

# Biogeografía molecular de escarabajos (Coleoptera: Passalidae) del género *Ogyges* grupo “*laevissimus*” y sus implicaciones en la conservación de los bosques nubosos de Guatemala

Cristian Beza<sup>2</sup>, Enio B. Cano<sup>1</sup>, Jack C. Schuster<sup>1</sup>, Diego Archila<sup>2</sup> y M. Palmieri<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Entomología Sistemática, <sup>2</sup>Departamento de Biología, Universidad del Valle de Guatemala.

**RESUMEN:** Morfológicamente *Ogyges laevissimus*, *O. hondurensis* y *O. politus* (Coleoptera: Passalidae) son muy parecidas entre sí, conformando un linaje particular dentro del altamente diverso género *Ogyges*. Analizamos la diversidad genética de dos de estas especies, *O. laevissimus* y *O. hondurensis*, basados en las secuencias del gen mitocondrial 12s de siete poblaciones (cinco de *O. laevissimus* y dos de *O. hondurensis*) de Guatemala y Honduras. El análisis filogenético molecular, con cuatro especies del mismo género como grupos externos (*Ogyges championi*, *O. cackchiqueli*, *O. tzutuhili* y una nueva especie), fue contrastado en mapas de distribución para cada población. Los resultados demuestran la monofilia del grupo “*laevissimus*”, así como aislamiento geográfico reciente entre las poblaciones, además de especiación por vicarianza. Encontramos un conflicto con la población de *O. hondurensis* del Cerro Miramundo, que queda más relacionada a *O. laevissimus* que a las otras poblaciones de *O. hondurensis*, lo que sugiere la posibilidad de que esté ocurriendo introgresión o que se trate de un nuevo taxón. El escenario biogeográfico sugiere que durante el Pleistoceno existió una población ampliamente distribuida, el ancestro común de *Ogyges* grupo “*laevissimus*”, que con el calentamiento global (interglaciación(es)), divergió en las actuales especies conocidas. El análisis de la divergencia entre poblaciones de una misma especie, sugiere un aislamiento más reciente (¿hace 12,000 años?). El hábitat de bosque de montaña donde habitan *O. laevissimus* y *O. hondurensis* muestra un alto grado de fragmentación reciente que amenaza con la extinción de las poblaciones locales.

**PALABRAS CLAVE:** Passalidae, *Ogyges*, Guatemala, Bosques nubosos, Biogeografía molecular, Conservación.

**Molecular biogeography of bess beetles (Coleoptera: Passalidae) of the “*laevissimus*” group of the genus *Ogyges* and its implications in conservation of cloud forests of Guatemala.**

**ABSTRACT:** Morphologically, *Ogyges laevissimus*, *O. hondurensis* and *O. politus* (Coleoptera: Passalidae) are very similar, forming a distinct lineage within the highly diverse genus *Ogyges*. We analyzed the genetic diversity of two of these species, *O. laevissimus* and *O. hondurensis*, based on the sequences of mitochondrial gene 12s of seven populations (five of *O. laevissimus* and two of *O. hondurensis*) from Guatemala and Honduras. A phylogenetic molecular analysis, with four species of the same genus as outgroups (*Ogyges championi*, *O. cackchiqueli*, *O. tzutuhili* and a new species), was compared with distribution maps of each population. The results express the monophyly of the “*laevissimus*” group, as well as the recent geographic isolation among the populations and speciation by vicariance. However, a conflict appears with the population of *O. hondurensis* from Cerro Miramundo. It appears to be more related to *O. laevissimus* than to other populations of *O. hondurensis*, which suggests the possibility that introgression is occurring or that this population is actually another species. The biogeographic scenario suggests that a widespread species existed during the Pleistocene, the ancestral population of the “*laevissimus*” group of *Ogyges*. With global warming (interglaciation(s)), the present species diverged from this population as they became isolated higher on mountains. Analysis of divergence among populations of the same species suggests recent isolation (12000 years ago?). The habitat of the montane forests inhabited by *O. laevissimus* and *O. hondurensis* have recently become highly fragmented, threatening the extinction of local populations.

