. El PC1 es el que explica la mayor parte de la varianza observada en los datos (79.99%), mientras que el PC2 solamente el 5.63%. Dentro del PC1 todas las medidas morfométricas explican de forma similar el agrupamiento de las morfoespecies. En general, se observa que las morfoespecies más distintas entre sí son sp3 y sp5 respecto al PC1. Por otro lado, entre la sp1 y la sp2, existe un solapamiento de los caracteres morfométricos (**Figura 6**).



**Figura 6.** Análisis de componentes principales (PCA) de los caracteres morfométricos establecidos (excluyendo los caracteres altamente correlacionados con otros: la longitud\_total y el largo\_ojo).

### D. UPGMA

El dendrograma UPGMA basado en distancia Euclídeana y 19 caracteres morfométricos (**Figura 7**) permite reconocer tres grandes clusters. Uno de estos clusters corresponde a la sp3. En otro de los clusters se agrupan la sp1 y sp2, mientras que en el último se agrupan la sp4 y sp5. Sin embargo, hay que notar algunos datos atípicos, como los individuos LA4, CC28 y VA19, que no se agrupan específicamente con sus congéneres.



**Figura 7.** Dendrograma de las especies de *Photinus* determinadas en este estudio, con base en los caracteres morfométricos establecidos (excluyendo los caracteres altamente correlacionados con otros: la longitud\_total y el largo\_ojo). Cada color representa a cada especie (verde = sp1, anaranjado = sp2, morado = sp3, azul = sp4 y amarillo = sp5).

## E. Taxonomía

A partir de la extracción de eдеagos se pudo confirmar que las cinco morfoespecies colectadas (**Figura 8 y 9**) corresponden al género *Photinus*, debido a la presencia de dos excrecencias dorsales en el lóbulo medio del eдеago (**Figura 10**).

Con ayuda de la Dra. Viridiana Vega se realizó el análisis taxonómico, identificando cinco especies cercanas a las colectadas: la morfoespecie sp1 es cercana a *Photinus picticollis*, la primer morfoespecie (sp2) colectada en RH es cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, la segunda morfoespecie (sp5) de RH es cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, la especie colectada en las localidades CC, BP y ER (sp3) fue identificada como cercana a *Photinus cinctellus* y la especie colectada en LA (sp4) fue identificada como cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*. Sin embargo, al momento de esta publicación no se tiene la información de la consulta realizada al Museo de Londres. Las descripciones realizadas en este estudio se muestran a continuación:

### **Morfoespecie 1: basada en VA11**

**Macho.** Largo 9.00 mm; ancho 2.40 mm. Cuerpo pequeño, ovoide, de color café oscuro excepción del pronoto, escutelo, margen lateral y sutural de los élitros, pro y mesotórax café oscuro a negro; trocánteres y parte basal de los fémures amarillos; pronoto con dos manchas rojizas. Aparato luminoso ocupa toda la superficie de los esternitos 5-6 y un tercio del esternito 4.

**Cabeza.** Espacio interocular (0.50 mm) cóncavo, brillante y espaciadamente piloso; frente vertical; distancia interantenal la mitad del ancho de la fosita antenal (0.07 mm x 0.14 mm); ojos finamente facetados, muy desarrollados, esféricos, igual de largos que anchos (0.96 mm x 0.96 mm); antenas filiformes, 2-2.5 veces más largas que el pronoto, sobrepasando las mesocoxas, con sedas abundantes, escapo alcanzando 0.50 mm de longitud, claviforme, un poco más corto que los dos siguientes antenómeros juntos; sutura frontoclipeal membranosa, cóncava; clipeo trapezoidal, el borde anterior con una hendidura, superficie con sedas largas regularmente distribuidas; mandíbulas robustas, con pocas sedas externas y terminadas en un estilete agudo; labro membranoso; palpómero maxilar apical securiforme (0.29 mm), aproximadamente dos veces más largo que los anteriores; el labial en forma securiforme.

**Tórax.** Pronoto más ancho que largo (2.58 mm x 1.80 mm), semicircular, borde posterior recto, ángulos posteriores puntiagudos, disco cóncavo, lados anchamente explanados, superficie brillante, porosa, con una larga y abundante pilosidad decumbente; escutelo triangular, superficie plana y pilosa, con el borde posterior redondeado; élitros paralelos, más de cinco veces más largos que anchos (7.05 mm x 1.20 mm), superficie rugosamente punteada, brillante y con pilosidad decumbente; espiráculos respiratorios mesotorácicos tubulares; patas semejantes entre sí, fémures fusiformes, aplanados, tibias aplanadas, borde externo entero, tarsómeros lateralmente no comprimidos, primer metatarsómero (0.36 mm) la mitad de longitud del segundo, un tercio de tercero, similar al cuarto y quinto, uñas simples.

**Abdomen.** Con 8 esternitos visibles, esternitos 1-4 de longitud semejante (0.54-0.60 mm), esternitos 5-6 semejantes a los anteriores, con puntuaciones estigmatiformes, borde posterior de los esternitos 5-6 ligeramente escotado, el séptimo cóncavo, el octavo ojival, borde posterior del pigidio redondeado; edeago robusto, en forma de S, con la pieza basal amplia, dos excrecencias de color oscuro que sobresalen del lóbulo medio, lóbulos laterales no soldados, redondeados, cubriendo casi por completo al lóbulo medio en su parte dorsal, con el ápice obtuso, parte dorsal ligeramente esclerosada y la ventral membranosa.

**Variación.** La talla que va desde los 7.50 mm a 9.00 mm de largo y el ancho va de 2.40 mm a 2.7 mm.

## **Morfoespecie 2, basada en RH14**

**Macho.** Largo 8.10 mm; ancho 2.10 mm. Cuerpo pequeño, oblongo, pro y mesotórax de color café oscuro excepción del pronoto, escutelo, margen lateral y sutural de los élitros amarillo claro; trocánteres y parte basal de los fémures amarillos; pronoto con dos manchas rojizas. Aparato luminoso ocupa toda la superficie de los esternitos 5-6.

**Cabeza.** Espacio interocular (0.60 mm) excavado, brillante y espaciadamente piloso; frente vertical; distancia interantenal la mitad del ancho de la fosita antenal (0.10 mm x 0.21 mm); ojos finamente facetados, muy desarrollados, esféricos, igual de largos que anchos (0.90 mm x 0.90 mm); antenas filiformes, dos veces más largas que el pronoto, sobrepasando las mesocoxas, con sedas abundantes, escapo fusiforme, casi igual de largo que los dos antenómeros siguientes juntos (0.57 mm); sutura frontoclipeal membranosa, cóncava; clipeo trapezoidal, el borde anterior recto, superficie con sedas largas regularmente distribuidas; mandíbulas robustas, con pocas sedas externas y terminadas en un estilete agudo; labro membranoso; palpómero maxilar apical fusiforme (0.31 mm), 2.5 veces más largo que los anteriores; el labial en forma fusiforme.

**Tórax.** Pronoto más ancho que largo (2.40 mm x 1.74 mm), semicircular, borde posterior recto, disco cóncavo, lados explanados, superficie brillante, porosa, con una corta pilosidad decumbente; escutelo triangular, superficie cóncava y pilosa, con el borde posterior redondeado; élitros ovoides, más largos que anchos (6.45 mm x 1.05 mm), superficie rugosamente punteada, brillante y con abundante pilosidad decumbente; espiráculos respiratorios mesotorácicos tubulares; patas semejantes entre sí, fémures fusiformes, aplanados, tibias aplanadas con el ápice más ancho, borde externo entero, tarsómeros lateralmente comprimidos, primer metatarsómero (0.30 mm) similar en longitud al segundo y cuarto, un tercio del tercero y quinto, uñas simples.

**Abdomen.** Con ocho esternitos visible, esternitos 5-6 semejantes (0.60 mm), más largos que los anteriores, con puntuaciones estigmatiformes, borde posterior de esternitos 5-6 ligeramente escotado, del esternito 7 fuertemente escotado, el octavo ojival, borde posterior del pigidio redondeado; eedeago robusto, en forma de S, con la pieza basal amplia, dos excrecencias de color oscuro que sobresalen del lóbulo medio lóbulos laterales soldados, redondeados, cubriendo casi por completo al lóbulo medio en su parte dorsal, con el ápice obtuso, parte dorsal esclerosada y la ventral membranosa.

**Variación.** La talla que va desde los 8.10 mm a 10.05 mm de largo y el ancho va de 2.10 mm a 3.0 mm.

## **Morfoespecie 3, basada en CC24**

**Macho.** Largo 12.90 mm; ancho 3.30 mm. Cuerpo largo, paralelo, de color negro al igual que el escutelo, a excepción del pronoto, margen lateral y sutural de los élitros amarillo claro, pro y mesotórax café oscuro; trocánteres y parte basal de los fémures ligeramente amarillos; pronoto con dos manchas rojizas. Aparato luminoso ocupa toda la superficie de los esternitos 5-6 y una cuarta parte del esternito 4.

**Cabeza.** Espacio interocular (0.86 mm) excavado, brillante y espaciadamente piloso; frente vertical; distancia interantenal similar a la fosita antenal (0.24 mm x 0.29 mm); ojos finamente facetados, muy desarrollados, esféricos, igual de largos que anchos (1.14 mm x 1.14 mm); antenas filiformes ligeramente aserradas, dos veces más largas que el pronoto, sobrepasando las mesocoxas, con sedas abundantes, escapo tubular, un poco más corto que los dos antenómeros siguientes juntos (0.67 mm); sutura frontoclipeal membranosa, cóncava; clipeo trapezoidal, el borde

anterior curvo, superficie con sedas largas regularmente distribuidas; mandíbulas robustas, con pocas sedas externas; labro membranoso; palpómero maxilar apical securiforme (0.38 mm), casi dos veces más largo que los siguientes dos y tres veces más que el proximal; el labial en forma fusiforme.

**Tórax.** Pronoto más ancho que largo (3.12 mm x 2.64 mm), ojival, borde posterior recto, disco convexo, lados explanados, superficie brillante, porosa, con una corta pilosidad decumbente; escutelo triangular, superficie cóncava y pilosa, con el borde posterior redondeado; élitros paralelos, entre cinco y seis veces más largos que anchos (10.35 mm x 1.65 mm), superficie rugosamente punteada, brillante y con pilosidad decumbente; espiráculos respiratorios mesotorácicos membranosos; patas semejantes entre sí, fémures fusiformes, aplanados, tibias aplanadas con el ápice más ancho, borde externo entero, tarsómeros lateralmente comprimidos, primer metatarsómero (0.54 mm) casi el doble de largo del segundo que los siguientes cuatro, uñas simples.

**Abdomen.** Con ocho esternitos visibles, esternitos 5-6 más largos que los anteriores (1.08 mm) e igual de largos que el esternito 1, con puntuaciones estigmatiformes, borde posterior de esternitos 5-6 ligeramente escotados, esternito 7 cóncavo y el octavo ojival, borde posterior del pigidio agudo; eedeago en forma de S, con la pieza basal amplia y el borde posterior obtuso, dos excrecencias de color oscuro que sobresalen del lóbulo medio lóbulos laterales no soldados, redondeados, sobrepasando al lóbulo medio en su parte dorsal, con el ápice obtuso, parte dorsal esclerosada la y ventral parcialmente esclerosada y el resto membranoso, orificio terminal.

**Variación.** La talla que va desde los 10.80 mm a 12.90 mm de largo y el ancho va de 2.40 mm a 3.30 mm.

#### **Morfoespecie 4, basada en LA21**

**Macho.** Largo 7.35 mm; ancho 2.10 mm. Cuerpo pequeño, oblongo, de color café oscuro al igual que el escutelo, margen lateral y sutural de los élitros, a excepción del pronoto amarillo claro, pro y mesotórax; trocánteres y parte basal de los fémures café oscuro; pronoto con dos manchas rojizas. Aparato luminoso ocupa toda la superficie de los esternitos 5-6 y parte del esternito 7.

**Cabeza.** Espacio interocular (0.40 mm) profundamente excavado, brillante y espaciadamente piloso; frente vertical; distancia interantenal aproximadamente la mitad de la fosita antenal (0.07 mm x 0.12 mm); ojos finamente facetados, muy desarrollados, esféricos, igual de largos que anchos (0.72 mm x 0.72 mm); antenas filiformes, dos veces más largas que el pronoto, sobrepasando las mesocoxas, con sedas largas y abundantes, escapo en forma de garrote, un poco más largo que los dos antenómeros siguientes juntos (0.45 mm); sutura frontoclipeal membranosa, cóncava; clipeo trapezoidal, el borde anterior curvo, superficie con sedas largas regularmente distribuidas; mandíbulas delgadas, con pocas sedas externas; labro membranoso; palpómero maxilar apical securiforme (0.21 mm), dos veces más largo que los anteriores; el labial en forma securiforme.

**Tórax.** Pronoto más ancho que largo (2.04 mm x 1.44 mm), semicircular, borde posterior ondulado, ángulos posteriores un tanto agudos, disco plano, explanaciones laterales, superficie brillante, porosa, con una corta pilosidad decumbente; escutelo triangular, superficie cóncava y pilosa, con el borde posterior redondeado; élitros semi-paralelos, entre 5.5 y 5.7 veces más largos que anchos (6.00 mm x 1.05 mm), superficie rugosamente punteada, opaca y con pilosidad

decumbente; espiráculos respiratorios mesotorácicos membranosos; patas semejantes entre sí, fémures fusiformes, aplanados, tibias aplanadas con el ápice más ancho, borde externo entero, tarsómeros lateralmente no comprimidos, primer metatarsómero (0.24 mm) la mitad de largo que el segundo, cuarto y quinto, casi cuatro veces más largo que el tercero, uñas simples.

**Abdomen.** Con ocho esternitos visibles, 5-6 más largos que los anteriores (0.54-0.60 mm), con puntuaciones estigmatiformes, borde posterior de esternitos 5-6 ligeramente escotados, esternito 7 cóncavo y el octavo ojival, borde posterior del pigidio agudo; espiráculos abdominales dorsalmente abiertos; edeago en forma de S, con la pieza basal amplia y el borde posterior obtuso, dos excrecencias de color oscuro que sobresalen del lóbulo medio, lóbulos laterales no soldados, redondeados, sobrepasando al lóbulo medio en su parte dorsal, con el ápice obtuso, parte dorsal esclerosada la y ventral parcialmente esclerosada.

**Variación.** La talla que va desde los 6.45 mm a 7.65 mm de largo y el ancho va de 2.10 mm a 2.40 mm.

### **Morfoespecie 5, basada en RH33**

**Macho.** Largo 6.00 mm; ancho 1.80 mm. Cuerpo pequeño, ovado-oblongo, de color café oscuro al igual que el escutelo, a excepción del pronoto, margen lateral y sutural de los élitros amarillos, pro y mesotórax; trocánteres y parte basal-media de los fémures amarillos; pronoto con dos manchas rojizas. Aparato luminoso ocupa toda la superficie de los esternitos 5-6.

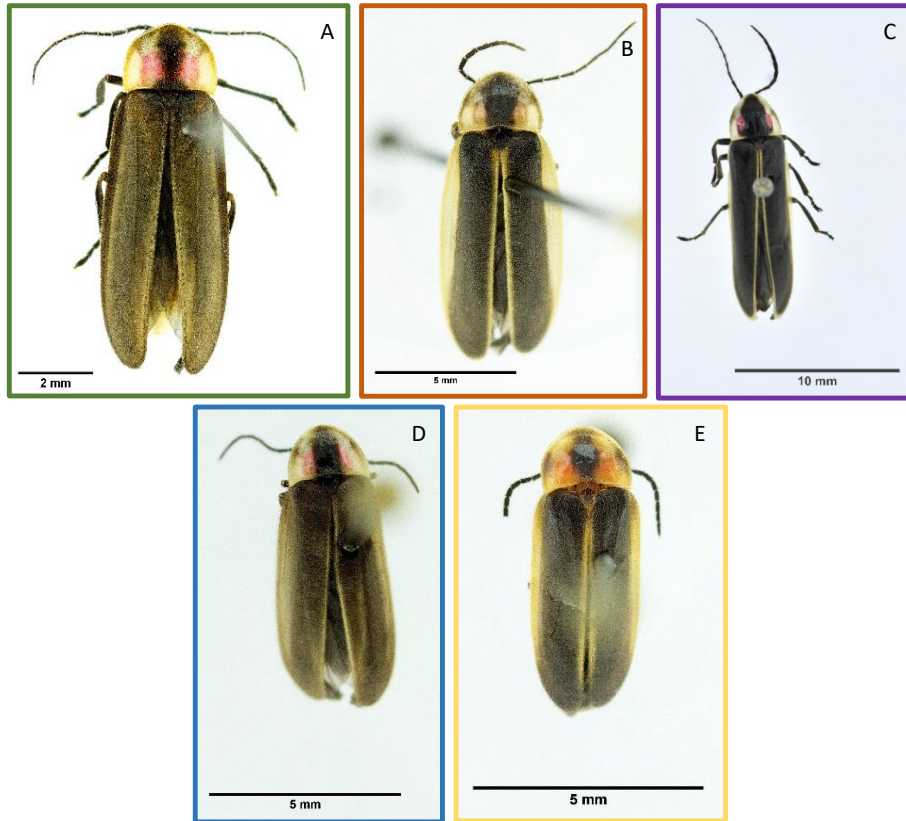
**Cabeza.** Espacio interocular (0.57 mm) profundamente excavado, brillante y espaciadamente piloso; frente vertical; distancia interantenal igual a la fosita antenal (0.12 mm x 0.12 mm); ojos finamente facetados, muy desarrollados, esféricos, igual de largos que anchos (0.66 mm X 0.66 mm); antenas filiformes, dos veces más largas que el pronoto, sobrepasando las mesocoxas, con sedas abundantes y terminadas en un estilete agudo, escapo en forma de garrote, un poco más corto que los dos antenómeros siguientes juntos (0.38 mm); sutura frontoclipeal membranosa, cóncava; clipeo trapezoidal, el borde anterior curvo, superficie con sedas largas regularmente distribuidas; mandíbulas delgadas, con pocas sedas externas; labro membranoso; palpómero maxilar apical securiforme (0.21 mm), dos veces más largo que los anteriores; el labial en forma fusiforme.

**Tórax.** Pronoto más ancho que largo (1.92 mm x 1.20 mm), semicircular, borde posterior recto, ángulos posteriores ligeramente agudos, disco convexo, lados explanados, superficie brillante, porosa, con una corta pilosidad decumbente; escutelo triangular, superficie cóncava y pilosa, con el borde posterior redondeado; élitros semi-paralelos, 5.5 veces más largos que anchos (4.95 mm x 0.90 mm), superficie rugosamente punteada, brillante y con abundante pilosidad decumbente; espiráculos respiratorios mesotorácicos membranosos; patas semejantes entre sí, fémures fusiformes, aplanados, tibias aplanadas, borde externo entero, tarsómeros lateralmente no comprimidos, primer metatarsómero (0.18 mm) casi dos veces más largo que los siguientes cuatro, uñas simples.

**Abdomen.** Con ocho esternitos visibles, 5-6 más largos que los anteriores (0.60 mm), con puntuaciones estigmatiformes, borde posterior de esternitos 5-6 fuertemente escotados, esternito 7 cóncavo y el octavo ojival, borde posterior del pigidio ondulado; edeago en forma de S, con la pieza basal amplia y el borde posterior obtuso, excrecencias que sobresalen del lóbulo basal en forma de corazón, lóbulos laterales no soldados, redondeados, sobrepasando al lóbulo medio en su parte

dorsal, con el ápice obtuso, parte dorsal esclerosada la y ventral parcialmente esclerosada y el resto membranosos.

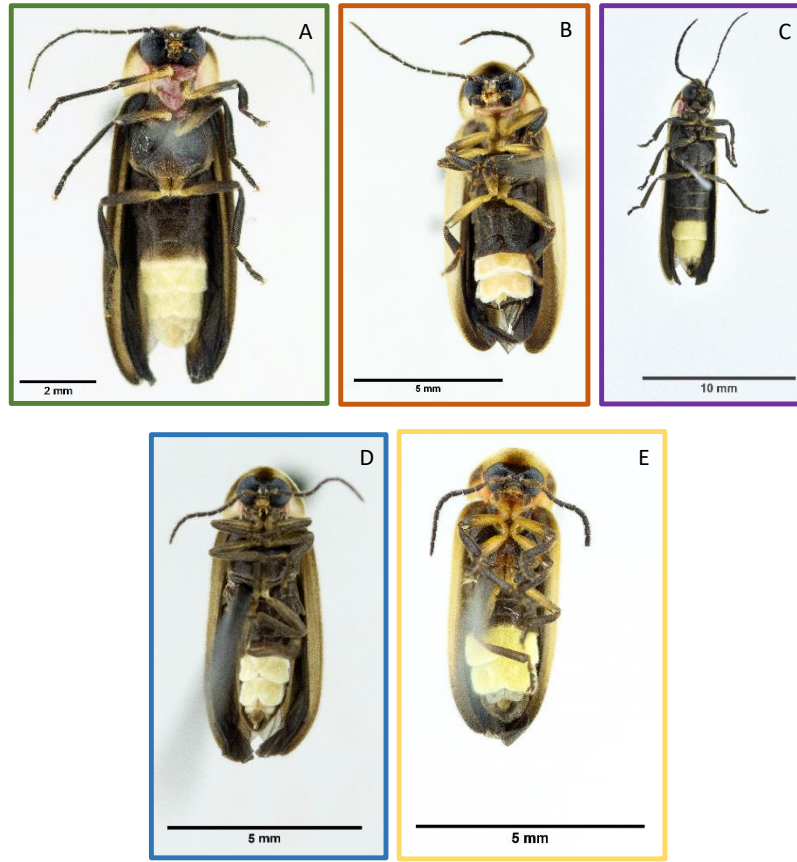
**Variación.** La talla que va desde los 6.00 mm a 6.15 mm de largo y el ancho va de 1.80 mm a 2.10 mm.



**Figura 8.** Vistas dorsales de las cinco especies identificadas en este estudio: A) sp1 especie cercana a *Photinus picticollis*, B) sp2 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, C) sp3 especie cercana a *Photinus cinctellus*, D) sp4 especie cercana *Photinus pulchellus* o *P. affinis* a y E) sp5 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*.

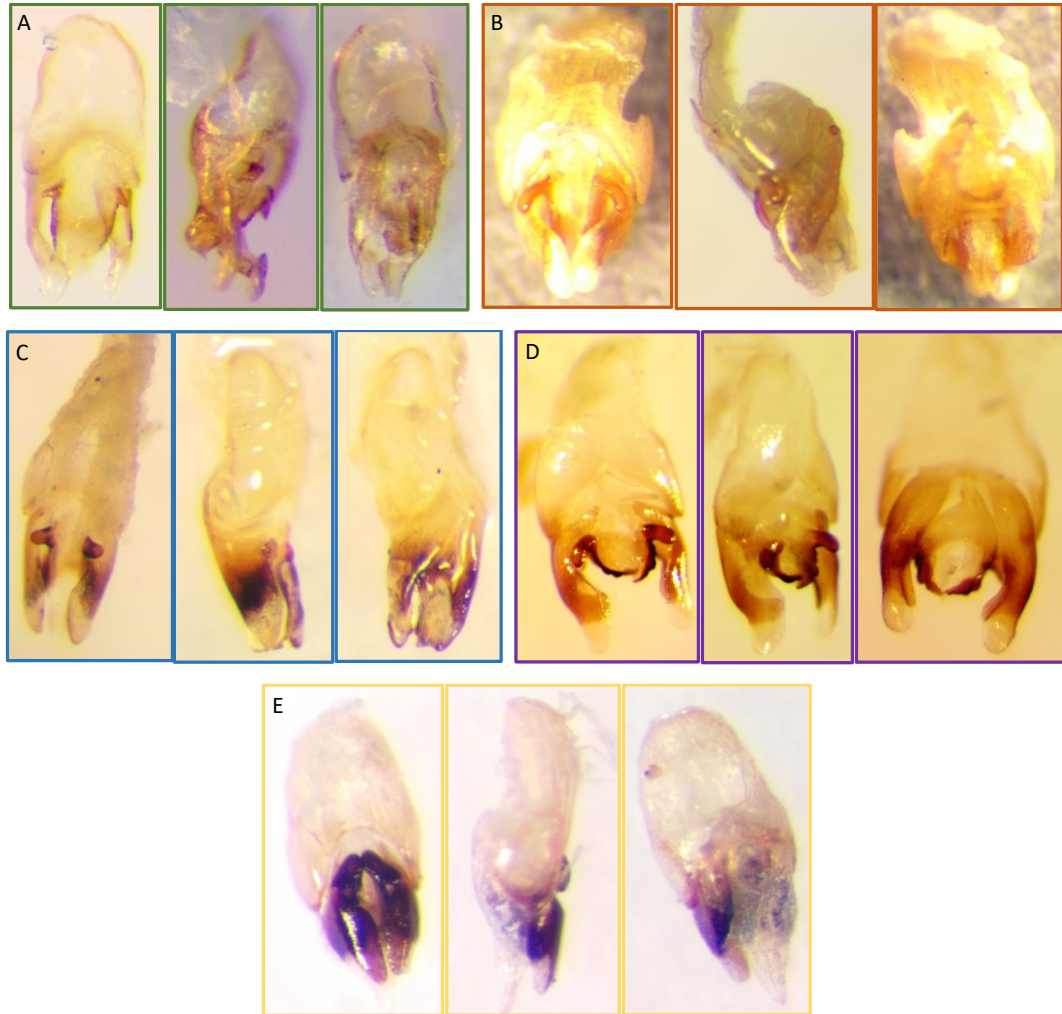
Crédito de las fotografías: José Monzón.





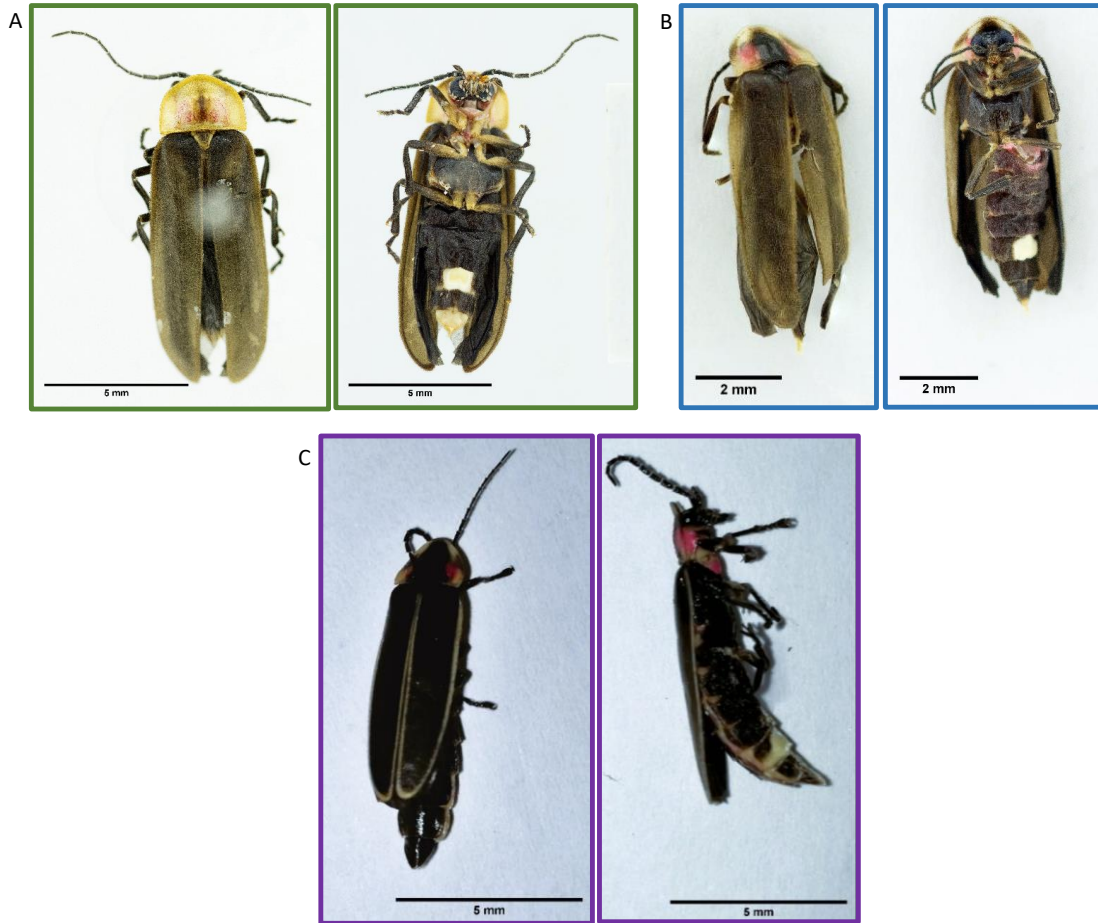
**Figura 9.** Vistas ventrales de las cinco especies identificadas en este estudio: A) sp1 especie cercana a *Photinus picticollis*, B) sp2 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, C) sp3 especie cercana a *Photinus cinctellus*, D) sp4 especie cercana *Photinus pulchellus* o *P. affinis* a y E) sp5 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*.

Crédito de las fotografías: José Monzón.



**Figura 10.** Vistas dorsales, laterales y ventrales de los edeagos de las cinco especies identificadas en este estudio: A) sp1 especie cercana a *Photinus picticollis*, B) sp2 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, C) sp4 especie cercana *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, D) sp3 especie cercana a *Photinus cinctellus* y E) sp5 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*.

Crédito de las fotografías: Claudia Pérez.



**Figura 11.** Vistas dorsales y ventrales de las hembras de tres especies identificadas en este estudio: A) sp1 especie cercana a *Photinus picticollis*, B) sp4 especie cercana a *Photinus pulchellus* o *P. affinis*, C) sp3 especie cercana a *Photinus cinctellus*.

Crédito de las fotografías: Claudia Pérez.

## F. Análisis molecular

En el **Cuadro 10** se observa la cuantificación de las extracciones de ADN. También se muestran los valores de calidad de ADN: A260/A280 que indica la presencia de contaminación por proteínas, los valores deberían ser cercanos a 1.8 para que el ADN sea considerado “puro”, mientras que los valores de absorbancia A260/A230, que indican presencia de carbohidratos y fenoles, deberían ser cercanos a 2.0-2.2. En general, se obtuvo un buen rendimiento en cuanto a concentración de ADN, así como en calidad.

Las muestras secuenciadas con COI mostraron una banda de ~750 pb (Anexo G, Figura 18). Sin embargo, desde un inicio la optimización de la amplificación del gen *wingless* resultó difícil. A pesar de haber aislado exitosamente una de las bandas de interés (Anexo G, Figura 19), los resultados de calidad y el alineamiento de estas secuencias no fueron exitosos. Las secuencias obtenidas de la banda aislada no se alinearon correctamente con las secuencias de la búsqueda realizada en Geneious (Photinus AND wg). Por lo tanto, estas secuencias fueron descartadas del análisis bioinformático posterior y solo se incluyó el gen COI para la reconstrucción filogenética.

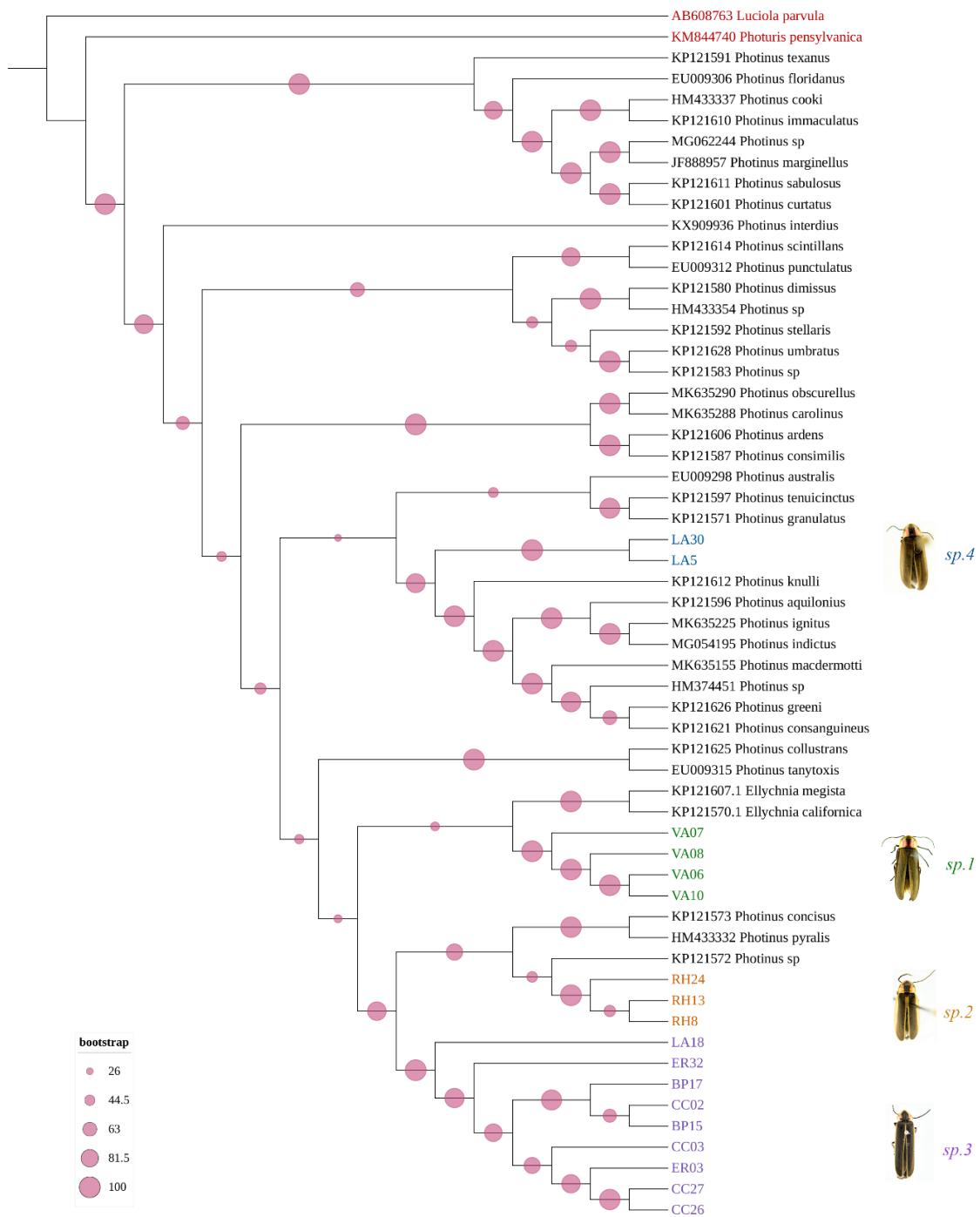
**Cuadro 10.** Cuantificación de las extracciones de ADN de luciérnagas del género *Photinus*.

Código	Concentración [ng/μl]	A260/A280	A260/A230
CC02	225.7	1.80	1.21
CC03	509.9	1.31	0.82
CC26	484.3	1.75	0.99
CC27	246.6	1.74	0.99
ER02	433.5	1.80	1.14
ER03	456.7	1.78	1.05
ER26	331.1	1.84	1.48
ER32	314.4	1.75	0.96
BP14	360.2	1.81	1.33
BP15	440.0	1.75	1.27
BP16	31.8	0.57	0.47
BP17	39.3	0.58	0.51
LA5	43.1	1.61	1.15
LA18	134.4	1.46	1.18
LA30	106.7	1.7	1.07
RH8	370.5	1.64	0.85
RH13	171.3	1.18	0.79
RH24	178.7	1.56	0.77
VA06	538.7	1.68	0.86
VA07	218.0	1.75	1.14
VA08	431.3	1.66	0.78
VA10	289.6	1.73	0.94

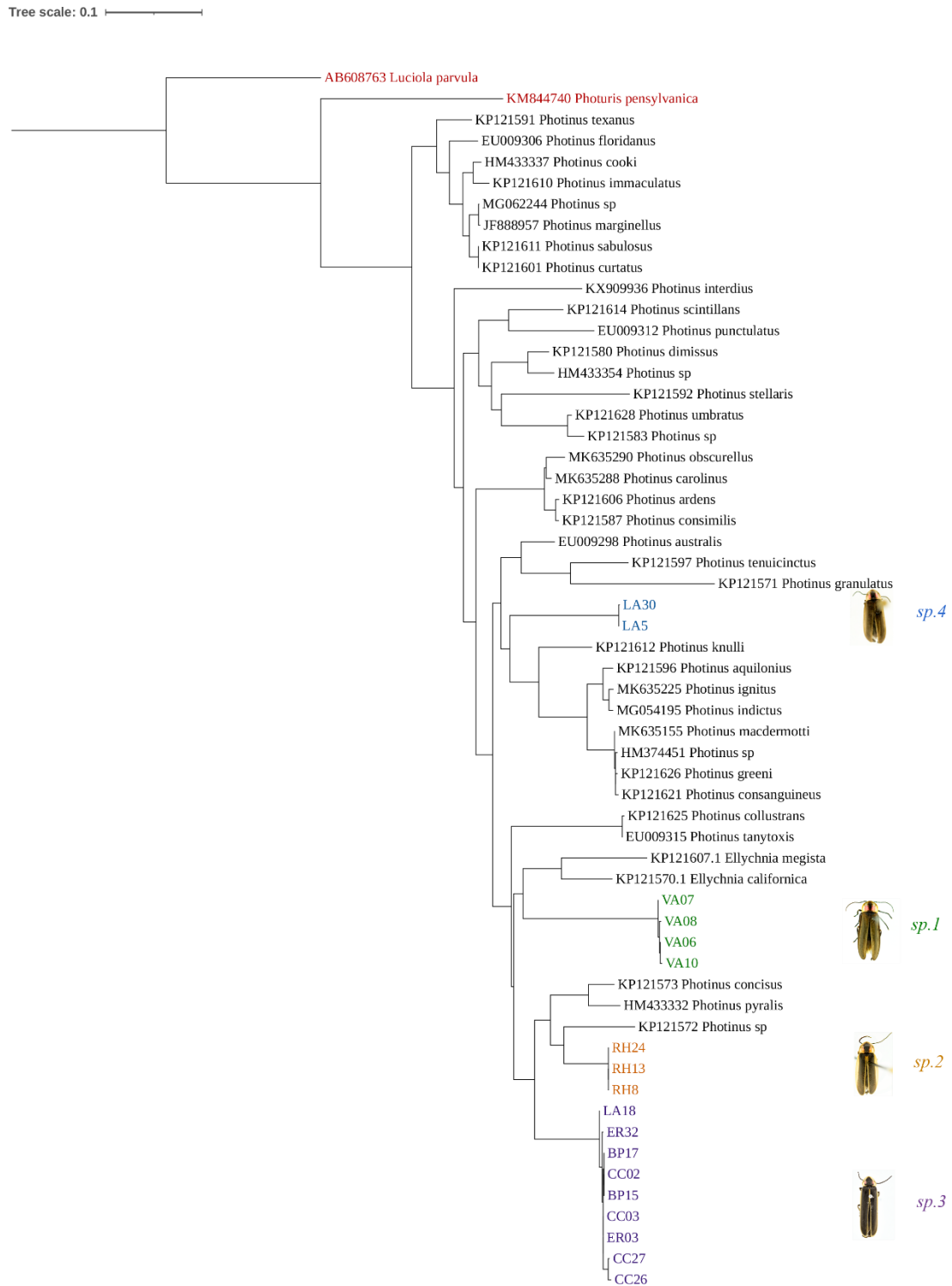
## G. Reconstrucciones filogenéticas

El árbol ML obtuvo un valor óptimo de verosimilitud logarítmica de -10503.835. ModelTest mostró el modelo GTR+F+R4 como el más apropiado para el análisis de estos datos. La composición de las bases fue la siguiente: A, 29.7%; C, 17.4%; G, 16.2%; T, 36.7%. En el árbol se muestran los valores de UFB (**Figura 12A-12B**). Se observa claramente la separación de cuatro clados que corresponden a cuatro de las especies identificadas previamente por análisis morfométricos y taxonómicos: sp1, sp2, sp3 y sp4. Al mismo tiempo, ninguna de las especies colectadas en este estudio se agrupa con alguna de las secuencias obtenidas de NCBI. Sin embargo, hay que resaltar que para este análisis no se cuenta con las secuencias de sp5 de la localidad RH, pero no se descarta que se pueda secuenciar el gen cuando se tenga material biológico disponible.

En el árbol bayesiano se obtuvieron valores de ESS >100 en promedio y de PSRF+ cercanos a 1. Al comparar con el árbol construido a partir de análisis bayesiano (**Figura 13A-13B**), se obtuvo una topología similar a la del árbol filogenético construido con el método de ML. Sin embargo, resaltan cambios respecto a las morfoespecies sp1 y sp4, así como varias politomías en algunos clados. Tal es el caso de *P. consanguineus*, *P. greeni* y *P. sp.*, así como en algunos de los individuos de la sp2 y sp3.



**Figura 12A.** Reconstrucción filogenética del género *Photinus*, incluyendo las especies de este estudio, con base en el método de Máxima Verosimilitud y utilizando el gen COI. El soporte de los nodos se estimó con 1000 iteraciones de ultrafast Bootstrap (UFB). Cada color es distintivo por especie: verde = sp1, anaranjado = sp2, morado = sp3, azul = sp4 y rojo = outgroups.



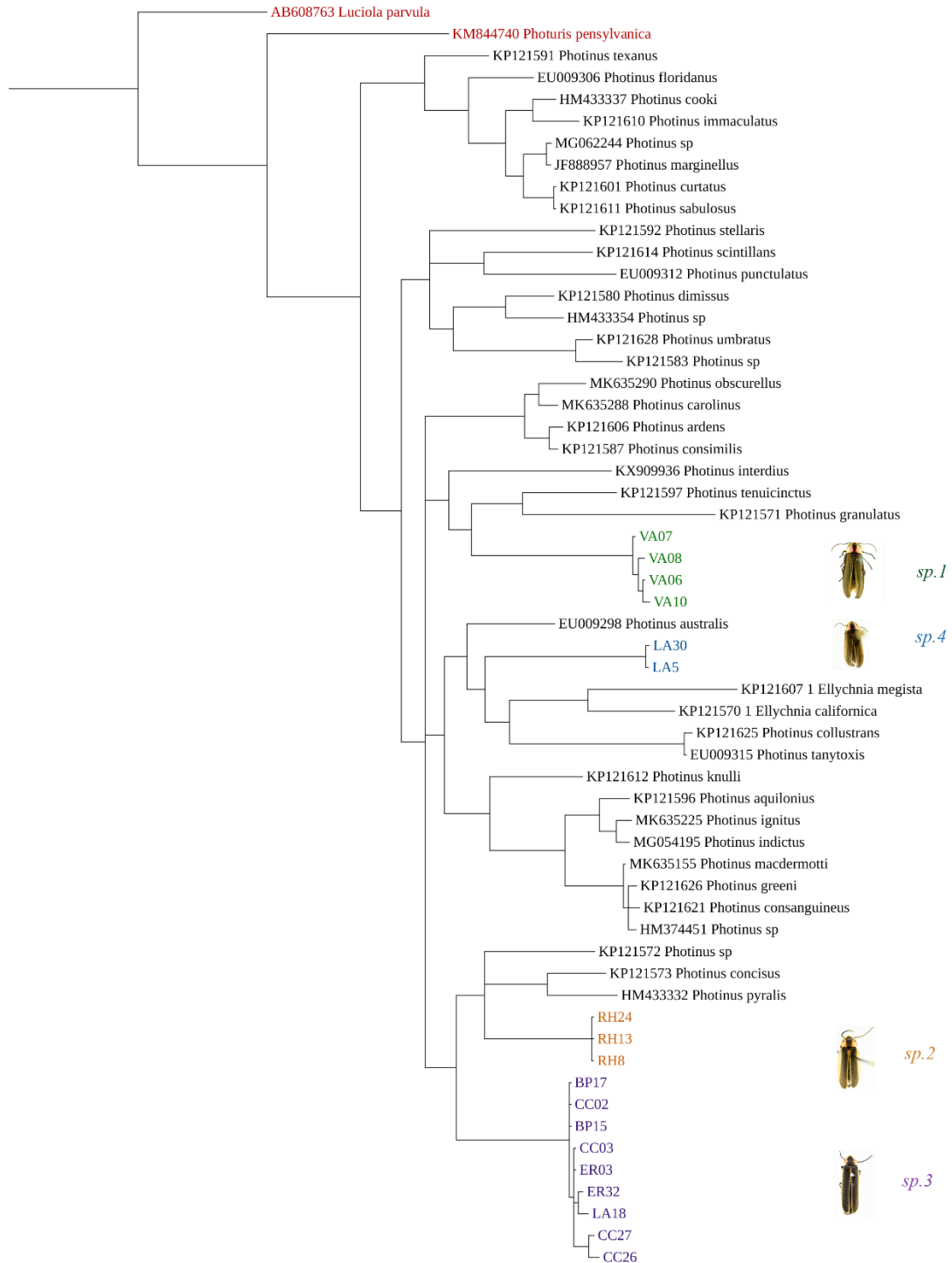
**Figura 13B.** Reconstrucción filogenética del género *Photinus*, incluyendo las especies de este estudio, con base en el método de Máxima Verosimilitud y utilizando el gen COI. La longitud de las ramas corresponde a la escala con el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. El soporte de los nodos se estimó con 1000 iteraciones de ultrafast Bootstrap (UFB). Cada color es distintivo por especie: verde = sp1, anaranjado = sp2, morado = sp3, azul = sp4 y rojo = outgroups.



**Figura 14A.** Reconstrucción filogenética del género *Photinus*, incluyendo las especies de este estudio, con base en el método bayesiano y utilizando el gen COI. La longitud de las ramas corresponde a la escala con el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. El soporte de los nodos se estimó con 1000 iteraciones de ultrafast Bootstrap (UFB). Cada color es distintivo por especie: verde = sp1, anaranjado = sp2, morado = sp3, azul = sp4 y rojo = outgroups.



Tree scale: 0.1



**Figura 15B.** Reconstrucción filogenética del género *Photinus*, incluyendo las especies de este estudio, con base en el método bayesiano y utilizando el gen COI. La longitud de las ramas corresponde a la escala con el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. El soporte de los nodos se estimó con 1000 iteraciones de ultrafast Bootstrap (UFB). Cada color es distintivo por especie: verde = sp1, anaranjado = sp2, morado = sp3, azul = sp4 y rojo = outgroups.

## VII. Discusión

### A. Análisis morfométricos

La correcta identificación de especies de luciérnagas es un paso crucial para la comprensión de su biología y conservación. En este sentido, los análisis morfométricos han demostrado ser útiles en la discriminación interespecífica de varios órdenes de insectos (Sontigun *et al.*, 2017). Inicialmente, en este estudio se consideraron a todos los individuos de *Photinus* colectados en RH como la misma especie, ya que fueron colectados en el mismo lugar y fecha. Sin embargo, el PCA (**Figura 6**) confirma que existe una separación entre dos morfoespecies en dicha localidad.

Tomando en cuenta únicamente los análisis morfométricos, tanto en el PCA y el dendrograma se puede observar que la morfoespecie 3 es la más distinta al resto. Por otro lado, existe un solapamiento entre algunas morfoespecies, por ejemplo entre la sp1 y la sp2. Al observar los datos morfométricos, la media de la mayoría de medidas corporales entre estas dos morfoespecies es similar (Anexo D, Cuadro 14). Sin embargo, se puede distinguir ambas especies por la ausencia o presencia de márgenes amarillentos en los élitros de la sp1 y sp2, respectivamente. De igual forma, la sp4 y la sp5 muestran solapamiento, indicando cierta similitud en las medidas corporales. Sin embargo, como se pudo observar en las fotografías (**Figura 8-9**) y el análisis taxonómico, cada una de las especies posee o carece de ciertas características distintivas que permiten discriminarlas. Entre las principales se encuentran: morfología del edeago, forma del pronoto, presencia/ausencia de márgenes amarillentos en los élitros, entre otros.

El dendrograma UPGMA (**Figura 7**) concuerda con las primeras observaciones morfológicas y también con el PCA, en que sp1, sp3 y sp4 corresponden a tres morfoespecies diferentes. Asimismo, también indican la presencia de dos morfoespecies en la localidad RH. Sin embargo, hay que notar la presencia de datos atípicos en las morfoespecies sp3 y sp4 (**Figura 6**). Esto influye directamente en la topología del dendrograma, en el cual se observa que LA4 y VA19, no se agrupan con el resto de sus congéneres. En el caso de estos dos individuos, que son hembras, indica dimorfismo sexual en estas dos morfoespecies. Para futuros análisis sería recomendable añadir una variable de “sexo” para distinguir este tipo de datos, así como aumentar a mínimo 10 individuos por especie. De forma similar el individuo CC28 se agrupa con la morfoespecie sp1, debido a que presenta un tamaño menor al resto de sus congéneres.

Sin embargo, estos resultados son alentadores ya que dan una pauta para poder hacer una identificación preliminar con caracteres morfológicos, de las especies que aún no están identificadas o reportadas para Guatemala. Esta metodología basada en identificación morfométrica, ya ha sido comprobada previamente en otros estudios con invertebrados como dípteros utilizando morfometría de las alas (Sontigun *et al.*, 2017) y en gasterópodos (Doyle *et al.*, 2018).

### B. Taxonomía: retos y oportunidades

Lo importante de este tipo de estudios en los que se utilizan caracteres morfológicos para identificar especies, es que resultan cruciales en taxones con muy poca información genética generada. Por ejemplo, se contrastaron las especies del género *Photinus* encontradas en *Biología Centrali Americana* con distribución en Guatemala, con las especies que tienen información genética para varios genes en NCBI. Los resultados demostraron que no se cuenta, hasta este estudio, con ninguna especie de luciérnaga en Guatemala con datos genéticos. Eso explica por una

parte el que las especies secuenciadas en este estudio no se hayan agrupado con las encontradas en NCBI.

Esto reafirma la importancia de los análisis morfométricos, ya que permitió observar claramente la separación entre grupos diferentes. Es decir, estos resultados concuerdan con otros estudios previos en los que se ha utilizado la morfología para identificar especies de luciérnagas (Zaragoza-Caballero & Navarrete-Heredia, 2014). Adicionalmente, se sugiere que la separación de los géneros de Photinini podría facilitarse al considerar la estructura morfológica del edeago (Green, 1961), considerando que en este estudio se observan diferencias morfológicas en los edeagos de las cinco morfoespecies. Se sugiere considerar: el tamaño y forma de las excrecencias dorso-basales, la forma de los lóbulos laterales y el grado de esclerotización de estas estructuras.