**KEY WORDS:** Passalidae, *Ogyges*, Guatemala, Cloud forests, Molecular biogeography, Conservation.

## Introducción

Los pasálidos son ronrones o escarabajos (moxes en q'eqchi' y mam), también conocidos como pinpines en el oeste de Guatemala o vaquitas en Costa Rica. La familia Passalidae es fácil de reconocer (Figura 1); agrupa escarabajos relativamente grandes (13 a 80mm de largo), principalmente negros y con estrías en los élitros. Existen más de 600 especies de Passalidae en el mundo, con la mayor diversificación en los trópicos. Casi todos viven en madera podrida y son ecológicamente importantes en la degradación de la madera del bosque, así ayudando en reciclar la materia orgánica. Las especies más planas tienden a vivir debajo de la corteza y las más convexas dentro del tronco. Los adultos también producen sonidos. Su amplio vocabulario (una especie posee 14 señales acústicas diferentes (Schuster 1983)) está asociado con su alto nivel de subsocialidad (Schuster & Schuster 1997).

Tal vez la importancia principal de los pasálidos para nosotros es que se pueden usar como organismos indicadores de áreas de endemismo en bosques nubosos, pues proveen un parámetro importante en la priorización de la conservación de este tipo de áreas (Schuster *et al.* 2000). En muchas especies, las alas están reducidas y no pueden volar. Estas especies tienden a habitar en montañas aisladas de otras montañas. Además, el patrón de dispersión de las especies endémicas provee claves sobre la historia biogeográfica de Guatemala y Mesoamérica (e.g. MacVean & Schuster 1981, Schuster *et al.* 2003, Schuster & Cano 2006).

A pesar de los esfuerzos, los problemas taxonómicos continúan y los estudios moleculares han surgido como una nueva herramienta para dilucidar las relaciones filogenéticas y resolver problemas de convergencia evolutiva. Actualmente existen escasamente dos estudios publicados que tratan el análisis filogenético molecular de Passalidae, uno en Japón (Hosoya & Araya 2005) con una especie, *Cylindrocaulus patalis* y otro americano Smith *et al.* (2006) que no indica las especies de Passalidae utilizadas. Aquí presentamos los resultados de nuestros estudios de biogeografía molecular, basados en un fragmento del gen ribosomal 12S, de las poblaciones de dos especies de escarabajos Passalidae que no pueden volar, pertenecientes al grupo (línea) "laevissimus" del género *Ogyges* (Figura 1), que se distribuye en la Cadena Volcánica entre Guatemala, Honduras y El Salvador (Schuster & Reyes-Castillo 1990, Schuster *et al.* 2005). Actualmente, dicho grupo consiste de tres especies: *O. politus*, *O. laevissimus* y *O. hondurensis*.

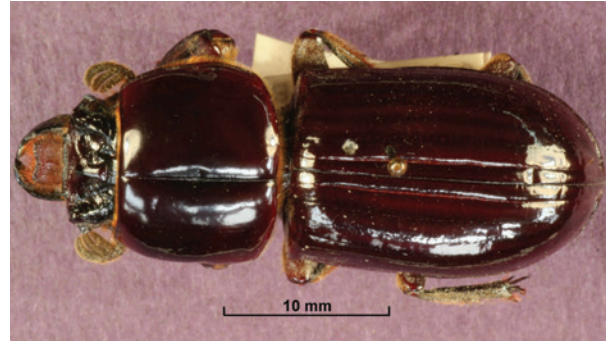


Figura 1. Adulto joven de la especie de Passalidae *Ogyges laevissimus*. Nótese las escasas estrías en los élitros, un carácter del grupo "laevissimus".



Figura 2. Cristian Beza (autor junior), colectando escarabajos pasálidos en troncos podridos.

## Materiales y métodos

### Material utilizado

Utilizamos material de Passalidae que recolectamos en troncos podridos (Figura 2), fijado en etanol al 95%. El material de *Ogyges laevissimus* proviene de Fuentes Georginas en el Cerro Zunil (Quetzaltenango), Volcán Chicabal (Quetzaltenango), Cerro Chuiraxamoló (Sololá), Volcán de Agua (Sacatepéquez) y Finca Carmona en Antigua Guatemala (Sacatepéquez) (Cuadro 1). Las poblaciones de *Ogyges hondurensis* fueron colectadas en Cerro Miramundo, Santa Rosa (Guatemala), El Portillo, Ocotepeque (Honduras) y La Esperanza, Intibuca (Honduras) (Cuadro 1). Se utilizó material colectado desde 1980 hasta el

Cuadro 1. Listado de material utilizado en el estudio y distribución geográfica.