A pesar de haber colectado hembras en al menos tres de las especies (**Figura 11**), hay que resaltar que las descripciones taxonómicas originales suelen estar basadas en machos. Esto implica que hay que continuar con los estudios en luciérnagas hembras (y en larvas también), pues casi no se tiene información de los ciclos de vida y son una parte relevante para la conservación efectiva de este grupo. La siguiente frase lo resume: “*Una taxonomía no resuelta o incluso incorrecta significa que la conservación a nivel de especie no se puede abordar de manera eficiente*” (Strandby *et al.*, 2009).

A pesar de los retos y dificultades en la obtención de descripciones y material para la identificación, hay muchas oportunidades y campo para seguir trabajando con luciérnagas. Se pueden producir claves de identificación utilizables tanto por especialistas como por no especialistas (Strandby *et al.*, 2009), que incluyan fotografías o ilustraciones. También se deben realizar actualizaciones de varias especies que, por ejemplo, han mostrado tener un amplio rango de distribución (en este estudio se determinó que sp3 tiene una distribución más amplia de la que se mostraba en la descripción original. No se descarta que pueda ocurrir lo mismo con otras especies cuya única descripción está desactualizada. Se planea publicar estos resultados en un siguiente artículo de actualización).

### **C. Trabajo de laboratorio**

Desde un inicio fue difícil optimizar la amplificación del gen *wingless* para obtener una sola banda. Al ser cebadores degenerados, se hicieron algunas pruebas preliminares con touchdown PCR, sin obtener una banda aislada (ANEXO G, Figura 22). Al utilizar la temperatura reportada en la literatura (50°C) se obtenían múltiples bandas y al subir la temperatura algunos grados (51-52 °C) para aumentar la especificidad, ya no había productos de amplificación (ANEXO G, Figura 21). Por esta razón fue que se decidió utilizar el protocolo de band-stab para el aislamiento de la banda de interés y al mismo tiempo, ahorrar tiempo y recursos de la optimización del programa de amplificación. Después de dos pruebas, se amplificaron bandas de distinto tamaño (cercano al reportado en la literatura), pero las secuencias obtenidas no alinearon correctamente con las obtenidas de NCBI. Sin embargo, se planea que en estudios posteriores se utilice otro par de cebadores distintos, que han amplificado exitosamente una sola banda correspondiente al gen (Vencl *et al.*, 2017).

Por otro lado, con el gen COI fue posible generar un protocolo optimizado para la amplificación de dicho gen en especies de luciérnagas de Guatemala. El gen COI ya ha sido utilizado previamente para filogenias en insectos (D. R. Maddison, 2012; Selvakumar *et al.*, 2016) y en lampíridos (Sander & Hall, 2015; Stanger-Hall *et al.*, 2007; Vencl *et al.*, 2017). Sin embargo, en estudios previos se ha utilizado una combinación de varios loci, por lo que en futuros análisis se

contempla añadir el gen *wingless* y el gen CAD. En casos en los que las relaciones filogenéticas de especies cercanas sean difíciles de resolver, se recomienda utilizar análisis genómicos.

#### D. Reconstrucciones filogenéticas

El árbol filogenético actualizado (**Figuras 12-13**) del género *Photinus* concuerda en su mayoría con la topología de las últimas filogenias reportada en la literatura, aunque estas se basan en sets de tres genes COI, 16s y *wingless* (Vencl *et al.*, 2017); COI, *wingless* y CAD en (Stanger-Hall & Lloyd, 2015). En (Martin *et al.*, 2017) también utilizaron tres genes mitocondriales (12S, 16S, COI) y tres nucleares (18S, 28S y *wingless*), además de incorporar datos morfológicos a su filogenia. En contraste a esta última reconstrucción filogenética, hay diferencias respecto a algunas relaciones. Por ejemplo, en nuestro estudio no se observa relación entre *P. floridanus* y *P. curtatus*, o *P. macdermotti* y *P. punctulatus*. Sin embargo, hay que notar que (Martin *et al.*, 2017) no incluye todas las especies del género *Photinus* y nuestro análisis solo utiliza el gen COI. Por último, hay que resaltar que en este estudio también se observa al género *Ellychnia* embebido en el género *Photinus*.

Al comparar con la filogenia de luciérnagas norteamericanas solamente del género *Photinus* y *Ellychnia* (Stanger-Hall & Lloyd, 2015), se observan algunas discordancias con los grupos que ellos proponen. Por ejemplo, el grupo *Pyrallis* permanece prácticamente igual, solamente que en nuestro estudio se observa una afiliación taxonómica a la morfoespecie sp2. El grupo *Ellychnia* permanece cercano al *Pyrallis* y a la morfoespecie sp1 en el árbol ML, pero en el árbol bayesiano estas relaciones cambian completamente. El grupo *Punctulatus* 1 también se separa en este estudio tanto en el árbol ML como bayesiano. En cambio, los grupos *Punctulatus* 2, *Ardens*, *Consanguineus* y *DIV I* permanecen prácticamente iguales en ambos casos. Debido a un error metodológico no se incluyó en este estudio a *P. brimleyi*, pero se sugiere incluirlo en futuros análisis. Por lo tanto, la filogenia de este estudio basada en el gen COI, muestra que algunos grupos tienen relaciones filogenéticas distintas a las observadas en estudios previos.

Adicionalmente, es importante notar las similitudes e incongruencias entre el árbol ML y bayesiano, específicamente en las relaciones de las morfoespecies sp1 y sp4. En el árbol ML la sp1 está posicionada cercana al género *Ellychnia*, siendo esta última una especie diurna sin luz, aunque el soporte del nodo es muy bajo (SH-aLRT = 74.2, UFB = 36), mientras que en el árbol bayesiano esta morfoespecie está más relacionada con *P. tenuicinctus* y *P. granulatus* (PP = 0.78). Sin embargo, para la sp4 ocurre justamente lo contrario. En el árbol ML esta es más cercana a *P. tenuicinctus* y *P. granulatus*, mientras que en el árbol bayesiano se agrupa con *Ellychnia*. Por otro lado, los dos métodos de reconstrucción filogenética muestran a la morfoespecie 2 relacionada con el grupo de *P. pyralis*, *P. concisus* y *P. sp.* Mientras que la morfoespecie 3 mantiene también su relación con el grupo anterior y el soporte de este nodo en ambos tipos de árbol es relativamente alto (UFB = 88, PP = 0.97).

Estas relaciones observadas podrían apoyar la hipótesis de que el origen de algunas especies en Norteamérica (ej. *Photinus pyralis*) sea Centroamérica nuclear (Catalán *et al.*, 2019). La morfoespecie sp2 forma un grupo hermano con el grupo *Pyrallis* mencionado anteriormente (SH-aLRT = 84.9, UFB = 76, PP = 0.92). A su vez la morfoespecie sp3 es el grupo hermano de *Pyrallis*-sp2, con un alto soporte del nodo (SH-aLRT = 92.4, UFB = 88, PP = 0.97). La morfoespecie sp1 parece ser también grupo hermano de los dos clados anteriores, pero el soporte de este nodo es bajo en el árbol ML (SH-aLRT = 38.4, UFB = 32) y no está resuelto en el árbol bayesiano. Lo cual implica que hasta tener más loci sería posible resolver estas relaciones. Finalmente, en el árbol ML

la sp4 se posiciona como basal al grupo *Consanguineus* con un alto soporte. La hipótesis inicial podría estudiarse posteriormente incluyendo en el análisis más especies de *Photinus* de Guatemala o Centroamérica.

Aunque la divergencia genética por sí misma no es suficiente para que dos grupos taxonómicos puedan ser considerados especies distintas (Ferguson, 2022), sí nos puede proveer una aproximación a qué tan distintos son dos taxones o individuos. El árbol de ML (**Figura 12B**) muestra la escala de divergencia genética. Se puede observar que las cuatro morfoespecies analizadas genéticamente en este estudio, muestran poca o ninguna divergencia genética intraespecífica. Se observa un fenómeno similar en el grupo de *P. consanguineus*, *P. greeni* y *P. sp.* Al contrastar con la reconstrucción filogenética bayesiana, se generaron politomías en tres grupos: en tres de los individuos de sp2 y sp3, además del grupo *consanguineus-greeni-sp-macdermotti*. De las primeros dos morfoespecies, se puede explicar la politomía causada por secuencias que son exactamente idénticas (RH13 y RH8; CC02 y BP15).

Otra razón para explicar las relaciones no resueltas en el árbol bayesiano (**Figura 13A-13B**), es que el árbol consenso puede producir una topología con buen soporte, pero sin resolver. Sin embargo, cuando la topología es más importante que los tiempos de divergencia, es aceptable usar el árbol consenso (Heled & Bouckaert, 2013). En todo caso, se requieren más esfuerzos para generar datos genéticos de estas especies y de luciérnagas en general. La integración de nuevos loci al análisis podrían ayudar a resolver los casos donde el soporte de los nodos sea muy bajo o las relaciones no estén completamente resueltas. Con este mismo objetivo, la secuenciación del genoma completo de estas especies representaría un avance muy importante y contribuiría a futuros estudios filogenéticos y evolutivos (T. R. Fallon *et al.*, 2018) en Guatemala y la región.

## **E. Importancia de unificar morfología y genética**

En pleno apogeo de la genómica, algunos autores se cuestionan la utilidad de los análisis morfológicos en la reconstrucción de filogenias (Scotland *et al.*, 2003; Wortley & Scotland, 2006). Sin embargo, otros estudios resaltan la importancia de seguir recopilando datos morfológicos (Will & Rubinoff, 2004) por varias razones. En primer lugar, permite resolver las relaciones filogenéticas entre taxones fósiles y los taxones existentes. En segundo lugar, para algunos taxones es difícil el acceso a material genético (ej. Número limitado de especímenes o preservación perjudicial en colecciones, distribución limitada, destrucción de hábitat, entre otros) (Wiens, 2004). Sin embargo, al utilizar estudios morfológicos se tiene que tomar en cuenta que algunos caracteres pueden ser resultado de evolución convergente y se podría observar caracteres similares en linajes distantes (Castiglione *et al.*, 2019). También es importante descifrar si la similitud entre especies refleja un proceso de evolución convergente o inercia filogenética (Tosso *et al.*, 2019).

Esto resalta la importancia de acompañar los datos morfológicos con información genética. Sobre todo, se tiene un enorme potencial a partir de especímenes de colecciones (Mandrioli, 2008). En los últimos años, se han desarrollado metodologías que permiten obtener ADN de coleópteros preservados sin comprometer la integridad del espécimen (Gilbert *et al.*, 2007). En futuros estudios, esto podría ser aplicado a las luciérnagas que aún permanecen sin identificación taxonómica y/o genética en las colecciones de universidades en Guatemala, sustituyendo en algunos casos la necesidad de realizar nuevas colectas. Para que esto sea exitoso, es necesario un buen mantenimiento, así como una actualización constante de las colecciones.

Los resultados morfométricos nos pueden ayudar a complementar las reconstrucciones filogenéticas basadas en genes. En las filogenias moleculares se pueden dar casos en los que clados

son estadísticamente soportados, pero que son incorrectos y esto se debe a varios factores, principalmente: desviación entre árboles de genes y especies, y errores metodológicos como la atracción de ramas largas (Wiens, 2004). En otros casos, se observan incongruencias entre marcadores nucleares y mitocondriales, que también pueden ser resultado de diferencias en los métodos y análisis (Sota & Vogler, 2001). Aunque los análisis moleculares tienen muchas ventajas, es crucial que como científicos nos entrenemos en sistemática basada en morfología, sobre todo en grupos poco estudiados (Wiens, 2004). Por otro lado, los análisis genéticos (ej. *DNA barcoding*) nos ayudarían en la identificación de especies crípticas (Kress & Erickson, 2008).

En este estudio, al contrastar la topología del dendrograma UPGMA con los árboles filogenéticos, se puede observar cierta correspondencia entre las mediciones morfométricas y los análisis genéticos con COI. Sin embargo, aunque se puede observar en el dendrograma que la morfoespecie sp2 es más parecida morfológicamente a la sp1, genéticamente la primera está más relacionada con la sp3. Esto resalta una vez más la necesidad de complementar datos morfométricos y filogenéticos para la identificación de especies. Finalmente, considero que es importante completar este tipo de estudios con un enfoque holístico, que integre genética, morfología, comportamiento y ecología, entre otros.

## VIII. Conclusiones

- En este estudio, se identificaron cinco morfoespecies de luciérnagas del género *Photinus*, con base en análisis morfométricos y taxonómicos, así como la morfología del edeago. Las reconstrucciones filogenéticas, basadas en el gen COI, también permitieron distinguir entre cuatro morfoespecies genéticamente distintas.
- Con base en los análisis morfométricos y taxonómicos, la morfoespecie sp3 es la más distinta a las otras cuatro morfoespecies. Aunque existe sobrelape en las medidas morfométricas entre la morfoespecie sp1-sp2 y sp4-sp5, es posible separar a estas morfoespecies con base en sus caracteres morfológicos y el gen COI.
- Las reconstrucciones filogenéticas, basadas en el gen COI, muestran evidencia que apoyan la hipótesis de un posible origen centroamericano de algunas especies norteamericanas (grupo *Pyrallis*).
- Este es el primer estudio en Guatemala que unifica datos morfométricos, taxonomía y genética para identificar luciérnagas del género *Photinus*. La metodología empleada tiene potencial aplicación a otros taxones.
- Se generaron secuencias del gen COI para cuatro especies que no se encontraban en NCBI u otras bases de datos genéticos. La generación de estos datos es de vital importancia para continuar estudios de genética poblacional, comportamiento, evolución, entre otros.

## IX. Recomendaciones

- Aplicar y ampliar la metodología utilizada en este estudio a las especies de *Photinus* (por ejemplo, para la morfoespecie sp5) y de otros géneros aún no identificados.
- Complementar los análisis genéticos y taxonómicos con estudios de comportamiento, ecología y biogeografía, entre otros.
- En los análisis morfométricos se recomienda aumentar el número mínimo de individuos a diez y establecer una variable de “sexo” que permita identificar individuos machos de hembras.
- Amplificar el gen *wingless* con un nuevo par de cebadores que produzcan una sola banda y el gen CAD, para contar con un set de datos genéticos comparable a otros estudios realizados del género *Photinus*.
- Realizar reconstrucciones filogenéticas que contemplen otros loci y así resolver relaciones con bajo soporte de nodos y politomías.



## X. Bibliografía

- Baldwin, B.S., Black, M., Sanjur, O., Gustafson, R., Lutz, R.A., & Vrijenhoek, R.C. (1996). A diagnostic molecular marker for zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and potentially co-occurring bivalves: mitochondrial COI. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5(1), 9–14. <https://europepmc.org/article/med/8869514>
- Becker, E. C. (1956). Revision of the Nearctic Species of Agriotes (Coleoptera: Elateridae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 88(S1), 5–101. <https://doi.org/10.4039/entm8801fv>
- Beutel, R. G., Friedrich, F., Ge, S.-Q., & Yang, X.-K. (2014). *Insect Morphology and Phylogeny*. DE GRUYTER.
- Bjourson, A. J., & Cooper, J. E. (1992). Band-stab PCR: a simple technique for the purification of individual PCR products. *Nucleic Acids Research*, 20(17), 4675.
- Branham, M. (2003). The origin of photic behavior and the evolution of sexual communication in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Cladistics*, 19(1), 1–22. [https://doi.org/10.1016/s0748-3007\(02\)00131-7](https://doi.org/10.1016/s0748-3007(02)00131-7)
- Castiglione, S., Serio, C., Tamagnini, D., Melchionna, M., Mondanaro, A., di Febbraro, M., Profico, A., Piras, P., Barattolo, F., & Raia, P. (2019). A new, fast method to search for morphological convergence with shape data. *PLoS ONE*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226949>
- Catalán, A., Höhna, S., Lower, S., & Duchen, P. (2019). On the inference of a southern origin of the North American firefly *Photinus pyralis*. *BioRxiv*, 1–38. <https://doi.org/10.1101/851139>
- Convention on Biological Diversity. (2010, June 4). *What is Taxonomy?* <https://www.cbd.int/gti/taxonomy.shtml>
- da Silva Nunes, V. C., Lemos De Matos, E. J., Lima, W., Vaz, S., José, J. R., & Lima Da Silveira, L. F. (2021). Lights Ahead: Morphology and Life Stages of the Spotted Tortoise Firefly, *Aspisoma sticticum* Gemminger, 1870 - Fireflies with a Unique Extra Pair of Lanterns on the Larval Pronotum (Coleoptera: Lampyridae). *Annales Zoologici*, 71(1), 153–178. <https://doi.org/10.3161/00034541ANZ2021.71.1.007>
- Doyle, D., Gammell, M. P., & Nash, R. (2018). Morphometric methods for the analysis and classification of gastropods: A comparison using *Littorina littorea*. *Journal of Molluscan Studies*, 84(2), 190–197. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyy010>
- Fallon, C., Hoyle, S., Lewis, S., Owens, A., Lee-Mäder, E., Black, S. H., & Jepsen, S. (2019). *Conserving the Jewels of the Night Guidelines for Protecting Fireflies in the United States and Canada*.
- Fallon, T. R., Lower, S. E., Chang, C. H., Bessho-Uehara, M., Martin, G. J., Bewick, A. J., Behringer, M., Debat, H. J., Wong, I., Day, J. C., Suvorov, A., Silva, C. J., Stanger-Hall, K. F., Hall, D. W., Schmitz, R. J., Nelson, D. R., Lewis, S. M., Shigenobu, S., Bybee, S. M., ... Weng, J. K. (2018). Firefly genomes illuminate parallel origins of bioluminescence in beetles. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.36495>

- Faust, L. F. (2017). *Fireflies, glow-worms, and lightning bugs: identification and natural history of the fireflies of the Eastern and Central United States and Canada*. The University of Georgia press.
- Ferguson, J. W. (2022). On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of the Linnean Society*, *75*, 509–516.
- Ge, X., Yuan, L., Kang, Y., Liu, T., Liu, H., & Yang, Y. (2021). Characterization of the First Complete Mitochondrial Genome of Cyphonocerinae (Coleoptera: Lampyridae) with Implications for Phylogeny and Evolution of Fireflies. *Insects*, *12*(570). <https://doi.org/10.3390/insects12070570>
- Gilbert, M. T. P., Moore, W., Melchior, L., & Worebey, M. (2007). DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS ONE*, *2*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000272>
- Godman, F. D. C., Horman-Fisher, M., Knight, H., Salvin, O., Saunders, G. S., Schlereth, M. v. , Freih., Sharp, M. A., Wilson, E., Wulp, F. M. van der, (Frederick M., Bale & Danielsson, Bannwarth, Th., Cambridge Scientific Instrument Company, Hanhart, Mintern Bros., Purkiss, W. , lithographer., & Francis., T. & (1915). *Biologia Centrali-Americana: zoology, botany and archaeology: Vol. Introduction*. [London, Published for the editors by R. H. Porter], 1879-1915. <https://doi.org/https://doi.org/10.5962/bhl.title.730>
- Gorham, H. S. (1880). Materials for a revision of the Lampyridae. *Transactions of the Entomological Society of London*, 2–36.
- Green, J. W. (1961). Revision of the species of *Pyropyga* (Lampyridae). *The Coleopterists' Bulletin*, *15*, 65–74.
- Heled, J., & Bouckaert, R. R. (2013). Looking for trees in the forest: summary tree from posterior samples. *BMC Evolutionary Biology*, *13*, 221. <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/13/221>
- Hillis, D. M., Moritz, C., & Mable, B. K. (1996). Molecular systematics: context and controversies. In D. M. Hills (Ed.), *Molecular Systematics* (2nd ed., pp. 1–13). Sinauer.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(2), 518–522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Iowa State University. (2022). *Bug Guide*. Glossary. <https://bugguide.net/node/view/110017/bgpage?from=55>
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. *Nature Methods*, *14*, 587–589. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Koken, M., Guzmán-Álvarez, J. R., Gil-Tapetado, D., Romo Bedate, M. A. R., Laurent, G., Rubio, L. E., Rovira Comas, S. R., Wolfler, N., Verfaillie, F., & Cock, R. D. C. (2022). Quick Spreading of Populations of an Exotic Firefly throughout Spain and Their Recent Arrival in the French Pyrenees. *Insects*, *13*(2), 148. <https://doi.org/10.3390/insects13020148>

- Korshunova, T., Picton, B., Furfaro, G., Mariottini, P., Pontes, M., Prkić, J., Fletcher, K., Malmberg, K., Lundin, K., & Martynov, A. (2019). Multilevel fine-scale diversity challenges the ‘cryptic species’ concept. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42297-5>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2008). DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 2761–2762. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0800476105>
- Lewis, S. M., & Cratsley, C. K. (2008). Flash signal evolution, mate choice, and predation in fireflies. *Annual Review of Entomology*, 53, 293–321. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093346>
- Lloyd, J. E. (1966). Studies on the flash communication system in Photinus fireflies. *Miscellaneous Publications Museum of Zoology University of Michigan*, 130(130), 1–95.
- Lower, S. S., Johnston, J. S., Stanger-Hall, K. F., Hjelmén, C. E., Hanrahan, S. J., Korunes, K., & Hall, D. (2017). Genome Size in North American fireflies: Substantial variation likely driven by neutral processes. *Genome Biology and Evolution*, 9(6), 1499–1512. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx097>
- Luk, S., Marshall, S., & Branham, M. (2011). The Fireflies of Ontario (Coleoptera: Lampyridae). *Canadian Journal of Arthropod Identification*, 16(16), 1–106. <https://doi.org/10.3752/cjai.2011.16>
- Maddison, D. R. (2012). Phylogeny of Bembidion and related ground beetles (Coleoptera: Carabidae: Trechinae: Bembidiini: Bembidiina). *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 63(3), 533–576. <http://10.03.248/j.ympbev.2012.01.015>
- Maddison, W. P., & Maddison, D. R. (2019). *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis* (3.61). <http://www.mesquiteproject.org>
- Mandrioli, M. (2008). Insect collections and DNA analyses: How to manage collections? *Museum Management and Curatorship*, 23(2), 193–199. <https://doi.org/10.1080/09647770802012375>
- Martin, G. J., Branham, M. A., Whiting, M. F., & Bybee, S. M. (2017). Total evidence phylogeny and the evolution of adult bioluminescence in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 564–575. <https://doi.org/10.1016/j.ympbev.2016.12.017>
- Martin, G. J., Lord, N. P., Branham, M. A., & Bybee, S. M. (2015). Review of the firefly visual system (Coleoptera: Lampyridae) and evolution of the opsin genes underlying color vision. *Organisms Diversity and Evolution*, 15(3), 513–526. <https://doi.org/10.1007/s13127-015-0212-z>
- Martin, G. J., Lower, S. E., Suvorov, A., & Bybee, S. M. (2021). Molecular Evolution of Phototransduction Pathway Genes in Nocturnal and Diurnal Fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Insects*, 12(6), 561. <https://doi.org/10.3390/insects12060561>
- Martin, G. J., Stanger-Hall, K. F., Branham, M. A., da Silveira, L. F. L., Lower, S. E., Hall, D. W., Li, X. Y., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., & Bybee, S. M. (2019). Higher-Level Phylogeny and Reclassification of Lampyridae (Coleoptera: Elateroidea). *Insect Systematics and Diversity*, 3(6). <https://doi.org/10.1093/isd/ixz024>

- McMahon, B. J., Teeling, E. C., & Houglund, J. (2014). How and why should we implement genomics into conservation? *Evolutionary Applications*, 7, 999–1007. <https://doi.org/10.1111/eva.12193>
- Miličić, M., Popov, S., Branco, V. V., & Cardoso, P. (2021). Insect threats and conservation through the lens of global experts. In *Conservation Letters* (Vol. 14, Issue 4). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/conl.12814>
- Murphy, F., & Moiseff, A. (2019). Anatomy of the stemmata in the Photuris firefly larva. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 205(1), 151–161. <https://doi.org/10.1007/s00359-018-01312-2>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Quang Minh, B. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Pérez-Hernández, C. X., Zaragoza-Caballero, S., & Romo-Galicia, A. (2022). Updated checklist of the fireflies (Coleoptera: Lampyridae) of Mexico. *Zootaxa*, 5092(3), 291–317. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5092.3.3>
- Promega Corporation. (2020). Wizard Genomic DNA Purification Kit Protocol. In *Promega Quick Protocol*. [www.promega.com](http://www.promega.com)
- Riley, W. B., Rosa, S. P., & Lima da Silveira, L. F. (2021). A comprehensive review and call for studies on firefly larvae. *PeerJ*, 9, e12121. <https://doi.org/10.7717/peerj.12121>
- Rojas, B., Valkonen, J., & Nokelainen, O. (2015). Aposematism. In *Current Biology* (Vol. 25, Issue 9, pp. R350–R351). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.015>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Sander, S. E., & Hall, D. W. (2015). Variation in opsin genes correlates with signalling ecology in North American fireflies. *Molecular Ecology*, 24(18), 4679–4696. <https://doi.org/10.1111/mec.13346>
- Schuster, J. C. (1997). Seasonal diversity of fireflies (Coleoptera: Lampyridae) in a montane area of Guatemala. *Proceedings of the International Symposium on Biodiversity and Systematics in Tropical Ecosystems*, 281–284.
- Scotland, R. W., Olmstead, R. G., & Bennett, J. R. (2003). Phylogeny Reconstruction: The Role of Morphology. *Systematic Biology*, 52(4), 539–548. <https://doi.org/10.1080/10635150390223613>
- Selvakumar, C., Sivaramakrishnan, K. G., & Janarthanan, S. (2016). DNA barcoding of mayflies (Insecta: Ephemeroptera) from South India. *Mitochondrial DNA Part B*, 1(1), 651–655. <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1219623>
- Silveira, L. F. L., Khattar, G., Vaz, S., Wilson, V. A., Souto, P. M., Mermudes, J. R. M., Stanger-Hall, K. F., Macedo, M. v., & Monteiro, R. F. (2020). Natural history of the fireflies of the

- Serra dos Órgãos mountain range (Brazil: Rio de Janeiro)—one of the ‘hottest’ firefly spots on Earth, with a key to genera (Coleoptera: Lampyridae). *Journal of Natural History*, 54(5–6), 275–308. <https://doi.org/10.1080/00222933.2020.1749323>
- Šlenker, M., Koutecký, P., & Marhold, K. (2022). MorphoTools2: an R package for multivariate morphometric analysis. *Bioinformatics*, *btac173*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac173>
- Somavilla, A., Oliveira, M. L., Andena, S. R., & Carpenter, J. M. (2018). An illustrated atlas for male genitalia of the new world polistes Latreille, 1802 (Vespidae: Polistinae). *Zootaxa*, 4504(3), 301–344. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.4504.3.1>
- Sontigun, N., Sukontason, K. L., Zajac, B. K., Zehner, R., Sukontason, K., Wannasan, A., & Amendt, J. (2017). Wing morphometrics as a tool in species identification of forensically important blow flies of Thailand. *Parasites and Vectors*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2163-z>
- Sota, T., & Vogler, A. P. (2001). Incongruence of Mitochondrial and Nuclear Gene Trees in the Carabid Beetles *Ohomopterus*. *Systematic Biology*, 50(1), 39–59.
- Stanger-Hall, K. F., & Lloyd, J. E. (2015). Flash signal evolution in *Photinus* fireflies: Character displacement and signal exploitation in a visual communication system. *Evolution*, 69(3), 666–682. <https://doi.org/10.1111/evo.12606>
- Stanger-Hall, K. F., Lloyd, J. E., & Hillis, D. M. (2007). Phylogeny of North American fireflies (Coleoptera: Lampyridae): Implications for the evolution of light signals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(1), 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.05.013>
- Strandby, U., Christensen, K. I., & Sørensen, M. (2009). A morphometric study of the *Abies religiosa-hickelii-guatemalensis* complex (Pinaceae) in Guatemala and Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 280(1–2), 59–76. <https://doi.org/10.1007/s00606-009-0164-x>
- Tahir, H. M., & Akhtar, S. (2016). Services of DNA barcoding in different fields. *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 27(6), 4463–4474. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1089572>
- Tosso, F., Doucet, J. L., Daïnou, K., Fayolle, A., Hambuckers, A., Doumenge, C., Agbazahou, H., Stoffelen, P., & Hardy, O. J. (2019). Highlighting convergent evolution in morphological traits in response to climatic gradient in African tropical tree species: The case of genus *Guibourtia* Benn. *Ecology and Evolution*, 9(23), 13114–13126. <https://doi.org/10.1002/ece3.5740>
- Vencl, F. v., Luan, X., Fu, X., & Maroja, L. S. (2017). A day-flashing *Photinus* firefly (Coleoptera: Lampyridae) from central Panamá: an emergent shift to predator-free space? *Insect Systematics & Evolution*, 48(5), 512–531. <https://doi.org/10.1163/1876312X-48022162>
- Wiens, J. J. (2004). The role of morphological data in phylogeny reconstruction. In *Systematic Biology* (Vol. 53, Issue 4, pp. 653–661). <https://doi.org/10.1080/10635150490472959>
- Wilcox, A., & Wilson, S. W. (2021). A Description and Examination of Fluorescence in Nine North American Firefly Species (Coleoptera: Lampyridae). *Psyche: A Journal of Entomology*, 2021(ID 8856155), 1–6. <https://doi.org/10.1155/2021/8856155>

- Will, K. W., & Rubinoff, D. (2004). Myth of the molecule DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, 20, 47–55.
- Wortley, A. H., & Scotland, R. W. (2006). The effect of combining molecular and morphological data in published phylogenetic analyses. In *Systematic Biology* (Vol. 55, Issue 4, pp. 677–685). <https://doi.org/10.1080/10635150600899798>
- Zaragoza-Caballero, S. (1995). *La familia Lampyridae (Coleoptera) en la estación de biología tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz, Mexico.* 95. [https://books.google.com/books/about/La\\_familia\\_Lampyridae\\_Coleoptera\\_en\\_la\\_E.html?hl=es&id=acSYskpGbHwC](https://books.google.com/books/about/La_familia_Lampyridae_Coleoptera_en_la_E.html?hl=es&id=acSYskpGbHwC)
- Zaragoza-Caballero, S. (2005). Nuevas especies de Photinus (Coleoptera: Lampyridae: Photinini) de Jalisco, México. *Folia Entomologica Mexicana*, 44(1), 75–82. <https://www.researchgate.net/publication/26486285>
- Zaragoza-Caballero, S. (2012). *Macrolampis palaciosi* sp. nov. (Coleoptera: Lampyridae: Photininae), Tlaxcala, México. *Dugesiana*, 19(2), 117–121.
- Zaragoza-Caballero, S. (2015). Nuevas especies de Photinus (Coleoptera: Lampyridae: Photinini) del bosque tropical caducifolio del Pacífico mexicano. *Enfermería Universitaria*, 86, 638–651. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.08.001>
- Zaragoza-Caballero, S., Cifuentes-Ruiz, P., León, D. E. D., & González-Ramírez, M. (2020). *Proyecto “Luciérnagas de México.”* <https://www.researchgate.net/publication/342481076>
- Zaragoza-Caballero, S., Domínguez-León, D. E., González-Ramírez, M., Cifuentes Ruiz, P., Vega-Badillo, V., López Pérez, S., & Rodríguez Mirón, G. M. (2021). Nuevas especies de luciérnagas (Coleoptera: Lampyridae) de México. *Dugesiana*, 28(2), 221–231. <https://doi.org/10.32870/dugesiana.v28i2.7161>
- Zaragoza-Caballero, S., & Gutiérrez Carranza, I. G. (2018). *Aorphallus cibriani* gen. nov., sp. nov., y otros Photinini de México (Coleoptera: Lampyridae). *Dugesiana*, 25(2), 159–166. <https://doi.org/10.32870/dugesiana.v25i2.7047>
- Zaragoza-Caballero, S., López-Pérez, S., Vega-Badillo, V., Domínguez-León, D. E., Rodríguez-Mirón, G. M., González-Ramírez, M., Gutiérrez-Carranza, I. G., Cifuentes-Ruiz, P., & Zurita-García, M. L. (2020). Luciérnagas del centro de México (Coleoptera: Lampyridae): descripción de 37 especies nuevas.//Fireflies from central Mexico (Coleoptera: Lampyridae): description of 37 new species. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91(e913104). <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3104>
- Zaragoza-Caballero, S., & Navarrete-Heredia, J. L. (2014). Descripción de cuatro especies de Ankonophallus gen. nov. (Coleoptera: Lampyridae: Photinini). *Dugesiana*, 21(2), 125–130. <http://dugesiana.cucba.udg.mx>,

## XI. Anexos

### ANEXO A. Glosario.

- **Antenómeros:** segmentos de las antenas (Beutel *et al.*, 2014).
- **Aposematismo:** es una estrategia antidepredatoria, en la cual los animales advierten a sus depredadores acerca de su toxicidad o sabor desagradable. Consiste de dos elementos: una defensa primaria, como algún color distintivo, olor o sonido, que ocurre antes que el depredador ataque; y una defensa secundaria, que puede ser química, morfológica o de comportamiento. Como resultado, los depredadores aprenden a evitar dicha presa (Rojas *et al.*, 2015).
- **Clípeo:** parte anteroventral de la cápsula de la cabeza; separado principalmente del frons por un puente transverso frontoclipeal entre las fosas tentoriales anteriores; usualmente tiene el labrum en el margen distal (Beutel *et al.*, 2014).
- **Coxas:** elemento basal de las patas; articulados con elementos pleurales, esternales o trocantineales del segmento torácico (Beutel *et al.*, 2014).
- **Edeago:** aparato reproductor de los machos (Beutel *et al.*, 2014).
- **Escapo:** segmento basal de una antena (Beutel *et al.*, 2014).
- **Esclerotizado:** característica del cuerpo de un artrópodo, donde partes de su cuerpo están endurecidas por la presencia de una cutícula gruesa quitinosa o calcárea (Iowa State University, 2022).
- **Especies crípticas:** en el contexto de estudio modernos de biodiversidad y taxonomía, el término se refiere a especies no distinguibles morfológicamente, que pueden ser reconocidos solamente a través de datos moleculares (Korshunova *et al.*, 2019).
- **Esternitos:** segmentos esclerotizados ventrales (Beutel *et al.*, 2014).
- **Excrecencias:** protuberancias en el edeago, sobresalen del lóbulo medio (Zaragoza-Caballero, López-Pérez, *et al.*, 2020).
- **Fémur:** tercer elemento de la pata, usualmente el más largo (Beutel *et al.*, 2014).
- **Frons:** la “frente”, porción de la cabeza entre el margen posterior del clípeo entre los ojos hasta donde comienza a aplanarse la cabeza (Beutel *et al.*, 2014).
- **Labrum:** el “labio” superior de la boca de un artrópodo que está unido con el borde distal del clípeo por una membrana.
- **Lucibufaginas:** sustancias esteroideas tóxicas de las luciérnagas, con un sabor desagradable para los depredadores (T. R. Fallon *et al.*, 2018).
- **Palpos:** apéndices táctiles de los maxilares y el labio (Beutel *et al.*, 2014).
- **Pubescente:** que posee estructuras similares a vellos (Iowa State University, 2022).
- **Sutura frontoclipeal:** división o línea profunda entre la frente y el clípeo, entre las fosas tentoriales anteriores (Beutel *et al.*, 2014).
- **Tarsómeros:** subelemento del tarso en Insecta; número a menudo específico del taxón, a veces que difieren en las piernas de diferentes segmentos (valor de diagnóstico: fórmula tarsal) (Beutel *et al.*, 2014).
- **Tarsos:** quinto elemento de la pata; compuesto de 3-5 tarsómeros en casi todos los grupos de Insecta (Beutel *et al.*, 2014).
- **Taxonomía:** es la ciencia que describe, nombra y clasifica los organismos (Convention on Biological Diversity, 2010).
- **Tergitos:** segmentos esclerotizados dorsales (Beutel *et al.*, 2014).

- **Tibia:** cuarto elemento de la pata, usualmente cilíndrico y equipado con espolones terminales emparejados a menudo con filas de espinas (Beutel *et al.*, 2014).
- **Trocánter:** segundo elemento de la pata, usualmente pequeño y triangular (Beutel *et al.*, 2014).



## ANEXO B. Descripción del género *Photinus*.

El género *Photinus*, tal como es representado en la fauna Neártica, se caracteriza por: textura del cuerpo suave; forma elongada oval, con márgenes laterales subparalelos. Cabeza bastante deflexionada, cuando se retrae es completamente cubierta por el pronoto; gula semimembranosa, muy abreviada medialmente por una extensión frontal del foramen occipital; ojos grandes, hemisféricos. Antenas simples, delgadas, comprimidas, con 11 segmentos, sin apéndice terminal minuto, similares en ambos sexos, longitud menor a la mitad del total del cuerpo, con algunas pubescencias gruesas y erectas; segundo segmento corto, seguido de segmentos elongados, subiguales en longitud, gradualmente más delgadas si son distales. Clípeo débilmente esclerotizado, con una articulación basal membranosa; *labrum* (labio superior) elongado triangular, membranoso; mandíbulas agudas, arqueadas, regularmente estrechas desde la base al ápice, excepto el agrandamiento basal interno. Palpos maxilares cortos y robustos, más amplios distalmente, segundo segmento no elongado; segmento terminal de los palpos labiales triangulares o securiforme, el ápice truncado o redondeado (Becker, 1956).

Pronoto semielíptico, ángulos anteriores obliterados, ángulos posteriores subrectangulares, lados y frente explanados. Élitros con pubescencia dual, pubescencia secundaria minuta usualmente ausente en la base; epipleuras completamente definidas externamente por el margen elitral agudo, ancho en la base, estrechamiento rápido a aproximadamente séptima basal, de ahí estrechamente subparalelos, obliterado antes de llegar al ápice elitral. Prosternum truncado al frente; margen anterior de la hipomera no alcanza el margen lateral del tórax; espiráculos anteriores torácicos prominentes, transversos, subtubulados, se superponen al mesepisterna. Espiráculos abdominales dorsales (Becker, 1956).

Abdomen del macho con 8 segmentos ventrales visibles, los dos terminales cubiertos por el pigidio; los órganos de luz, si están presentes, ocupan todos los segmentos ventrales 6 y 7, estos segmentos son más largos que los anteriores y cada uno con un par de poros estigmatiformes. Las hembras tienen 7 segmentos ventrales visibles; los órganos de luz, si están presentes, ocupan un tercio medio o más del ancho del segmento número 6. Las patas son cortas y robustas, comprimidas; espolones tibiales pequeños, delgados y agudos, ocultos por las setas apicales; segmento terminal de los tarsos se extienden menos de la mitad de su longitud más allá de los lóbulos del cuarto segmento profundamente emarginado; garras simples (Becker, 1956).

**ANEXO C.**

**Cuadro 11.** Matriz de datos utilizada en los análisis morfométricos en R. Medidas en milímetros (mm).

ID	Population	Taxon	longitud_total	ancho_cabeza	largo_cabeza	ancho_pronoto	largo_pronoto	ancho_interantenal	longitud_antena	ancho_fosa_interantenal	ancho_interocular	ancho_ojo	largo_ojo	longitud_palpo_maxilar	largo_elitro	ancho_elitro	esternito1	esternito2	esternito3	esternito4	esternito5	esternito6	esternito7
<b>VA1</b> <b>1</b>	V A	sp 1	9.00	1.7 4	0.8 4	2.5 8	1.8 0	0.0 7	4.4 8	0.1 4	0.5 0	0.9 6	0.9 6	0.6 9	7.05	1.2 0	0.5 4	0.6 0	0.5 4	0.6 0	0.6 6	0.6 0	0.2 4
<b>VA1</b> <b>2</b>	V A	sp 1	7.50	1.5 0	0.8 4	2.2 8	1.6 2	0.0 7	3.9 5	0.1 9	0.4 5	0.7 8	0.8 4	0.7 1	6.00	1.2 0	0.4 8	0.5 4	0.4 8	0.4 8	0.5 4	0.5 4	0.3 0
<b>VA1</b> <b>3</b>	V A	sp 1	7.65	1.6 8	0.9 0	2.5 8	1.7 4	0.1 0	4.3 3	0.1 9	0.5 0	0.9 0	0.9 6	0.7 6	7.35	1.3 5	0.4 8	0.4 2	0.5 4	0.5 4	0.6 0	0.5 4	0.1 8
<b>VA1</b> <b>9</b>	V A	sp 1	9.75	1.6 8	0.7 8	2.9 4	1.9 2	0.0 7	5.1 7	0.1 4	0.4 5	0.7 8	0.8 4	0.8 6	7.80	1.5 0	0.6 0	0.6 0	0.7 8	0.7 2	0.6 6	0.6 0	0.5 4
<b>RH7</b>	R H	sp 2	10.0 5	2.1 6	1.0 8	2.8 8	2.1 6	0.1 0	5.0 7	0.2 4	0.7 1	1.0 2	1.0 2	0.7 6	7.65	1.5 0	0.6 0	0.6 0	0.6 0	0.6 0	0.6 6	0.7 8	NA
<b>RH1</b> <b>0</b>	R H	sp 2	8.70	1.9 2	0.9 6	2.5 8	1.6 8	0.1 0	2.8 6	0.2 1	0.6 4	0.9 0	0.9 6	0.6 4	6.30	1.3 5	0.5 4	0.5 4	0.5 4	0.4 8	0.6 6	NA	NA
<b>RH1</b> <b>4</b>	R H	sp 2	8.10	1.7 4	0.9 6	2.4 0	1.7 4	0.1 0	3.9 3	0.2 1	0.6 0	0.9 0	0.9 0	0.7 1	6.45	1.0 5	0.5 4	0.5 4	0.6 0	0.4 2	0.6 0	0.6 0	0.3 0
<b>RH1</b> <b>8</b>	R H	sp 5	6.00	1.2 6	0.6 6	1.9 2	1.2 0	0.1 0	2.6 4	0.1 2	0.5 2	0.7 2	0.7 2	0.5 2	4.80	1.0 5	0.3 0	0.2 4	0.3 6	0.2 4	0.7 2	0.6 0	0.1 2
<b>RH2</b> <b>6</b>	R H	sp 5	6.15	1.2 6	0.6 6	1.8 6	1.3 2	0.1 2	2.4 8	0.1 0	0.5 0	0.6 6	0.6 6	0.4 8	4.80	0.9 0	0.2 4	0.2 4	0.3 0	0.3 0	0.6 0	0.4 8	0.2 4
<b>RH3</b> <b>1</b>	R H	sp 5	6.00	1.2 6	0.6 6	1.8 6	1.2 0	0.1 2	2.5 5	0.1 2	0.5 2	0.6 6	0.6 6	0.5 0	4.95	0.9 0	0.3 6	0.3 0	0.3 0	0.2 4	0.6 0	0.4 8	0.1 2
<b>RH3</b> <b>3</b>	R H	sp 5	6.00	1.3 2	0.6 6	1.9 2	1.2 0	0.1 2	2.6 7	0.1 2	0.5 7	0.6 6	0.6 6	0.5 2	4.95	0.9 0	0.3 0	0.3 0	0.3 0	0.3 0	0.6 0	0.6 0	0.1 8
<b>BP2</b> <b>0</b>	BP	sp 3	12.9 0	2.1 0	1.3 8	3.0 6	2.1 6	0.2 6	5.5 7	0.2 4	0.9 3	1.0 2	1.0 2	0.7 6	10.5	1.5 0	0.9 6	0.7 8	0.7 2	0.8 4	0.9 0	0.9 0	0.4 8
<b>BP1</b> <b>8</b>	BP	sp 3	11.7 0	1.8 6	1.2 6	2.8 2	2.1 0	0.2 1	NA	0.2 4	0.8 3	0.9 0	0.9 6	0.9 3	9.00	1.3 5	0.8 4	0.7 8	0.8 4	0.8 4	1.0 2	0.9 6	0.4 2
<b>BP1</b> <b>9</b>	BP	sp 3	12.0 0	2.0 4	1.2 0	3.0 6	2.2 2	0.2 4	4.9 8	0.2 1	0.7 1	0.9 6	0.9 6	0.9 5	8.85	1.5 0	0.9 6	0.9 0	0.7 2	0.9 0	0.9 0	NA	NA

<i>Continuación Cuadro 11</i>																							
<b>CC24</b>	C	sp	12.9	2.1	1.2	3.1	2.6	0.2	5.8	0.2	0.8	1.1	1.1	0.8	10.3	1.6	1.0	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	0.4
	C	3	0	6	6	2	4	4	6	9	6	4	4	8	5	5	8	4	4	4	4	8	8
<b>CC23</b>	C	sp	12.0	2.1	1.3	3.0	2.3	0.2	NA	0.2	0.8	1.0	1.0	0.9	9.60	1.6	1.0	0.9	0.8	0.8	1.2	1.0	0.4
	C	3	0	0	8	6	4	4	6	6	3	2	2	0	5	8	6	4	4	4	6	8	2
<b>CC31</b>	C	sp	12.0	1.9	1.3	3.0	2.3	0.2	NA	0.2	0.8	0.9	0.9	0.8	9.45	1.5	0.8	0.7	0.7	0.7	NA	NA	NA
	C	3	0	8	8	0	4	1	4	4	1	6	6	8	0	4	8	2	8				
<b>CC30</b>	C	sp	12.1	1.9	0.9	2.8	2.5	0.2	5.0	0.3	0.7	1.0	0.9	0.9	4.50	1.6	0.7	0.8	0.8	0.9	NA	NA	NA
	C	3	5	8	6	8	2	1	0	3	4	2	6	3	5	8	4	4	6				
<b>CC28</b>	C	sp	10.8	1.7	0.7	2.5	1.9	0.1	4.9	0.2	0.6	0.8	0.9	0.6	8.40	1.2	0.7	0.7	0.7	0.8	NA	NA	NA
	C	3	0	4	2	2	2	9	0	4	2	4	0	0	0	2	2	2	4				
<b>ER26</b>	ER	sp	12.7	2.0	1.2	3.0	2.5	0.2	5.5	0.2	0.8	0.9	1.0	0.8	10.5	1.6	0.9	0.7	0.8	0.8	0.9	0.9	0.3
	ER	3	5	4	0	0	2	1	2	9	3	6	2	3	0	5	0	8	4	4	6	6	6
<b>ER27</b>	ER	sp	11.4	2.0	1.2	2.8	2.3	0.1	4.8	0.2	0.8	0.9	0.9	1.0	9.15	1.5	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7	0.8	0.3
	ER	3	0	4	0	2	4	9	1	6	3	0	6	0	0	2	2	6	2	2	4	0	
<b>ER29</b>	ER	sp	11.4	1.8	0.9	2.6	2.2	0.2	5.2	0.2	0.7	0.9	0.9	0.8	9.15	1.3	0.7	0.8	0.7	0.7	0.9	NA	NA
	ER	3	0	6	0	4	2	4	1	4	6	0	6	1	5	2	4	8	8	0			
<b>ER30</b>	ER	sp	12.0	2.1	1.0	3.0	2.5	0.2	5.8	0.2	0.7	0.9	1.0	0.9	9.15	1.5	0.9	0.8	0.8	0.7	0.8	NA	NA
	ER	3	0	6	2	0	2	1	3	6	4	6	2	0	0	0	4	4	8	4			
<b>ER28</b>	ER	sp	12.3	2.1	1.1	2.7	2.4	0.2	5.2	0.2	0.8	0.9	1.0	0.8	9.45	1.6	1.0	0.9	0.7	0.7	1.0	0.9	NA
	ER	3	0	0	4	6	6	4	9	4	8	6	2	3	5	2	0	8	8	2	6		
<b>LA9</b>	L	sp	10.8	1.9	1.0	2.5	2.1	0.2	4.8	0.2	0.7	0.8	0.9	0.8	8.70	1.5	0.9	0.7	0.8	0.7	0.8	0.8	0.2
	A	3	0	2	8	8	6	1	1	1	9	4	0	3	0	6	8	4	2	4	4	4	
<b>LA46</b>	L	sp	6.45	1.3	0.8	2.0	1.4	0.0	2.6	0.1	0.4	0.7	0.7	0.5	5.10	1.2	0.3	0.5	0.4	0.4	0.5	0.5	0.1
	A	4		2	4	4	4	7	4	0	5	2	2	7	0	6	4	8	2	4	4	8	
<b>LA44</b>	L	sp	7.50	1.2	0.7	2.2	1.3	0.1	2.7	0.1	0.4	0.5	0.6	0.5	6.30	1.0	0.4	0.5	0.5	0.6	0.4	0.6	0.7
	A	4		0	2	2	2	0	6	2	8	4	0	2	5	8	4	4	0	2	0	2	
<b>LA21</b>	L	sp	7.35	1.2	0.7	2.0	1.4	0.0	2.7	0.1	0.4	0.7	0.7	0.5	6.00	1.0	0.4	0.4	0.4	0.3	0.6	0.5	0.1
	A	4		6	8	4	4	7	9	2	0	2	2	2	5	2	8	8	6	0	4	8	
<b>LA47</b>	L	sp	7.65	1.4	0.8	2.1	1.5	0.1	2.9	0.1	0.4	0.8	0.7	0.5	6.30	1.0	0.4	0.5	0.5	0.4	0.5	0.6	NA
	A	4		4	4	0	0	0	8	0	8	4	8	7	5	8	4	4	8	4	0		
<b>LAX</b>	L	sp	7.05	1.3	0.7	1.9	1.3	0.0	2.7	0.1	0.4	0.7	0.7	0.5	5.85	1.0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.1
	A	4		2	8	8	2	7	6	0	5	2	2	5	5	8	8	2	8	2	2	8	

**Cuadro 12.** Medidas morfométricas de cada antenómero (mm), aumento 64X.

ID	escapo	segmento2	segmento3	segmento4	segmento5	segmento6	segmento7	segmento8	segmento9	segmento10	segmento11	TOTAL
<b>BP20</b>	0.71	0.29	0.52	0.52	0.48	0.50	0.50	0.48	0.48	0.50	0.60	5.57
<b>BP18</b>	0.71	0.24	0.52	0.55	0.48	0.50	0.48	0.45	0.48	NA	NA	4.40
<b>BP19</b>	0.74	0.24	0.50	0.50	0.48	0.48	0.45	0.48	0.38	0.38	0.36	4.98
<b>CC24</b>	0.67	0.26	0.57	0.52	0.57	0.62	0.52	0.52	0.50	0.50	0.60	5.86