Especie/Población	Individuos	País	Localidad	Año de colecta
<i>Ogyges laevissimus</i>	1	Guatemala	Sacatepéquez, Volcán de Agua, 2700m.	1982
<i>Ogyges laevissimus</i>	1	Guatemala	Quetzaltenango, Volcán Chicabal, 2500m	2009
<i>Ogyges laevissimus</i>	1	Guatemala	Sololá, Chuiraxamoló, 3000m	2008
<i>Ogyges laevissimus</i>	1	Guatemala	Sacatepéquez, Cerro Carmona, 2100m	2009
<i>Ogyges laevissimus</i>	1	Guatemala	Quetzaltenango, Fuentes Georginas (Zunil), 2400m.	2009
<i>Ogyges hondurensis</i>	2	Honduras	Intibuca, La Esperanza, 1800m	1980
<i>Ogyges hondurensis</i>	2	Honduras	Ocotepeque, El Portillo, 1900m	1981
<i>Ogyges hondurensis</i>	1	Guatemala	Santa Rosa, Cerro Miramundo, 1800m	1999
<i>Ogyges cackchiqueli</i>	1	Guatemala	Huehuetenango, Cuilco, 2100m	1996
<i>Ogyges tzutuhili</i>	1	Guatemala	Zacapa, San Lorenzo, Sierra de las Minas, 2400m	1993
<i>Ogyges championi</i>	1	Guatemala	Boja Verapaz, Purulhá, 1600m.	2006
<i>Ogyges n.sp.</i>	1	Guatemala	Chiquimula, Cerro Montecristo, 1600m	1998

año 2009 (Cuadro 1). Las muestras antiguas almacenadas en propanol al 80% fueron cambiadas a etanol al 95%. Todas las muestras fueron almacenadas en un cuarto frío a una temperatura de 4°C. Como grupo externo se utilizó material de Passalidae almacenado en la Colección de Artrópodos de la Universidad del Valle de Guatemala, previamente fijado en etanol al 95%. Ese material corresponde a cuatro especies: *Ogyges championi*, *O. cackchiqueli*, *O. tzutuhili* y una nueva especie de *Ogyges*. Mucho del material utilizado, colectado antes de 1979, o fijado previamente en Formol-Ácido Acético-Alcohol (FAA) (como se acostumbra en el caso de las larvas), no amplificó y en consecuencia no incluimos esos datos. El material de *Ogyges politus*, almacenado en seco, no amplificó para el 12S.

### Extracción y amplificación del ADN

Extrajimos el ADN por el método de Henry *et al.* (1990) que consistió en homogenizar las patas con nitrógeno líquido y luego lavar el residuo en dos amortiguadores, TENT (10mM Tris-HCl, Ph 7.4; 24mM EDTA; 10mM NaCl y 0.5% Tritón X-100) y TEN (amortiguador TENT excepto que no tiene el Tritón X-100). Se hicieron dos extracciones con fenol-cloroformo. El ADN se precipitó en isopropanol al 100%. Para la amplificación del gen 12s, variable entre 400 y 420 pares de bases, utilizamos los cebadores SR-J-14199 (5'-TAC TAT GTT ACG ACT TAT- 3') y SR-N-14594 (5'-AAA CTA GGA TTA GAT ACCC-3') (Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT), Corallville, IA, USA). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl con la receta siguiente: 16.80 µl de H<sub>2</sub>O, 2.5 µl Buffer 10x, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µl de cada cebador, 1.00 µl de dNTP's, 0.20 µl de Taq y 200 ng de ADN. Se realizaron geles de agarosa al 1%, para verificar la amplificación de los genes. Los segmentos obtenidos fueron purificados utilizando el kit Wizard PCR Prep. DNA Purification System, Promeg (Madison, Wisconsin USA) y enviados a secuenciar a la empresa Macrogen, USA, a una concentración de 30ng/l, junto con los dos cebadores del gen 12s (a una concentración de 5pmol/l). Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando los programas Seqman Pro y Editseq de Lasergene 8 (DNASTAR, Inc. - NetNation), utilizando los electroferogramas (tanto el "forward" como el "reverse"). Las secuencias fueron alineadas utilizando el método Clustal W, por medio del programa Megalign (DNASTAR, Inc. - NetNation).