*Continuación Cuadro 12*

<b>CC23</b>	0.67	0.29	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.95
<b>CC31</b>	0.71	0.21	0.50	0.55	0.48	0.57	0.50	0.45	0.48	0.36	NA	4.81
<b>CC30</b>	0.57	0.24	0.57	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.45	0.43	0.36	5.00
<b>CC28</b>	0.50	0.21	0.45	0.52	0.48	0.50	0.48	0.48	0.36	0.43	0.50	4.90
<b>ER27</b>	0.64	0.21	0.45	0.50	0.45	0.33	0.33	0.43	0.43	0.45	0.57	4.81
<b>ER26</b>	0.62	0.24	0.55	0.55	0.52	0.55	0.48	0.50	0.48	0.50	0.55	5.52
<b>ER29</b>	0.62	0.21	0.52	0.50	0.48	0.48	0.45	0.45	0.48	0.48	0.55	5.21
<b>ER30</b>	0.69	0.24	0.43	0.62	0.55	0.57	0.57	0.52	0.48	0.52	0.64	5.83
<b>ER28</b>	0.71	0.21	0.45	0.45	0.43	0.48	0.45	0.48	0.48	0.52	0.62	5.29
<b>LA9</b>	0.57	0.24	0.38	0.43	0.48	0.36	0.48	0.48	0.50	0.43	0.48	4.81
<b>VA11</b>	0.50	0.21	0.36	0.48	0.43	0.45	0.43	0.40	0.43	0.40	0.38	4.48
<b>VA12</b>	0.45	0.17	0.40	0.40	0.33	0.33	0.36	0.33	0.36	0.36	0.45	3.95
<b>VA13</b>	0.48	0.24	0.31	0.40	0.38	0.40	0.38	0.38	0.43	0.43	0.50	4.33
<b>VA19</b>	0.52	0.21	0.48	0.50	0.48	0.48	0.45	0.50	0.48	0.48	0.60	5.17
<b>LA46</b>	0.45	0.14	0.29	0.29	0.26	0.26	0.21	0.21	0.19	0.17	0.17	2.64
<b>LA4</b>	0.45	0.12	0.26	0.21	0.19	0.24	0.24	0.29	0.21	0.24	0.31	2.76
<b>LA21</b>	0.45	0.14	0.29	0.29	0.26	0.24	0.21	0.26	0.21	0.21	0.21	2.79
<b>LA47</b>	0.45	0.14	0.33	0.29	0.26	0.24	0.24	0.26	0.21	0.26	0.29	2.98
<b>LAX</b>	0.45	0.17	0.26	0.29	0.24	0.24	0.24	0.24	0.19	0.19	0.26	2.76
<b>RH7</b>	0.60	0.19	0.48	0.57	0.45	0.45	0.45	0.48	0.38	0.45	0.57	5.07
<b>RH10</b>	0.60	0.14	0.33	0.36	0.33	0.31	0.19	0.14	0.12	0.12	0.21	2.86
<b>RH14</b>	0.57	0.17	0.38	0.40	0.45	0.33	0.26	0.40	0.33	0.29	0.33	3.93
<b>RH18</b>	0.38	0.12	0.29	0.29	0.21	0.26	0.24	0.21	0.21	0.19	0.24	2.64
<b>RH26</b>	0.38	0.12	0.26	0.26	0.21	0.21	0.21	0.21	0.19	0.14	0.26	2.48
<b>RH31</b>	0.36	0.14	0.26	0.26	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.24	2.55
<b>RH33</b>	0.38	0.14	0.26	0.29	0.24	0.24	0.21	0.21	0.24	0.19	0.26	2.67

**Cuadro 13.** Medidas morfométricas de cada palpo maxilar (mm), aumento 64X.

<b>ID</b>	<b>palpo 4 (segmento distal)</b>	<b>palpo 3</b>	<b>palpo 2</b>	<b>palpo 1 (segmento proximal)</b>	<b>TOTAL</b>
<b>BP20</b>	0.36	0.14	0.17	0.10	0.76
<b>BP18</b>	0.45	0.19	0.17	0.12	0.93
<b>BP19</b>	0.45	0.19	0.19	0.12	0.95
<b>CC24</b>	0.38	0.21	0.19	0.10	0.88
<b>CC23</b>	0.45	0.17	0.19	0.10	0.90
<b>CC31</b>	0.45	0.19	0.14	0.10	0.88
<b>CC30</b>	0.48	0.14	0.19	0.12	0.93
<b>CC28</b>	0.31	0.10	0.12	0.07	0.60
<b>ER27</b>	0.38	0.21	0.14	0.10	0.83
<b>ER26</b>	0.48	0.24	0.21	0.07	1.00
<b>ER29</b>	0.38	0.14	0.17	0.12	0.81
<b>ER30</b>	0.40	0.17	0.21	0.12	0.90
<b>ER28</b>	0.43	0.12	0.17	0.12	0.83
<b>LA9</b>	0.36	0.14	0.21	0.12	0.83
<b>VA11</b>	0.29	0.14	0.12	0.14	0.69
<b>VA12</b>	0.31	0.12	0.14	0.14	0.71
<b>VA13</b>	0.36	0.10	0.14	0.17	0.76
<b>VA19</b>	0.38	0.12	0.14	0.21	0.86
<b>LA46</b>	0.21	0.12	0.14	0.10	0.57
<b>LA4</b>	0.19	0.12	0.12	0.10	0.52
<b>LA21</b>	0.21	0.10	0.12	0.10	0.52
<b>LA47</b>	0.24	0.10	0.12	0.12	0.57
<b>LAX</b>	0.24	0.10	0.10	0.12	0.55
<b>RH7</b>	0.36	0.12	0.14	0.14	0.76
<b>RH10</b>	0.29	0.14	0.10	0.12	0.64
<b>RH14</b>	0.31	0.12	0.14	0.14	0.71
<b>RH18</b>	0.19	0.12	0.12	0.10	0.52
<b>RH26</b>	0.21	0.07	0.10	0.10	0.48
<b>RH31</b>	0.21	0.07	0.12	0.10	0.50
<b>RH33</b>	0.21	0.10	0.12	0.10	0.52



Continuación Cuadro 14

ancho elitro	largo elitro	longitud pa	ancho oio	ancho inter	ancho fosa	longitud an
4	4	4	4	4	4	4
1.312	7.05	0.755	0.855	0.475	0.165	4.482
0.144	0.765	0.076	0.09	0.029	0.029	0.51
1.2	6	0.69	0.78	0.45	0.14	3.95
1.2	6.157	0.693	0.78	0.45	0.14	4.007
1.2	6.787	0.705	0.78	0.45	0.14	4.235
1.275	7.2	0.735	0.84	0.475	0.165	4.405
1.388	7.462	0.785	0.915	0.5	0.19	4.652
1.478	7.732	0.845	0.951	0.5	0.19	5.066
1.5	7.8	0.86	0.96	0.5	0.19	5.17
3	3	3	3	3	3	3
1.3	6.8	0.703	0.94	0.65	0.22	3.953
0.229	0.74	0.06	0.069	0.056	0.017	1.105
1.05	6.3	0.64	0.9	0.6	0.21	2.86
1.08	6.315	0.647	0.9	0.604	0.21	2.967
1.2	6.375	0.675	0.9	0.62	0.21	3.395
1.35	6.45	0.71	0.9	0.64	0.21	3.93
1.425	7.05	0.735	0.96	0.675	0.225	4.5
1.485	7.53	0.755	1.008	0.703	0.237	4.956
1.5	7.65	0.76	1.02	0.71	0.24	5.07
14	14	14	14	14	14	14
1.511	9.054	0.859	0.956	0.797	0.254	5.253
0.138	1.463	0.098	0.08	0.078	0.032	0.391
1.2	4.5	0.6	0.84	0.62	0.21	4.81
1.298	7.035	0.704	0.84	0.678	0.21	4.81
1.5	8.887	0.83	0.9	0.745	0.24	4.94
1.5	9.15	0.88	0.96	0.82	0.24	5.21
1.65	9.562	0.922	1.005	0.83	0.26	5.545
1.65	10.5	0.967	1.062	0.897	0.304	5.845
1.65	10.5	1	1.14	0.93	0.33	5.86
5	5	5	5	5	5	5
1.08	5.91	0.546	0.708	0.452	0.108	2.786
0.067	0.493	0.025	0.107	0.033	0.011	0.123
1.05	5.1	0.52	0.54	0.4	0.1	2.64
1.05	5.25	0.52	0.576	0.41	0.1	2.664
1.05	5.85	0.52	0.72	0.45	0.1	2.76
1.05	6	0.55	0.72	0.45	0.1	2.76
1.05	6.3	0.57	0.72	0.48	0.12	2.79
1.17	6.3	0.57	0.816	0.48	0.12	2.942
1.2	6.3	0.57	0.84	0.48	0.12	2.98
4	4	4	4	4	4	4
0.938	4.875	0.505	0.675	0.527	0.115	2.585
0.075	0.087	0.019	0.03	0.03	0.01	0.087
0.9	4.8	0.48	0.66	0.5	0.1	2.48
0.9	4.8	0.483	0.66	0.503	0.103	2.49
0.9	4.8	0.495	0.66	0.515	0.115	2.532
0.9	4.875	0.51	0.66	0.52	0.12	2.595
0.938	4.95	0.52	0.675	0.532	0.12	2.648
1.027	4.95	0.52	0.711	0.562	0.12	2.665
1.05	4.95	0.52	0.72	0.57	0.12	2.67

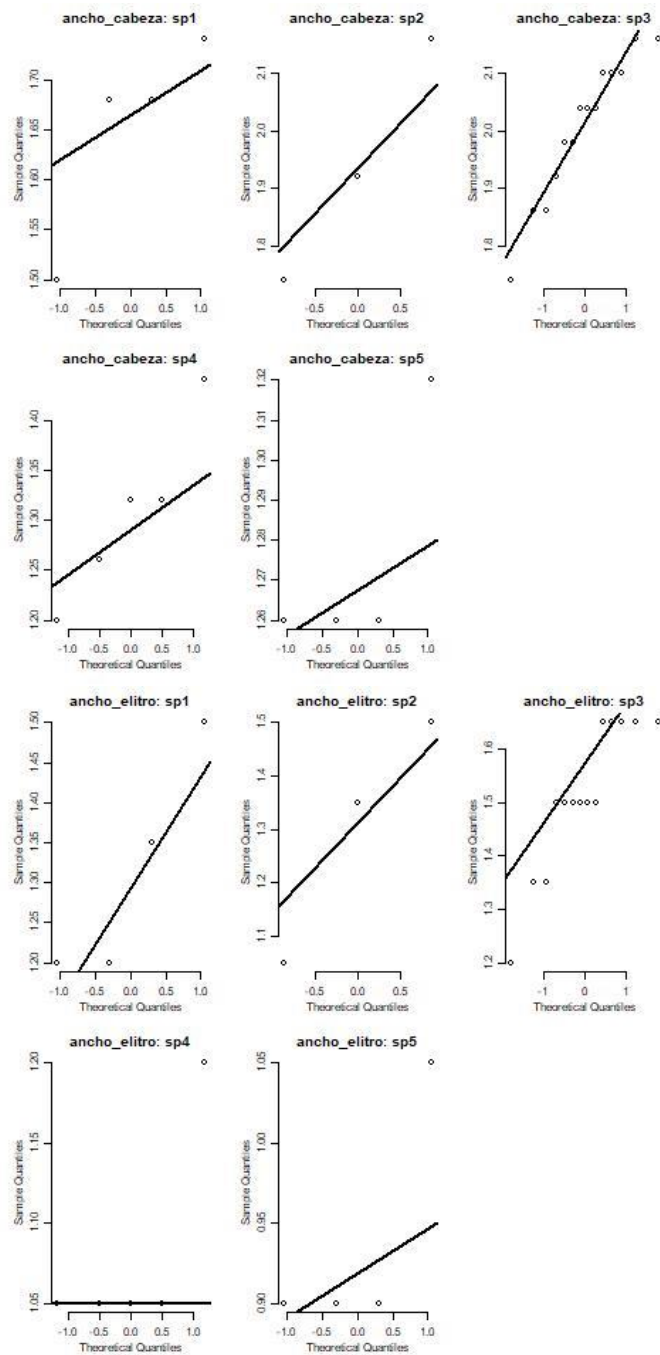
Continuación Cuadro 14

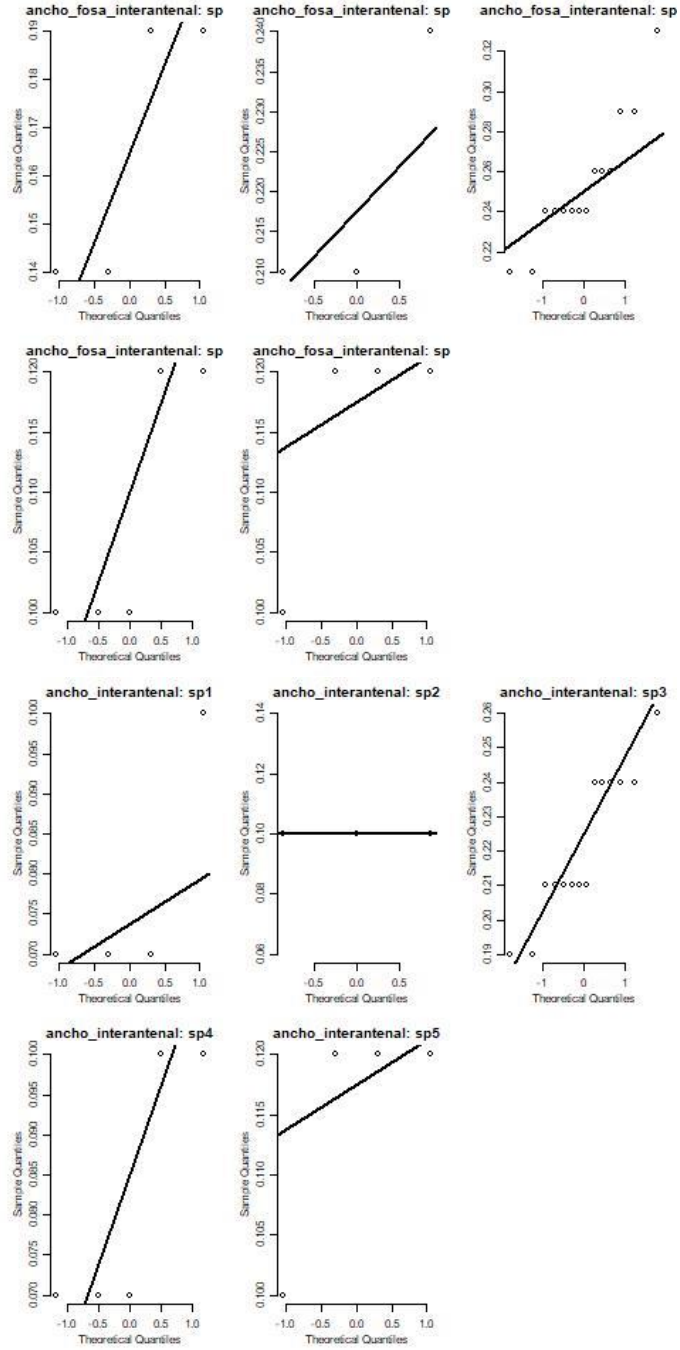
esternito7	esternito6	esternito5	esternito4	esternito3	esternito2	esternito1
4	4	4	4	4	4	4
0.315	0.57	0.615	0.585	0.585	0.54	0.525
0.158	0.035	0.057	0.102	0.133	0.085	0.057
0.18	0.54	0.54	0.48	0.48	0.42	0.48
0.189	0.54	0.549	0.489	0.489	0.438	0.48
0.225	0.54	0.585	0.525	0.525	0.51	0.48
0.27	0.57	0.63	0.57	0.54	0.57	0.51
0.36	0.6	0.66	0.63	0.6	0.6	0.555
0.504	0.6	0.66	0.702	0.744	0.6	0.591
0.54	0.6	0.66	0.72	0.78	0.6	0.6
3	3	3	3	3	3	3
0.3	0.69	0.64	0.5	0.58	0.56	0.56
	0.127	0.035	0.092	0.035	0.035	0.035
0.3	0.6	0.6	0.42	0.54	0.54	0.54
0.3	0.609	0.606	0.426	0.546	0.54	0.54
0.3	0.645	0.63	0.45	0.57	0.54	0.54
0.3	0.69	0.66	0.48	0.6	0.54	0.54
0.3	0.735	0.66	0.54	0.6	0.57	0.57
0.3	0.771	0.66	0.588	0.6	0.594	0.594
0.3	0.78	0.66	0.6	0.6	0.6	0.6
14	14	14	14	14	14	14
0.386	0.953	0.949	0.819	0.784	0.819	0.891
0.091	0.093	0.144	0.065	0.064	0.069	0.126
0.24	0.84	0.72	0.72	0.66	0.72	0.72
0.258	0.84	0.78	0.72	0.699	0.72	0.72
0.33	0.885	0.87	0.78	0.72	0.78	0.795
0.42	0.96	0.9	0.84	0.81	0.81	0.9
0.45	0.99	1.02	0.84	0.84	0.84	0.96
0.48	1.08	1.17	0.921	0.84	0.921	1.08
0.48	1.08	1.26	0.96	0.84	0.96	1.08
5	5	5	5	5	5	5
0.315	0.54	0.504	0.468	0.492	0.516	0.444
0.27	0.073	0.08	0.089	0.05	0.033	0.054
0.18	0.42	0.42	0.36	0.42	0.48	0.36
0.18	0.444	0.42	0.372	0.432	0.48	0.372
0.18	0.54	0.42	0.42	0.48	0.48	0.42
0.18	0.54	0.54	0.48	0.48	0.54	0.48
0.315	0.6	0.54	0.48	0.54	0.54	0.48
0.639	0.6	0.588	0.576	0.54	0.54	0.48
0.72	0.6	0.6	0.6	0.54	0.54	0.48
4	4	4	4	4	4	4
0.165	0.54	0.63	0.27	0.315	0.27	0.3
0.057	0.069	0.06	0.035	0.03	0.035	0.049
0.12	0.48	0.6	0.24	0.3	0.24	0.24
0.12	0.48	0.6	0.24	0.3	0.24	0.249
0.12	0.48	0.6	0.24	0.3	0.24	0.285
0.15	0.54	0.6	0.27	0.3	0.27	0.3
0.195	0.6	0.63	0.3	0.315	0.3	0.315
0.231	0.6	0.702	0.3	0.351	0.3	0.351
0.24	0.6	0.72	0.3	0.36	0.3	0.36

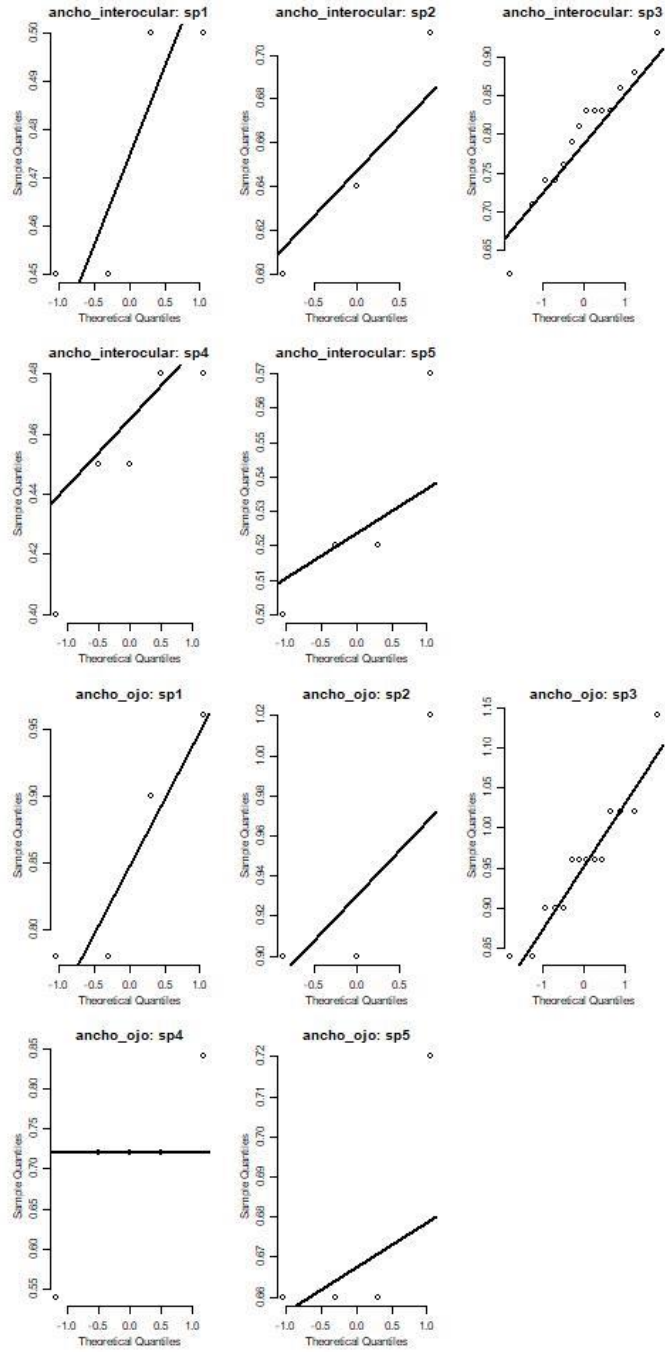


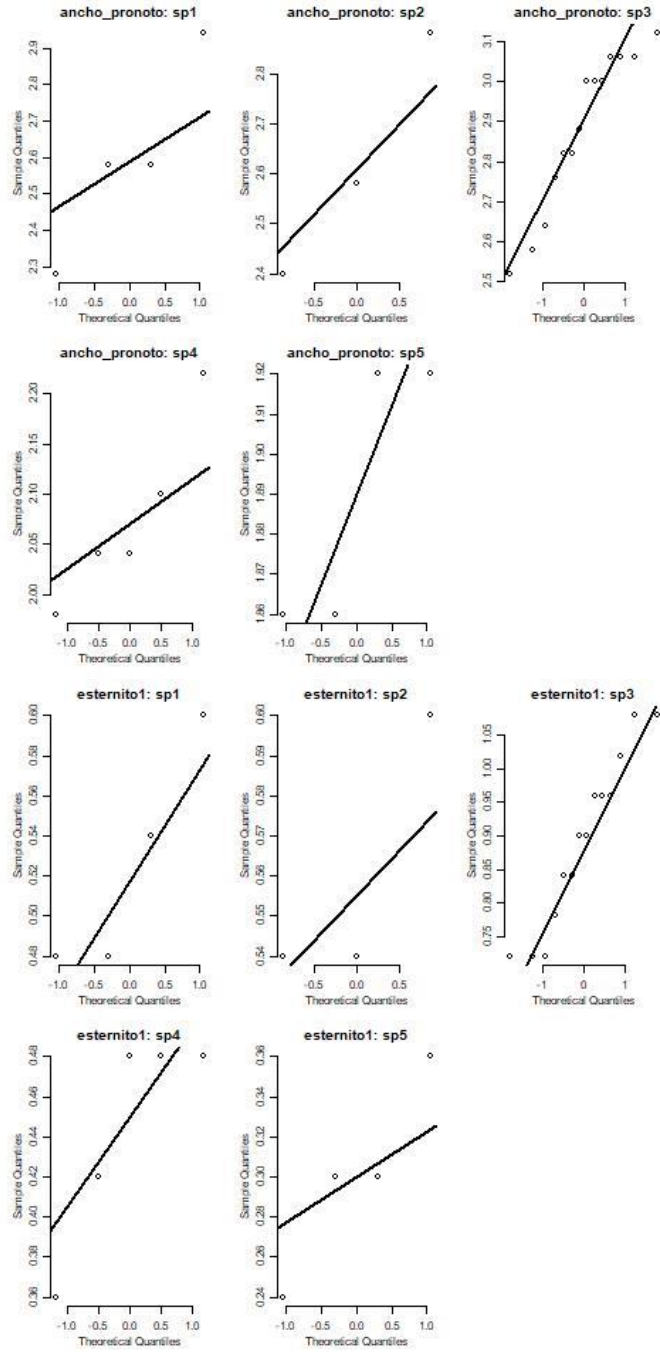
## ANEXO E.

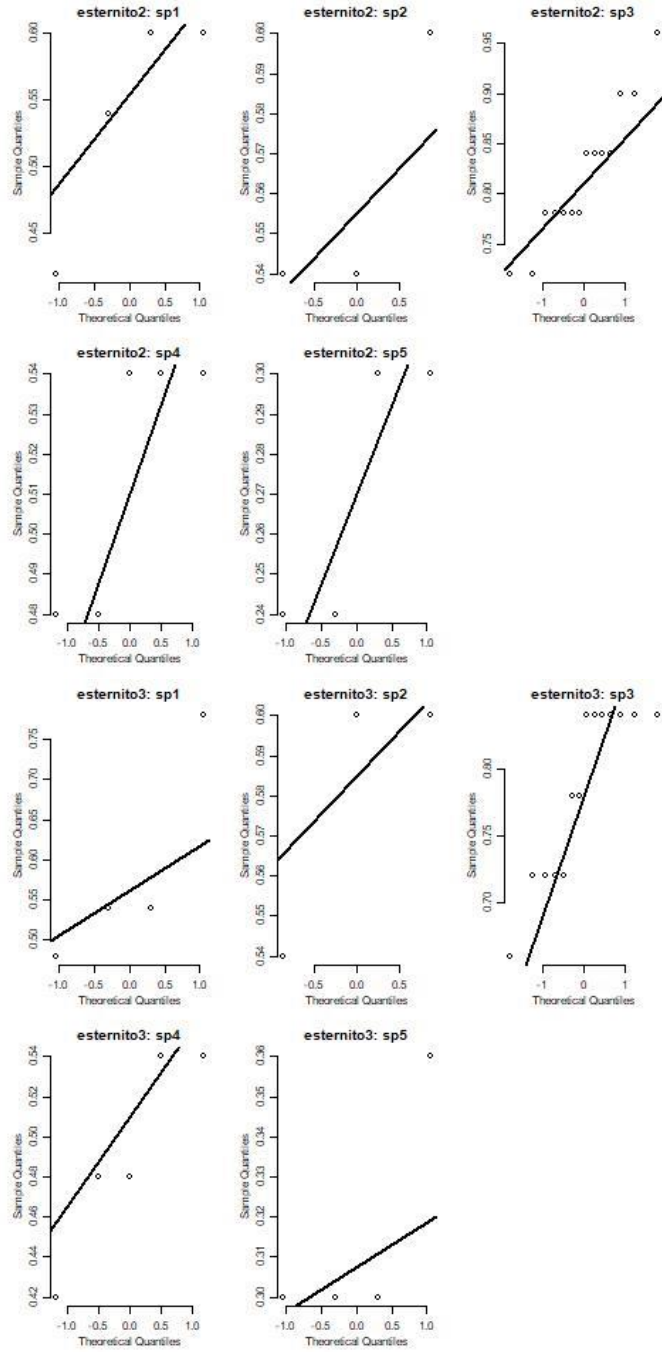
Figura 16. Gráficos qqPlot del set completo de datos morfométricos.

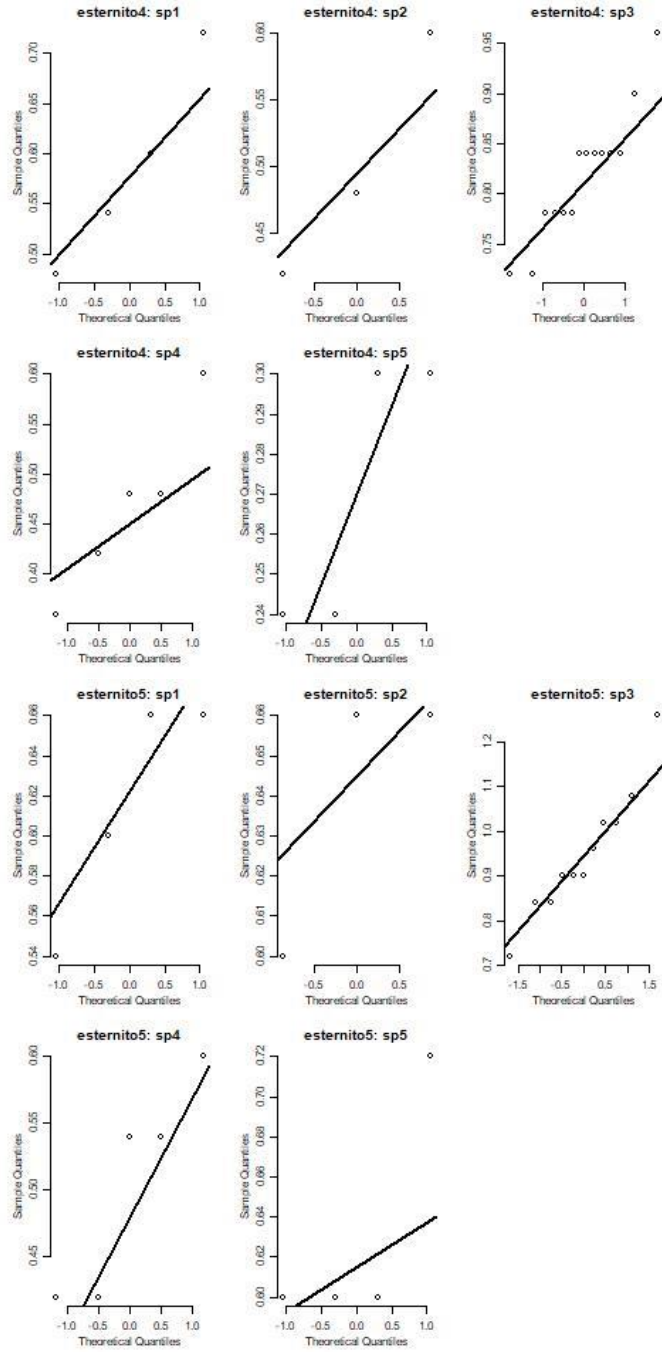


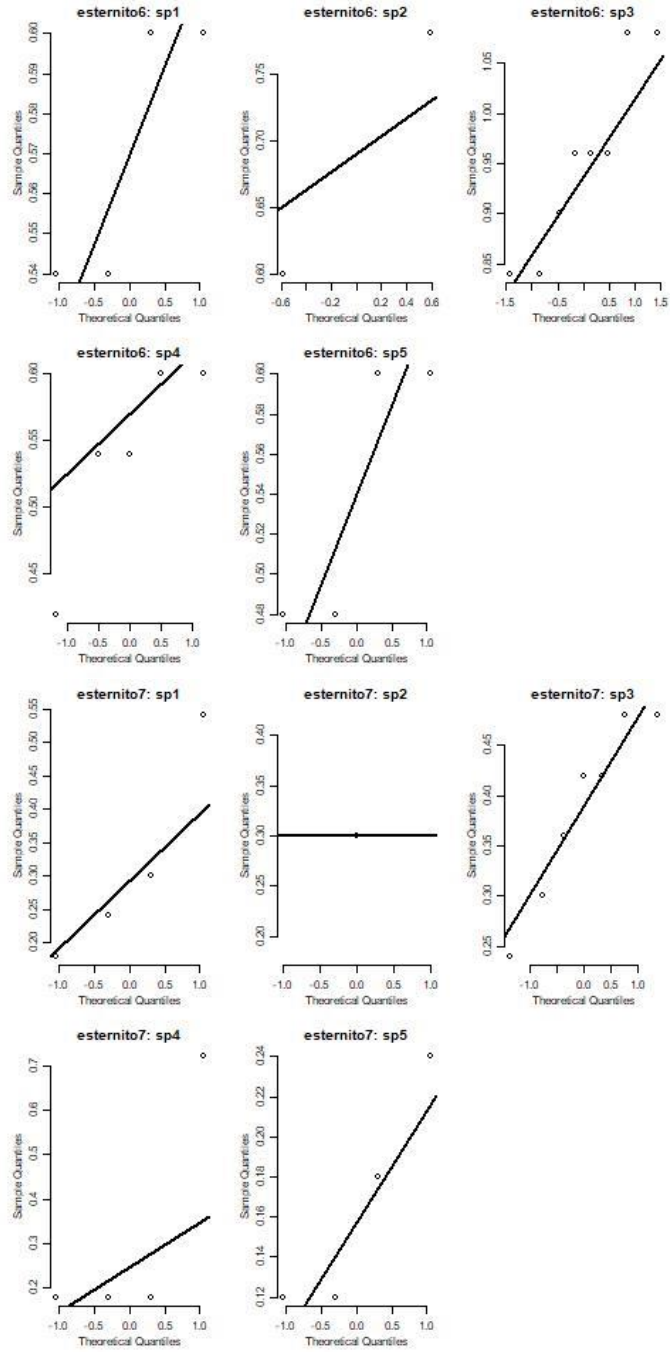


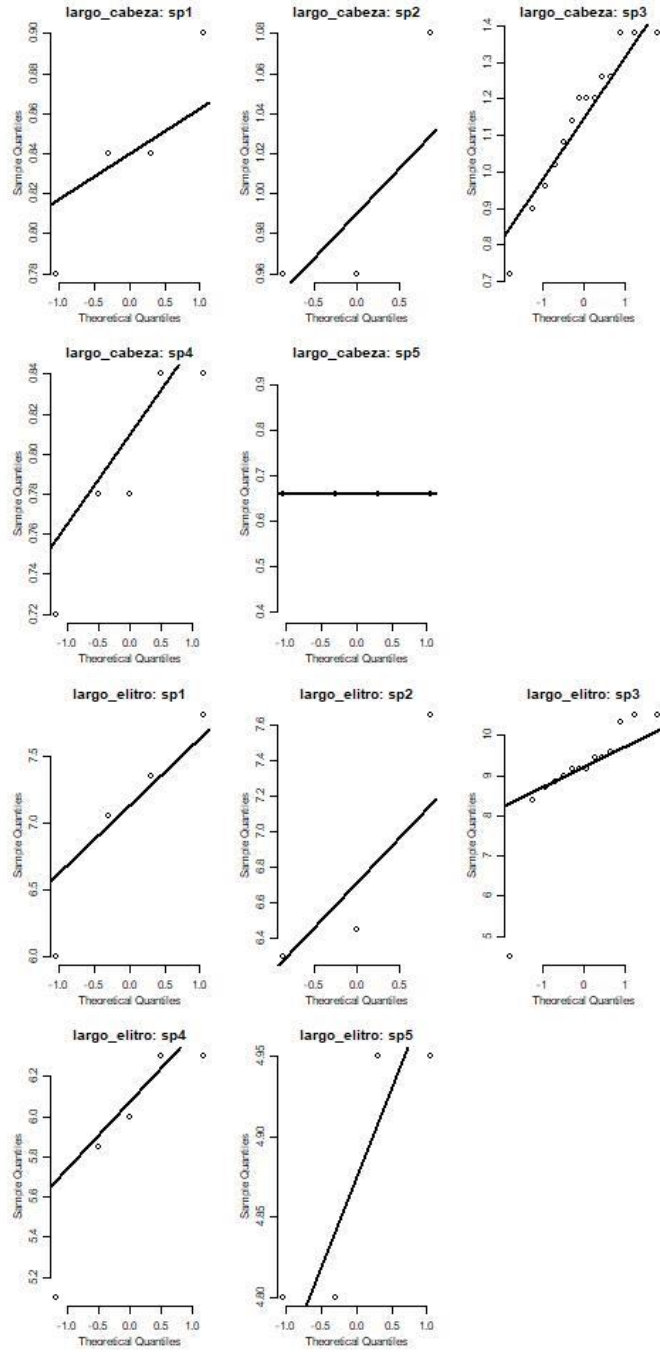




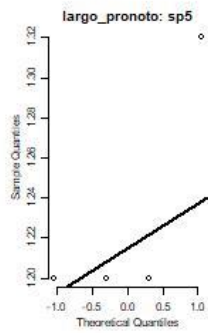
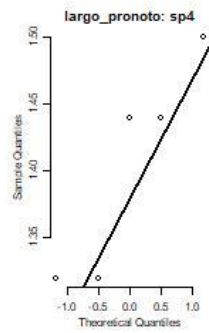
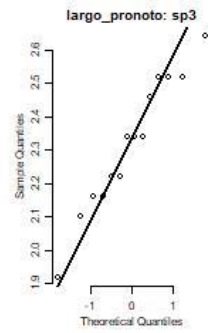
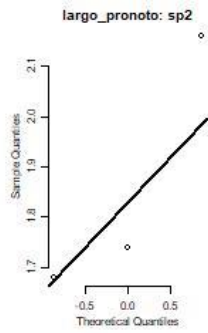
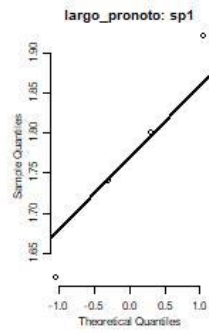
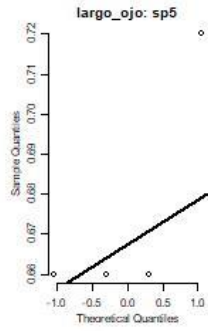
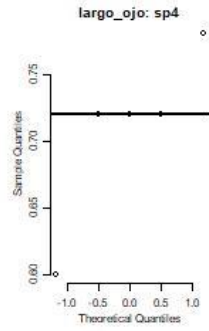
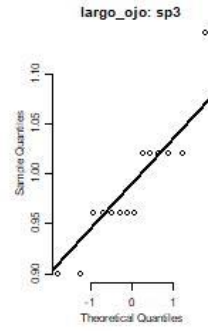
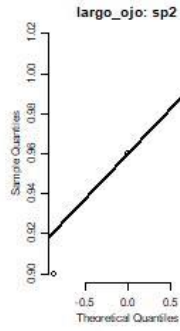
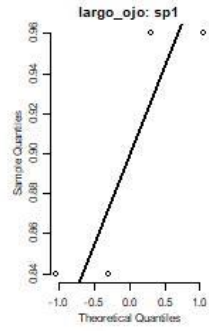


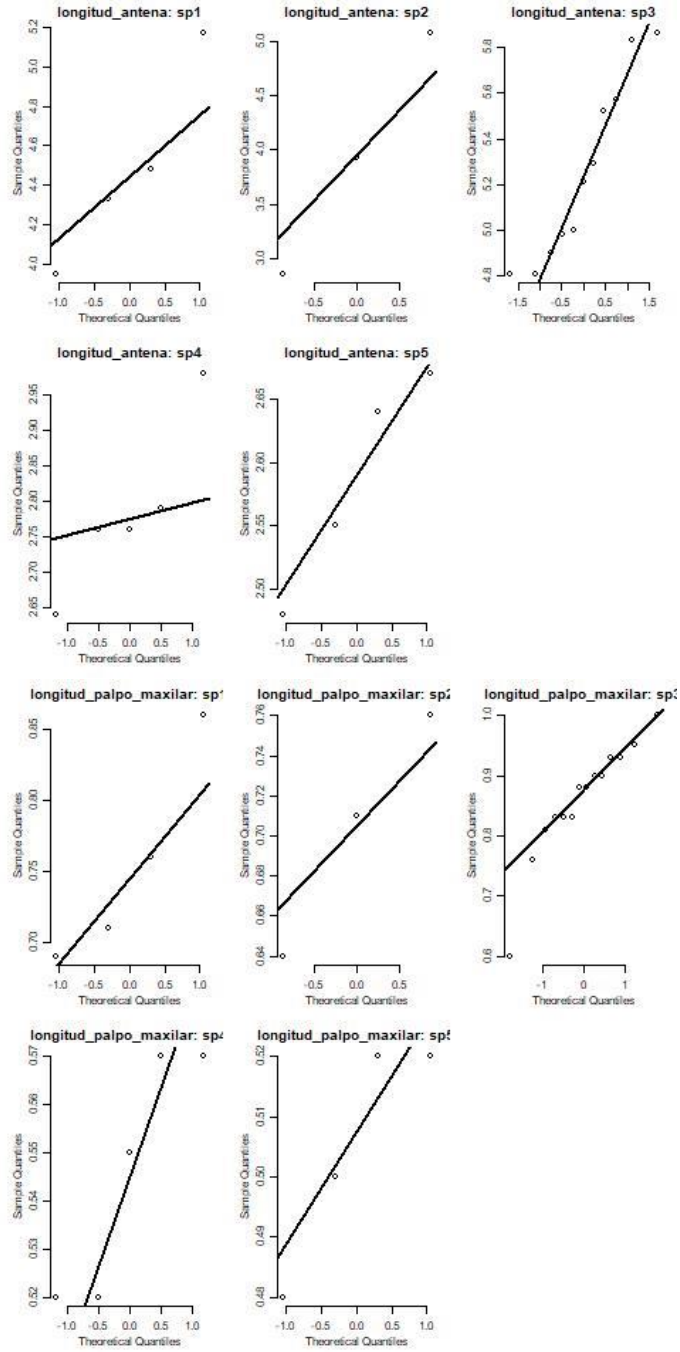


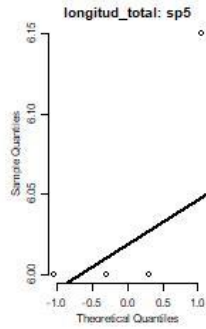
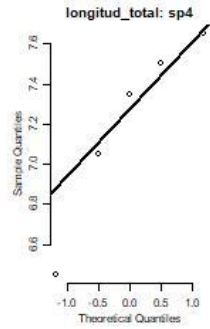
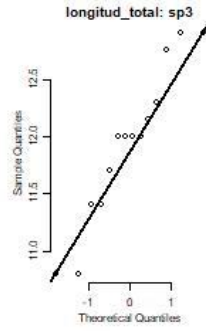
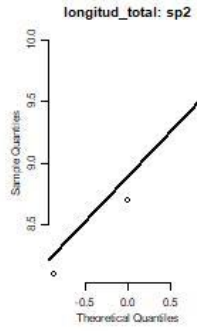
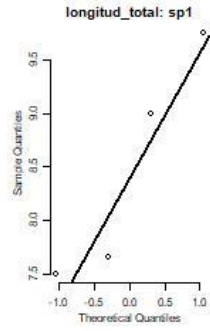






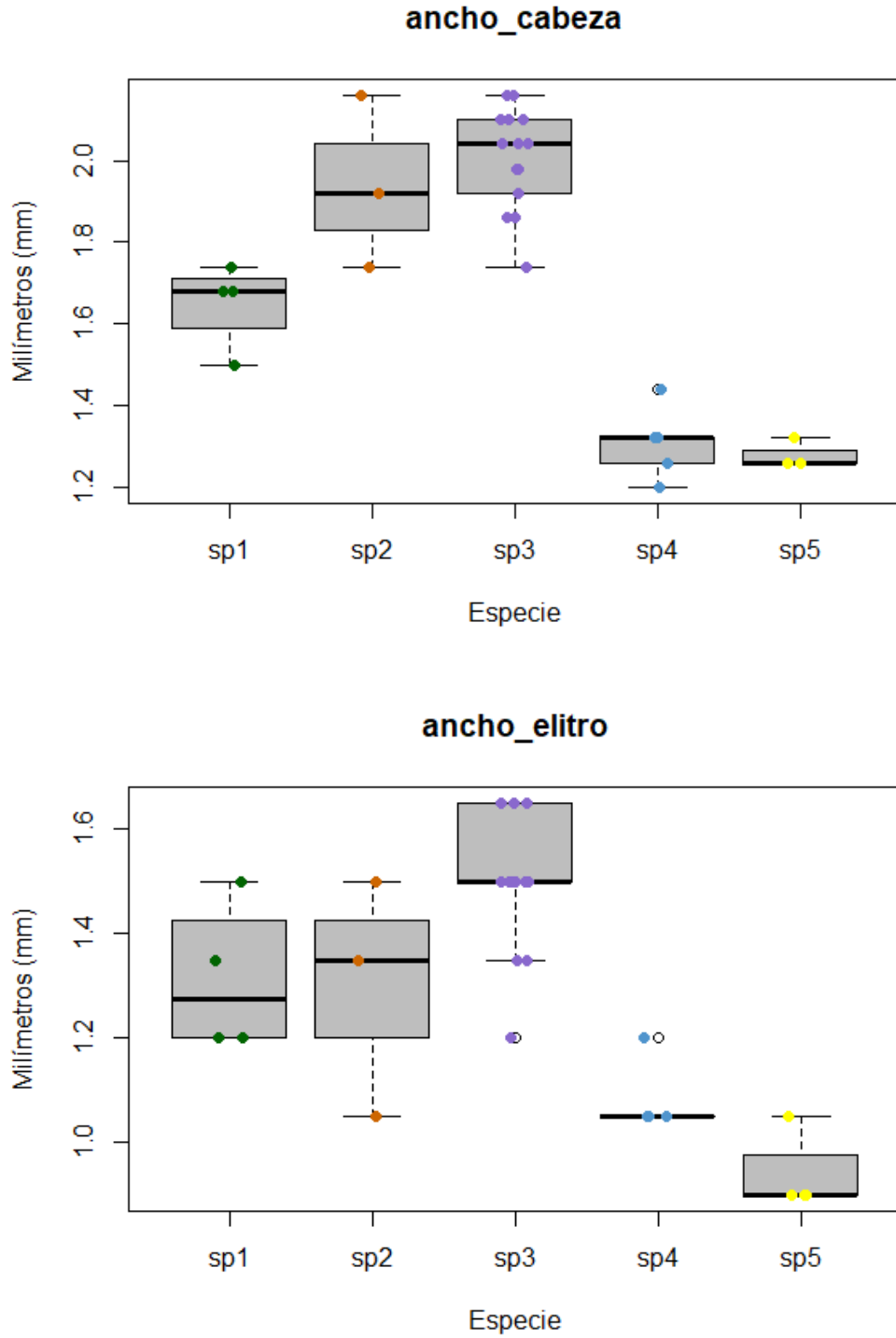




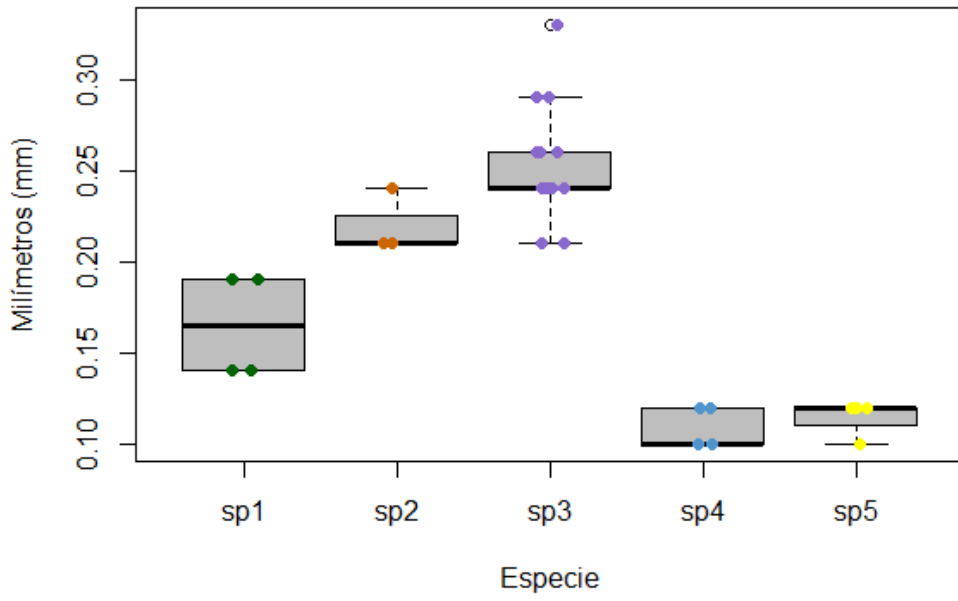


## ANEXO F.

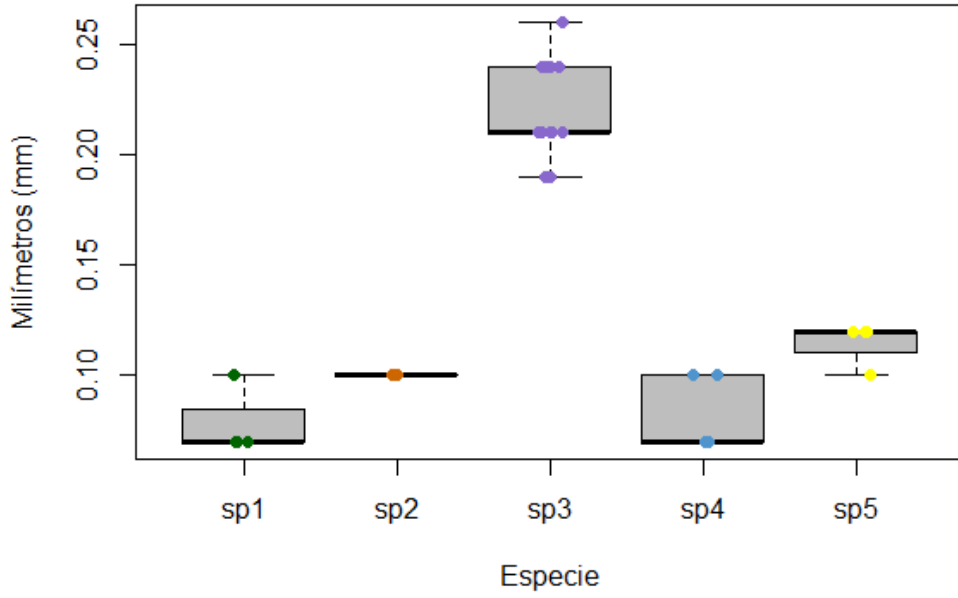
**Figura 17.** Boxplots del set completo de datos morfométricos. Los puntos de colores sobrepuestos muestran los individuos de cada localidad.