Figura 3. Diego Archila (autor junior), en proceso de amplificación de ADN.

Excepto la secuenciación, todo el trabajo se realizó en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala (Figura 3).

### Análisis filogenético y biogeografía molecular

El análisis filogenético se realizó con el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.* 2007), con el método de Simplicidad Máxima ("Maximum Parsimony") y se seleccionó el árbol de consenso. La filogenia molecular del "grupo interno" fue contrastada en un mapa de Centroamérica Nuclear, donde se indica la distribución de cada población.

### Resultados

La filogenia molecular basada en el gen 12S, junto con la distribución geográfica de las especies y poblaciones, se presentan en la figura 4. Se presentan los resultados de 5 poblaciones de *Ogyges laevisimus*, 3 poblaciones de *Ogyges hondurensis* y una población de cada una de las siguientes especies (grupos externos): *Ogyges tzutuhili*, *Ogyges cackchiqueli*, *Ogyges championi* y *Ogyges n.sp.* (vea Cuadro 1).

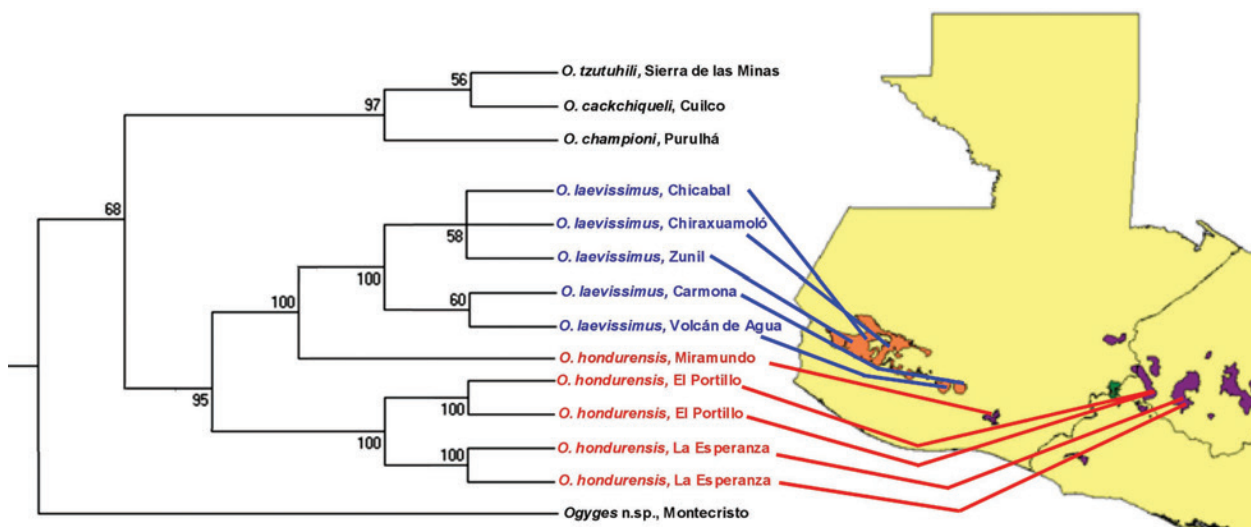


Figura 4. Filogenia molecular y áreas de distribución geográfica de dos especies del género *Ogyges* grupo "laevisimus".