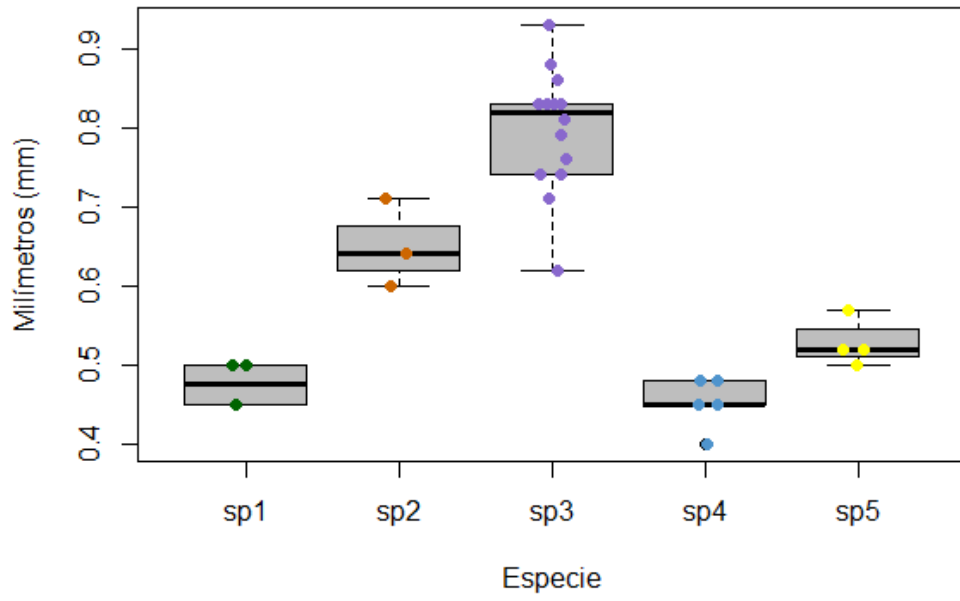
**ancho\_fosa\_interantenal**



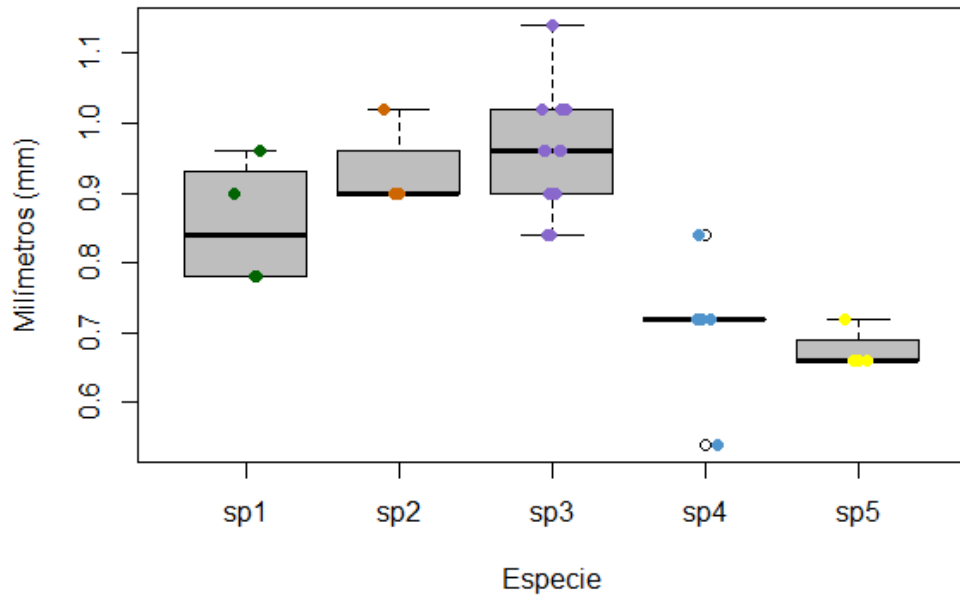
**ancho\_interantenal**



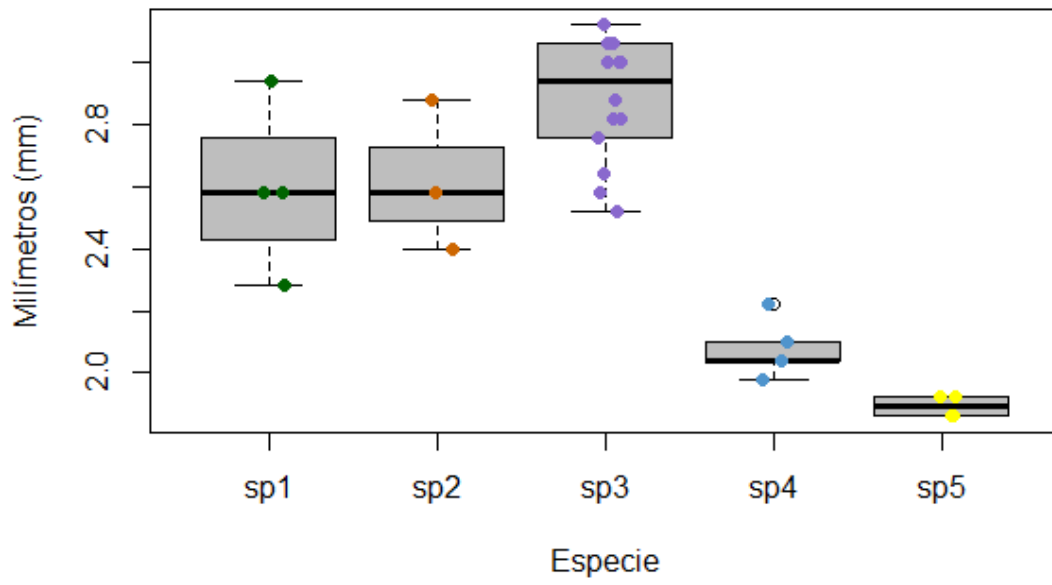
### ancho\_interocular



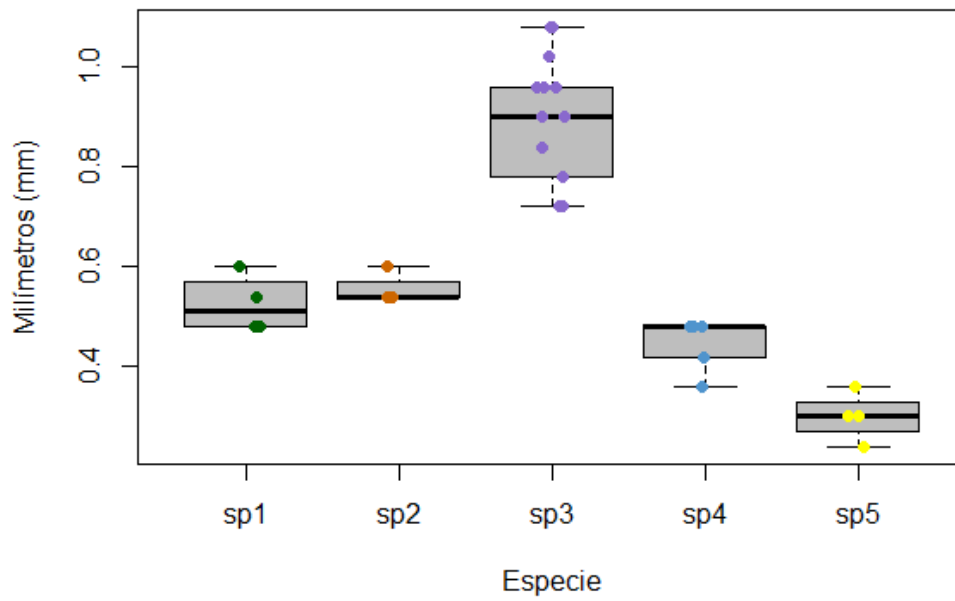
### ancho\_ojo



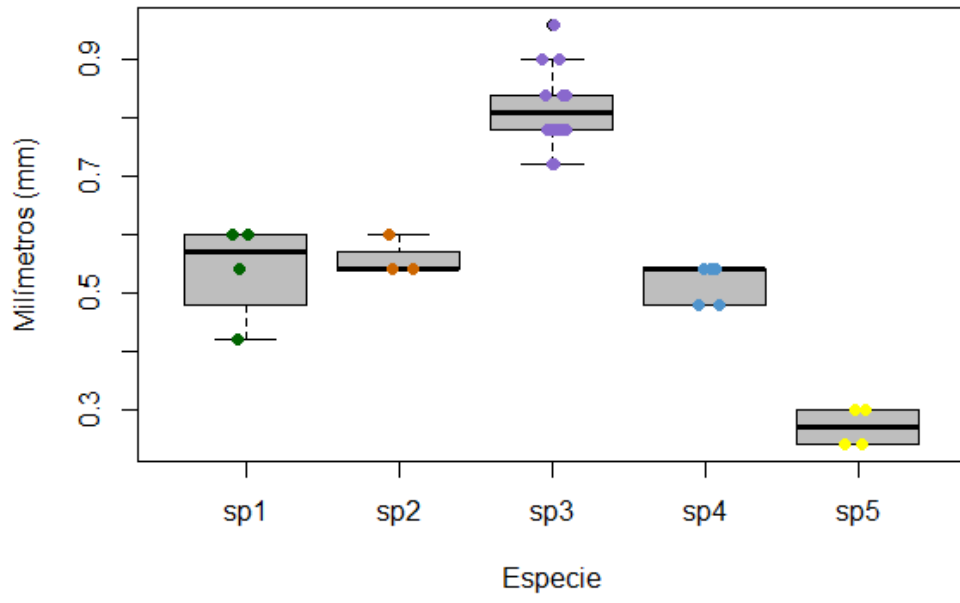
### ancho\_pronoto



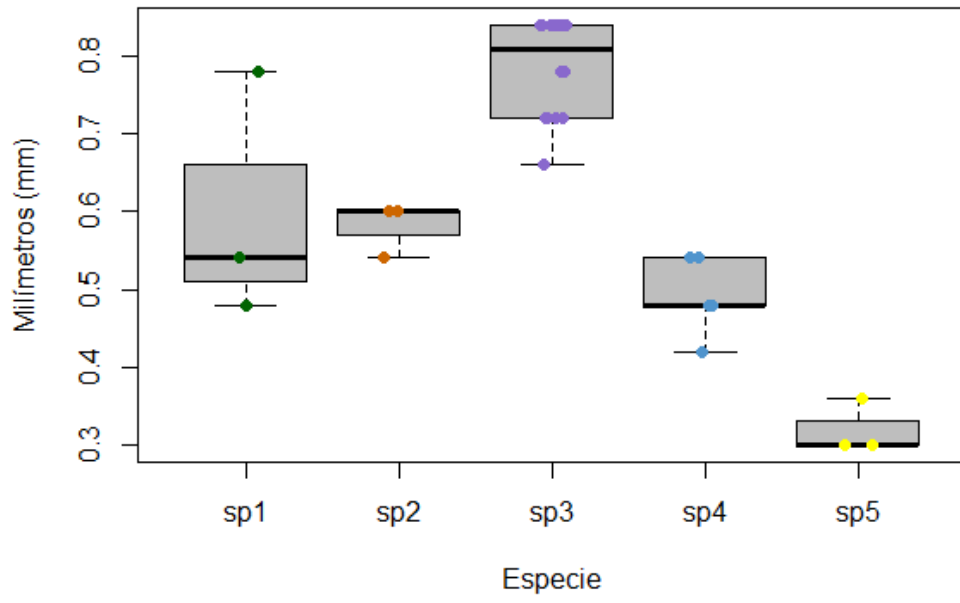
### esternito1



**esternito2**

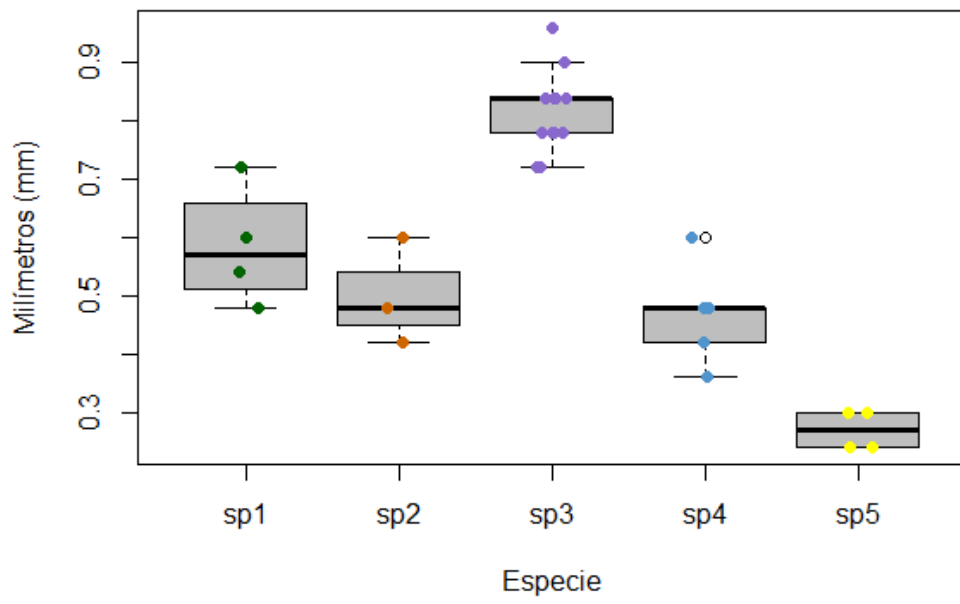


**esternito3**

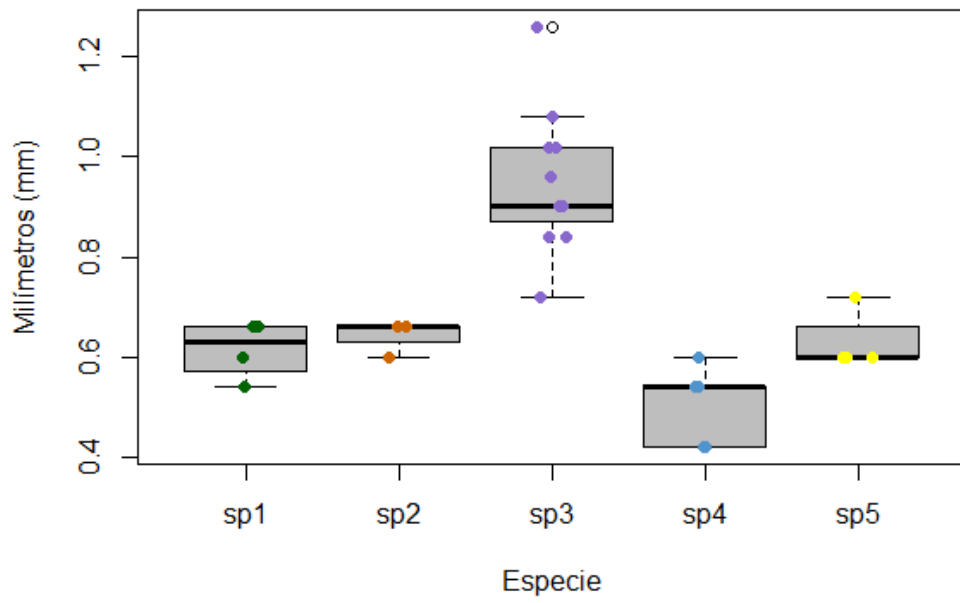




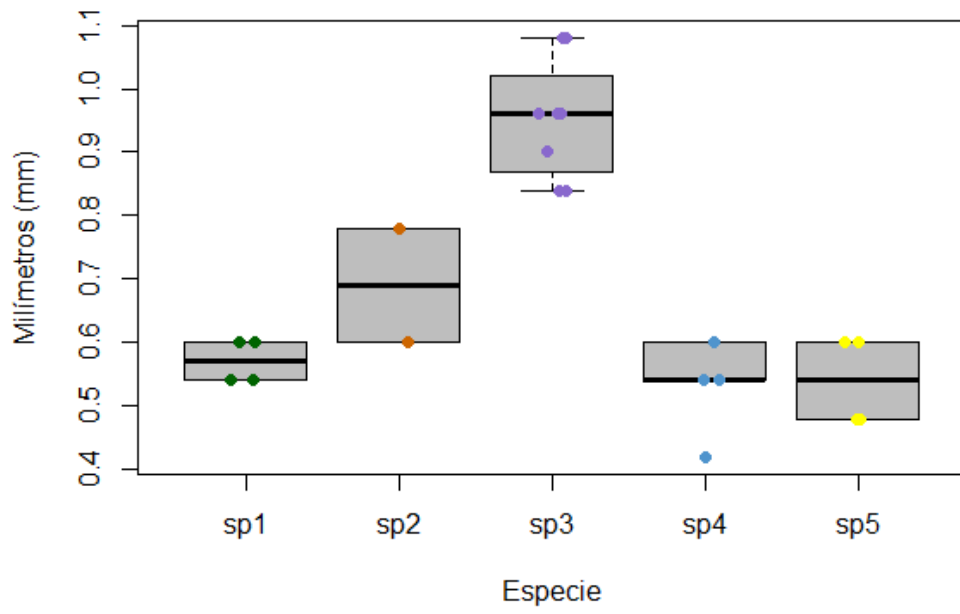
**esternito4**



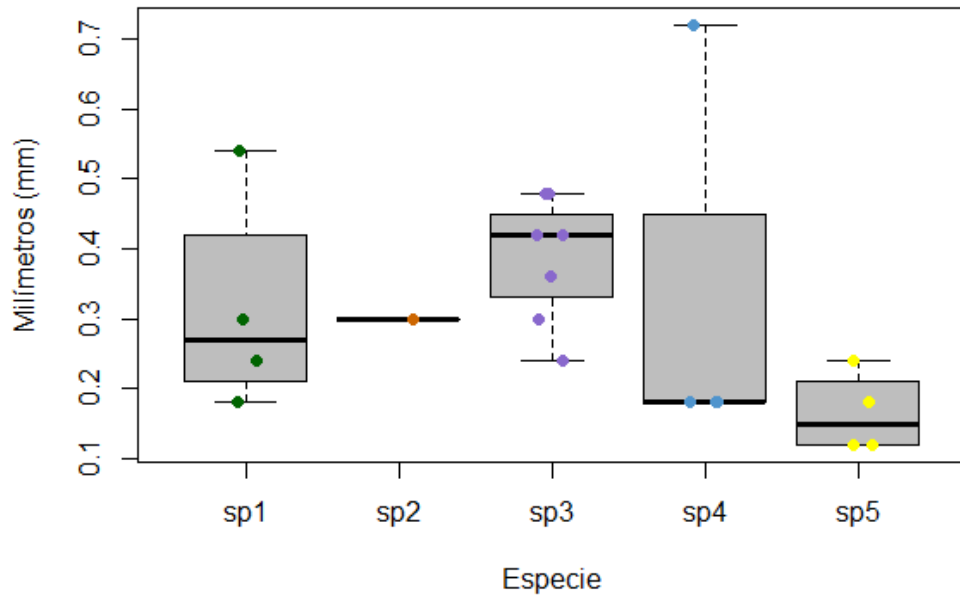
**esternito5**



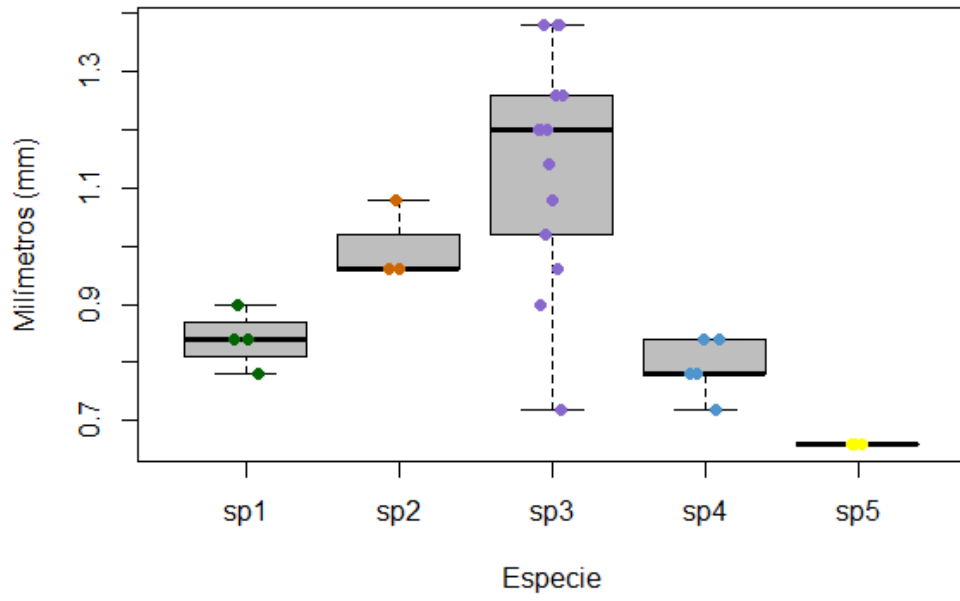
**esternito6**



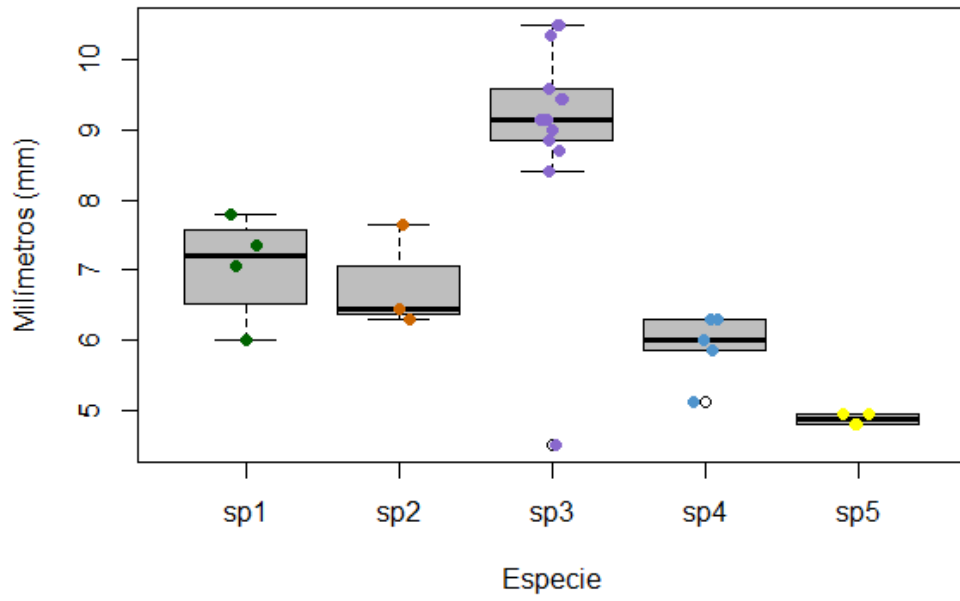
**esternito7**



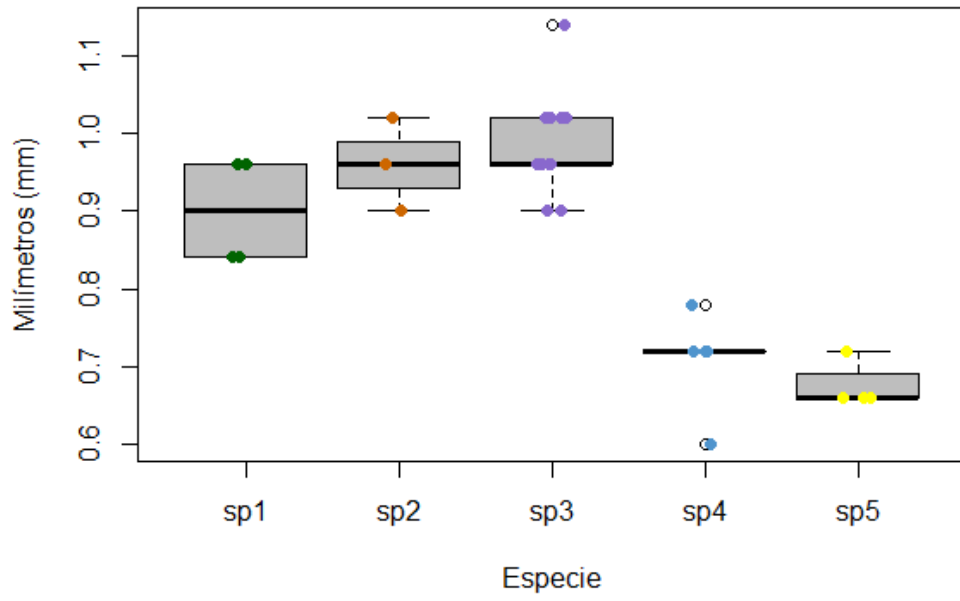
**largo\_cabeza**



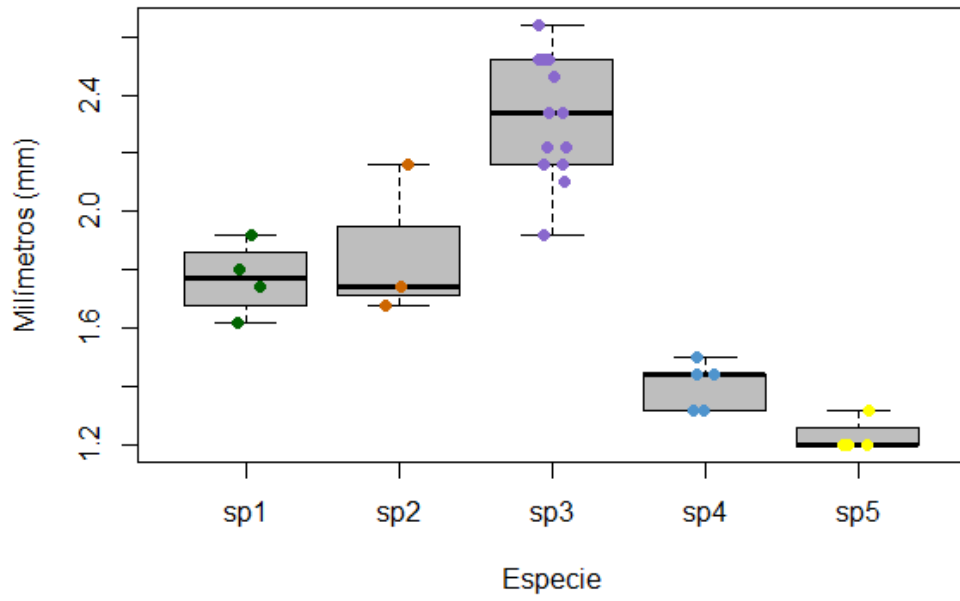
**largo\_elitro**



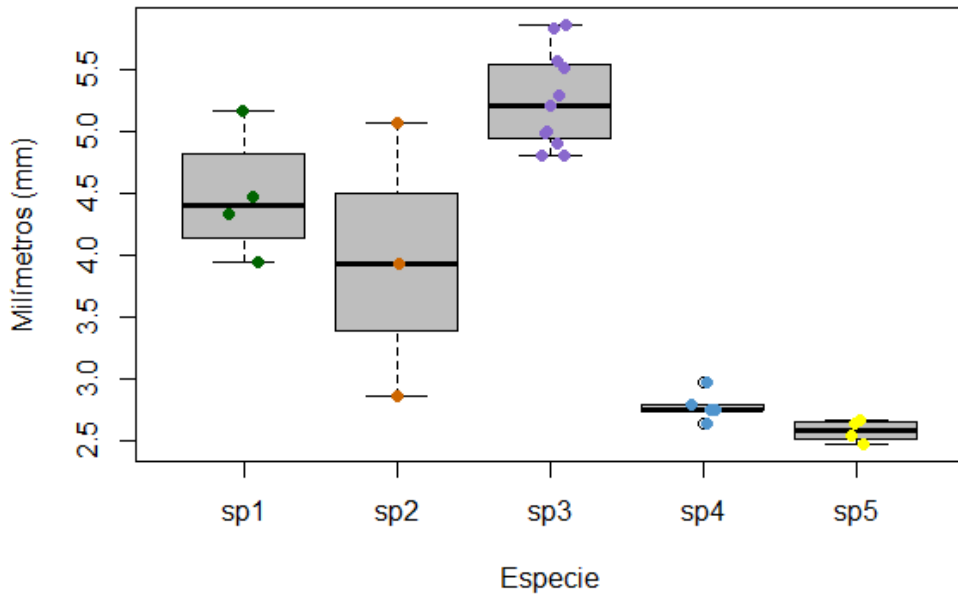
**largo\_ojo**



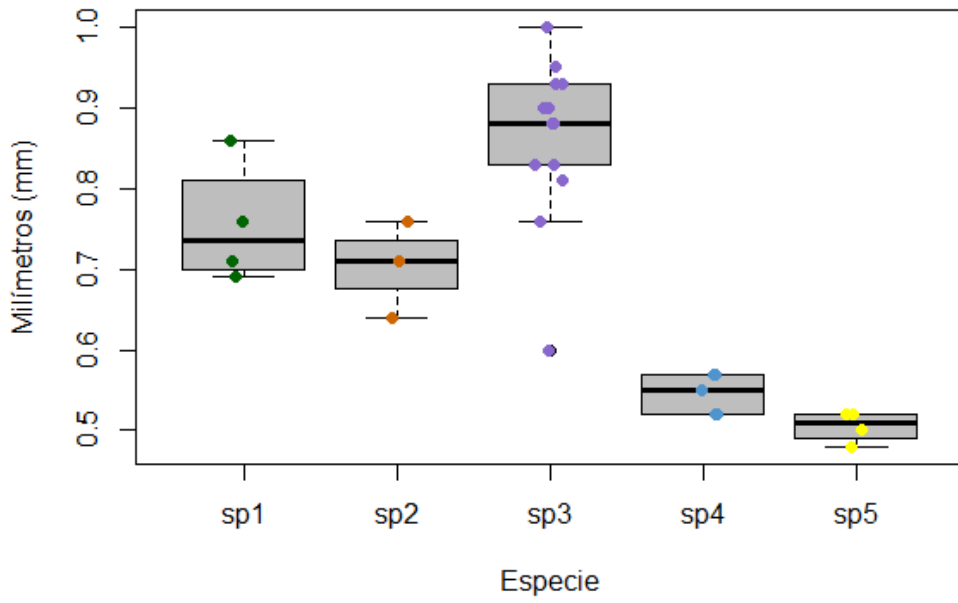
**largo\_pronoto**

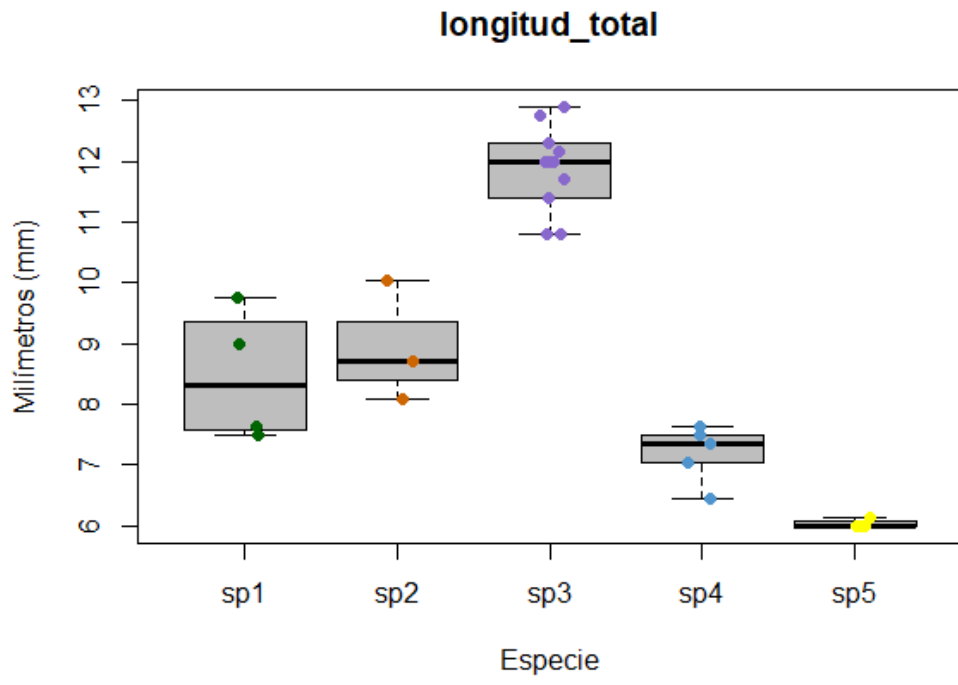


**longitud\_antena**

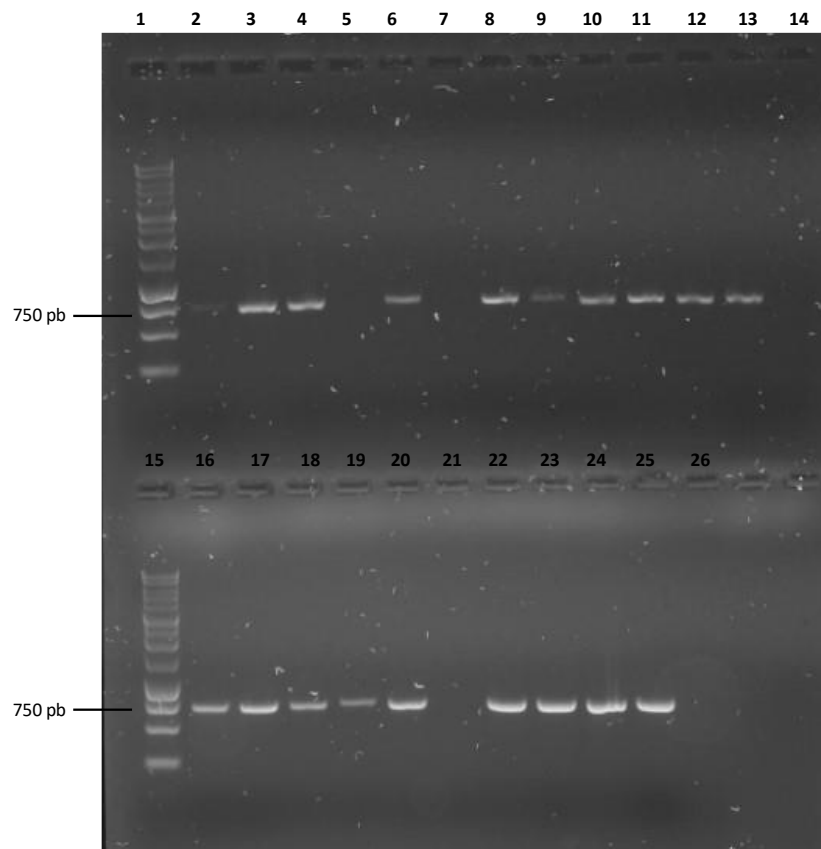


**longitud\_palpo\_maxilar**

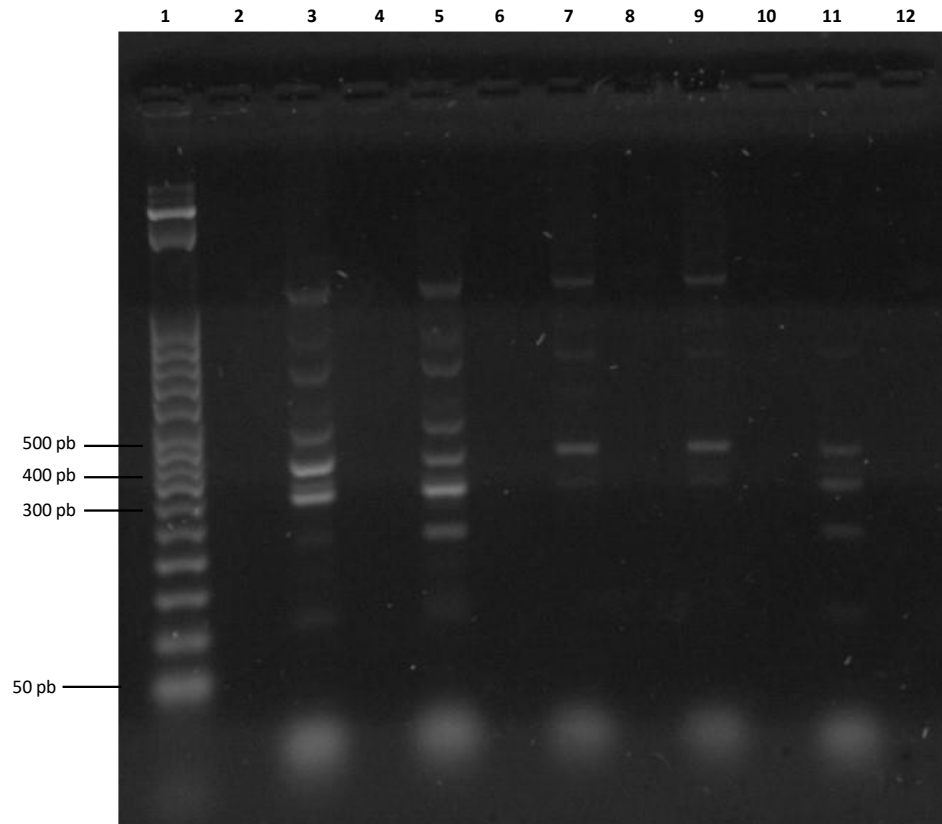




**ANEXO G.** Geles de electroforesis del gen COI y wingless.

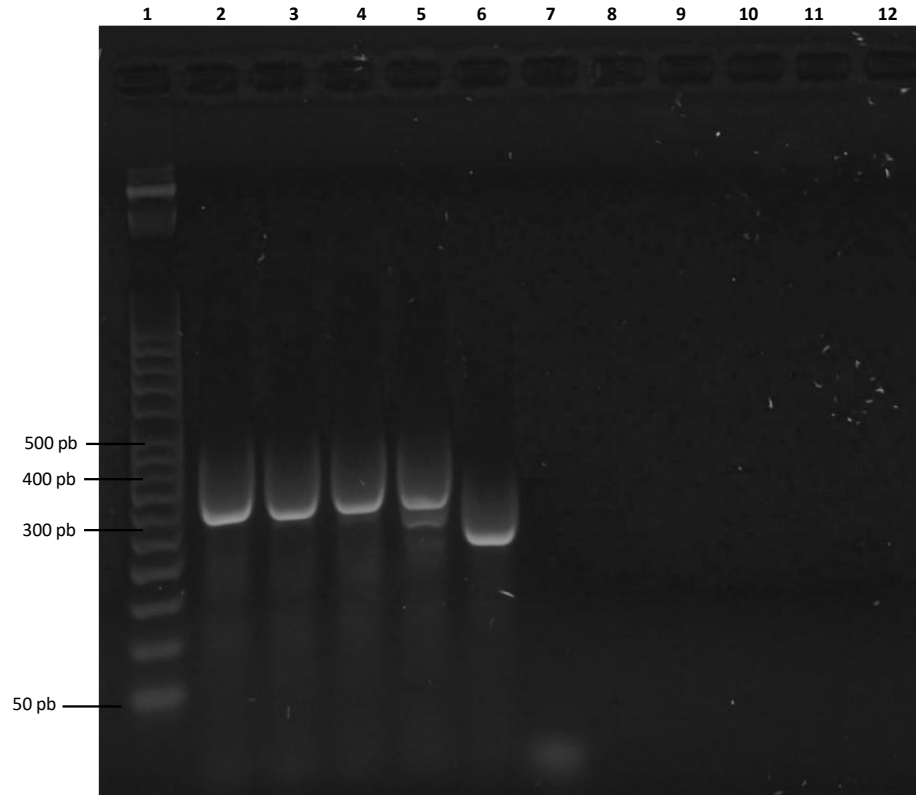


**Figura 18.** Gel de agarosa al 1% de muestras amplificadas para el gen **COI**. Carriles: 1 y 15 = escalera 1kb DNA Ladder (Promega); 2 = CC02, 3 = CC03, 4 = CC26, 5 = CC27, 6 = VA06, 7 = VA07, 8= VA08, 9 = VA10, 10 = BP15, 11 = BP16, 12 = BP17, 13 = control negativo, 16 = ER02, 17 = ER03, 18 = ER26, 19 = ER32, 20 = LA5, 21 = LA18, 22 = LA30, 23 = RH8, 24 = RH13, 25 = RH24 y 26 = control negativo.

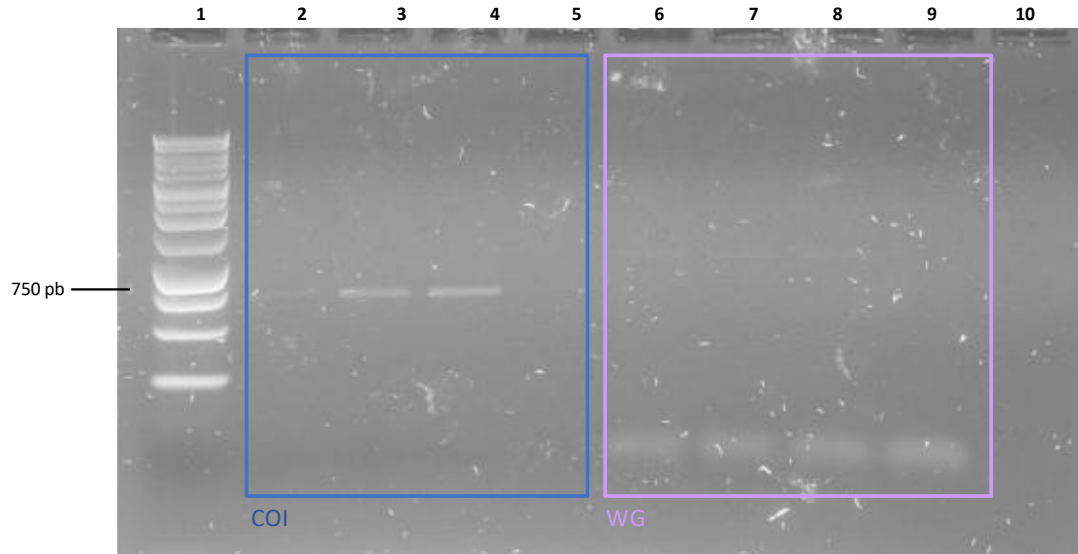