## Discusión de resultados

### Filogenia y biogeografía molecular

La filogenia de la figura 4 sostiene que las especies de *Ogyges* del grupo "laevissimus" constituyen un taxón monofilético, basado en las secuencias del gen mitocondrial 12S (sin embargo, note que la especie *O. politus* no se encuentra incluida en el trabajo). La filogenia también muestra una clara separación entre las dos especies estudiadas (*O. laevissimus* y *O. hondurensis*) excepto por el hecho de que la población de *O. hondurensis* del Cerro Miramundo, cerca del límite de distribución al este de *O. laevissimus* en el Volcán de Agua, se encuentra más relacionada a *O. laevissimus* que a otras poblaciones de *O. hondurensis* que se encuentran más al oriente, hacia Honduras (Figura 4). Esa incongruencia sugiere la posibilidad de que esté ocurriendo introgresión para el gen 12S, o que se trate de un nuevo taxón.

La filogenia también muestra que las poblaciones de *O. laevissimus* se encuentran parcialmente aisladas (todas las especies de *Ogyges* tienen las alas reducidas y son incapaces de volar, así que deben caminar para trasladarse entre sitios). Actualmente la distribución altitudinal de *O. laevissimus* está restringida a bosques nubosos muy altos (2100-2700m de acuerdo a MacVean y Schuster (1981)), rodeados de valles relativamente secos. La confiabilidad de nuestro análisis está apoyada por el hecho de que poblaciones cercanas geográficamente también salen cercanas filogenéticamente, como es de esperar. Por ejemplo, Cerro Carmona, al lado del Volcán de Agua, forman un clado con un ancestro común reciente (Figura 4).

Las especies que representan los grupos externos muestran resultados interesantes. Por un lado, hay un clado hermano de la línea "laevissimus" formado por las especies *O. cackchiqueli*, *O. tzutuhili* y *O. championi* y por el otro, una nueva especie que tentativamente estamos asignando al género *Ogyges*. Las especies del "grupo hermano" fueron incluidas en dos linajes diferentes por Schuster & Reyes-Castillo (1990): la línea "cackchiqueli" (*O. cackchiqueli*, *O. tzutuhili*, *O. furcillatus* y *O. marilucasae*) y la línea "laevior" (*O. championi* y *O. kekchii*). Esas especies, con la excepción de *O. marilucasae* de las montañas del sur de Chiapas, se encuentran distribuidas al norte del Valle seco del río Motagua. Un evento reciente, el fin de la glaciación del Pleistoceno, determinó definitivamente los actuales patrones de distribución, y estableció la barrera geográfica más importante para la biota de Guatemala, el Corredor Subhúmedo (Schuster & Cano 2006) que corre desde la Depresión Central de Chiapas en México, a través de Nentón y Cuilco en Huehuetenango, pasando por Sacapulas en Quiché hasta llegar al valle seco de Salamá en Baja Verapaz y del río Motagua entre los departamentos de El Progreso y Zacapa. Las especies de bosques húmedos de montaña que no pueden volar y son estenoicas, quedaron restringidas a diferentes áreas, con la consecuente divergencia genética observada.

### Implicaciones en la conservación de bosques nubosos

A pesar de su alta diversidad biológica, marcados endemismos y su importancia manteniendo las cuencas hidrográficas, los bosques nubosos de Guatemala (Figura 5), han sido poco estudiados y se encuentran en peligro de desaparecer debido a la destrucción del hábitat. El daño se produce principalmente por el avance de la frontera agrícola, especialmente la conversión

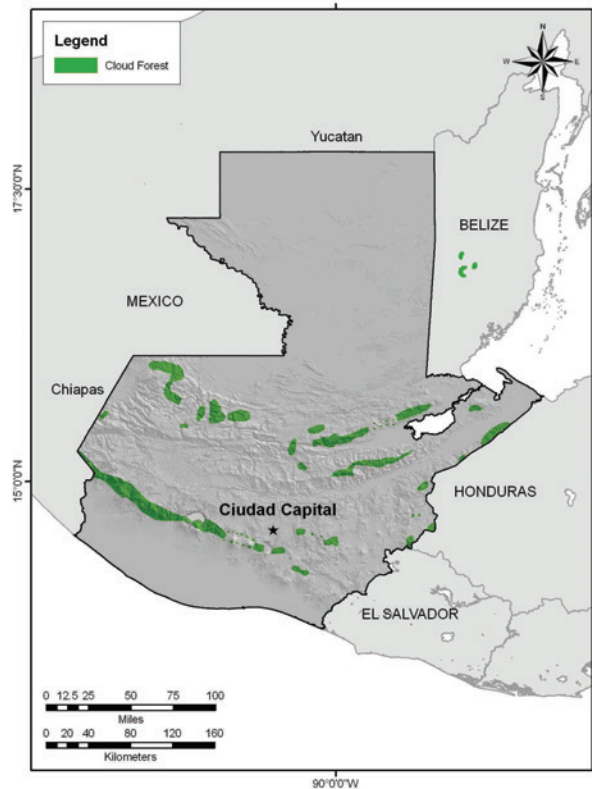


Figura 5. Distribución y extensión aproximada de los bosques nubosos en Guatemala. Mapa basado en nuestros datos de recolección de escarabajos.

a cafetales, y actividades ganaderas; la extracción de productos maderables y no maderables; la construcción de carreteras; el establecimiento de asentamientos humanos; y por el desplazamiento que sufren estos bosques debido al cambio climático global.

Los resultados del estudio de poblaciones de *Ogyges* del grupo "laevissimus" muestra una elevada diversidad genética intrapoblacional en los bosques nubosos de la cadena volcánica de Guatemala. Las poblaciones tienen algún grado de separación, con secuencias genéticas diferentes (haplotipos). Los datos provenientes de los especímenes analizados, de las colecciones y de la literatura, indican que las poblaciones de *Ogyges laevissimus*, endémicas a los volcanes del occidente de Guatemala se distribuyen en áreas donde actualmente no existen reservas biológicas funcionales, exceptuando la Reserva "Refugio del Quetzal" de la Universidad del Valle de Guatemala, en el Volcán Atitlán. Así, las poblaciones de *O. laevissimus* y especies acompañantes están seriamente amenazadas. Es aun peor el caso de *Ogyges hondurensis*, cuyas poblaciones se encuentran reducidas a apenas tres islas de bosque nuboso en Guatemala: Cerro Miramundo en Santa Rosa, La Unión en Zacapa y la aldea Cafetales en Chiquimula. Esos tres sitios se encuentran bajo continua amenaza de destrucción; sin embargo, poblaciones de *O. hondurensis* se encuentran en áreas protegidas en Honduras (Reserva "El Güisayote") y El Salvador (Reserva "El Pital").

## Conclusiones

- El grupo “*laevissimus*” de *Ogyges* salió como grupo monofilético.
- Probablemente la especiación entre *O. laevissimus* de los volcanes del occidente de Guatemala, *O. hondurensis* de las montañas del este de Guatemala y oeste de Honduras y El Salvador, y *O. politus* del Cerro Montecristo (en la frontera entre Guatemala, Honduras y El Salvador), se produjo debido a vicarianza. El ancestro debió haber estado ampliamente distribuido al sur del Valle del río Motagua.
- El hábitat de bosque de montaña, donde habitan los pasálidos *O. laevissimus*, *O. hondurensis* y *O. politus*, ha mostrado un alto grado de reducción y fragmentación. Como lo evidencian los resultados, estos son bosques con genes únicos, no exclusivamente de pasálidos sino también de salamandras (Rovito et al. 2009, Campbell et al. 2010) y lagartijas (Campbell & Frost 1993), que deben ser priorizados en el establecimiento de reservas biológicas.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad del Valle de Guatemala (UVG), así como a la Escuela de Biología de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC) y al Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IE-UNAM), por el apoyo brindado a los investigadores de este proyecto. Los permisos de investigación y colecta fueron proporcionados por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT), por el financiamiento brindado al proyecto FD065-2006 “Evaluación de áreas de endemismo por análisis de variabilidad genética y relaciones filogenéticas de *Passalidae*, utilizando marcadores moleculares”. Agradecemos especialmente al Lic. Andrés Ávalos, por el apoyo que nos brindó en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Resaltamos el apoyo que recibimos de muchas personas, incluyendo el proyecto LLAMA liderado por John Longino y Robert Anderson, en la colecta y contribución de pasálidos a través de muchos años.