**Figura 19.** Gel de agarosa al 2% de muestras amplificadas para el gen *wingless*. Carril 1 = escalera Perfect DNA™ 50pb Ladder (Novagen); 3 = CC26, 5 = ER32, 7 = CC26(1), 9 = CC26(2), 11 = CC26\*, 12 = control negativo.

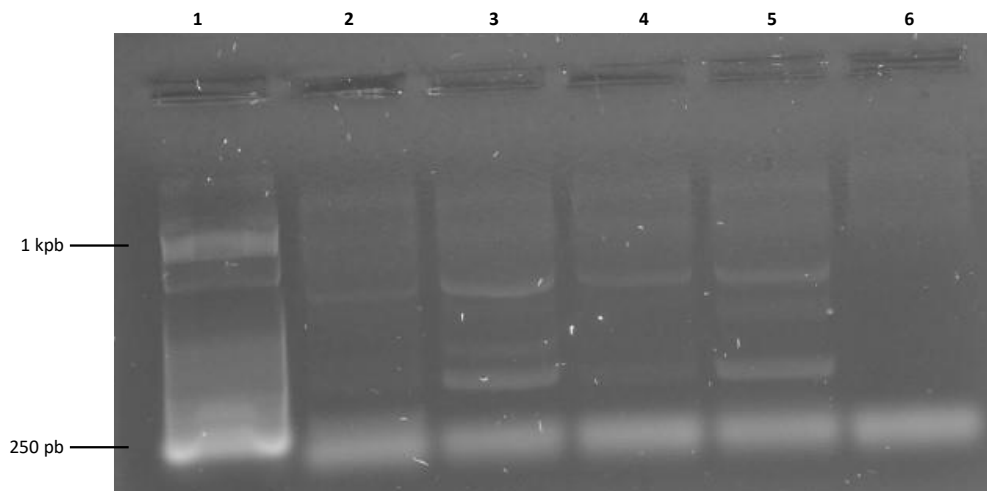




**Figura 20.** Gel de agarosa al 2% de muestras amplificadas para el gen *wingless* luego de haber realizado el band stab. Carril 1 = escalera Perfect DNA™ 50pb Ladder (Novagen); 2 = CC26, 3 = CC26, 4 = CC26\*, 5 = ER32, 6 = ER32(2) y 7 = control negativo.



**Figura 21.** Gel de agarosa al 1% de muestras amplificadas para el gen COI y *wingless* con temperatura de anillamiento 51-52 °C. Carril 1 = escalera 1kb DNA Ladder (Promega); 2 = CC02, 3 = CC02, 4 = CC02, 5 = control negativo COI, 6 = CC02 y 7 = CC02, 8 = CC02 y 9 = control negativo *wg*.



**Figura 22.** Gel de agarosa al 1% de muestras amplificadas para el gen *wingless* con el protocolo de touchdown PCR. Carril 1 = escalera 1kb DNA Ladder (Promega); 2 = CC27, 3 = BP15, 4 = ER32, 5 = VA10, 6 = control negativo.

ANEXO H. Reconstrucciones filogenéticas con valores de soporte de nodos.

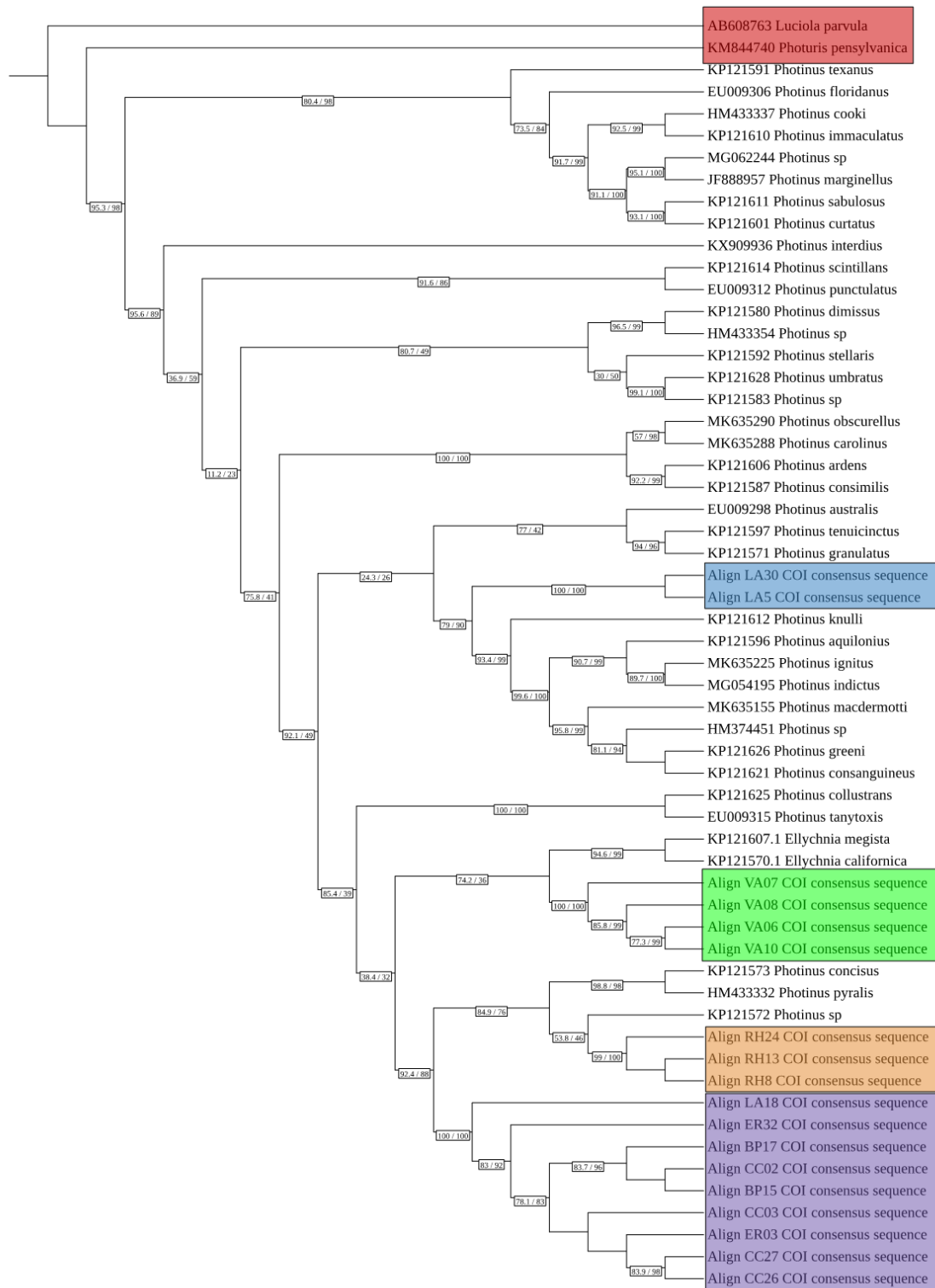
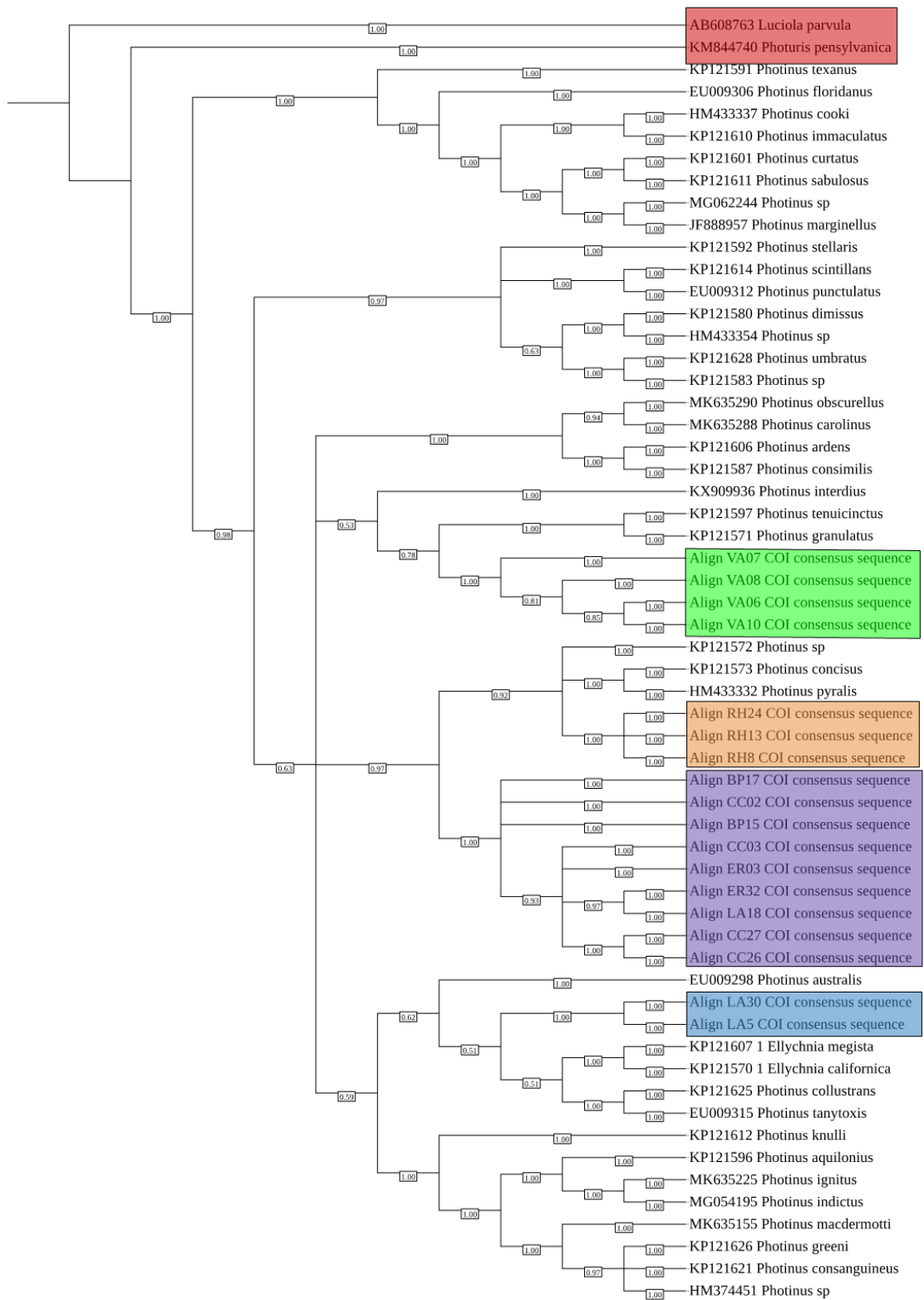


Figura 23. Reconstrucción filogenética con método ML. El soporte de los nodos se muestra con los valores de SH-aLRT/UFB.



**Figura 24.** Reconstrucción filogenética con método bayesiano. El soporte de los nodos se muestra con los valores de probabilidad posterior (PP).