## Bibliografía

- Campbell J.A., D.R. Frost (1993) *Anguid lizards of the genus Abronia: revisionary notes, descriptions of four new species, a phylogenetic analysis, and key* Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. **216**: 1-121
- Campbell J.A., E.N. Smith, J. Streicher, M.E. Acevedo, E.D. Brodie (2010) *New salamanders (Caudata: Plethodontidae) from Guatemala, with miscellaneous notes on known species* Misc. Publ. Mus. Zool., Univ. Michigan, No. 200
- Henry J.M., A.K. Raina, R.L. Ridgway (1990) *Isolation of high molecular-weight DNA from insects* Analytical Biochemistry **185**:147-150
- Hosoya T., K. Araya (2005) *Phylogeny of Japanese stag beetles (Coleoptera: Lucanidae) inferred from 16s mtrRNA gene sequences, with reference to the evolution of sexual dimorphism of mandibles* Zoological Science **22**: 1305-1318
- MacVean C., J.C. Schuster (1981) *Altitudinal distribution of passalid beetles (Coleoptera, Passalidae) and Pleistocene dispersal on the volcanic chain of northern Central America* Biotropica **13** (1): 29-38
- Rovito S., G. Parra-Olea, C. Vásquez-Almazán, T.J. Papenfuss, D.B. Wake (2009) *Dramatic declines in neotropical salamander populations are an important part of the global amphibian crisis* PNAS **106**: 3231-3236

- Schuster J.C. (1983) *Acoustical signals of passalid beetles: Complex repertoires* Florida Entomologist **66** (4): 486-96
- Schuster J.C., E.B. Cano (2005) *La distribución Mesoamericana de Montaña: síntesis de Passalidae (Col. Scarabaeoidea) para Mesoamérica Nuclear* En: J. Llorente, J.J. Morrone (eds) *Regionalización biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines* Primeras jornadas biogeográficas de la Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática (RIBES XII.I-CYTED) Facultad de Ciencias, UNAM, México, pp. 257-268
- Schuster J.C., E.B. Cano (2006) *What can Scarabaeoidea contribute to the knowledge of the biogeography of Guatemala?* Coleopterists Bulletin **60**: 57-70
- Schuster J.C., P. Reyes-Castillo (1990) *Coleoptera, Passalidae: Ogyges Kaup, revisión de un género Mesoamericano de Montaña* Acta Zoológica Mexicana (n.s.) **40**:1-49
- Schuster J.C., L.B. Schuster (1997) *The evolution of social behavior in Passalidae (Coleoptera)* En: J.C. Choe, J. Crespi (eds) *The evolution of social behavior in insects and arachnids* Cambridge University Press, pp. 260-269
- Schuster J.C., E.B. Cano, S. Boucher (2005) *Ogyges and Veturius (Col.: Passalidae) in Central America: Synonymies, range extensions and new species* Acta Zoológica Mexicana (n.s.) **21**(2):115-132
- Schuster J.C., E.B. Cano, C. Cardona (2000) *Un método sencillo para priorizar la conservación de los bosques nubosos de Guatemala, usando Passalidae (Coleoptera) como organismos indicadores* Acta Zoológica Mexicana (n.s.) **80**:197-209
- Schuster J.C., E.B. Cano, P. Reyes-Castillo (2003) *Proculus, giant Latin American passalids (Col., Passalidae): A generic, phylogenetic and biogeographic revision* Acta Zoológica Mexicana (n.s.) **90**:281-306
- Smith A.B., D.C. Hawks, J.M. Heraty (2006) *An overview of the classification and evolution of the major scarab beetle clades (Coleoptera: Scarabaeoidea) based on preliminary molecular analyses* Coleopterists society monograph 5: 35-46
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumar (2007) *MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*



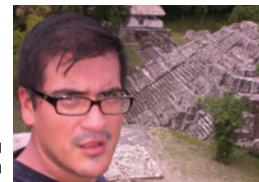
Cristian Beza  
cristianbeza@msn.com



Enio Cano  
ecano@uvg.edu.gt



Jack C. Schuster  
jschuste@uvg.edu.gt



Diego Archila  
xdiego502x@gmail.com



Margarita Palmieri  
palmieri@uvg.edu.gt