

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización molecular y análisis biogeográfico de tres especies de escarabajos del género *Ogyges* (Coleoptera: Passalidae) en las islas de bosque nuboso de las montañas al sur de Guatemala.

Trabajo de investigación presentado
por Cristian Fernando Beza Beza
para optar al grado de licenciado en Biología

Guatemala
2009

Caracterización molecular y análisis biogeográfico de tres especies de escarabajos del género *Ogyges* (Coleoptera: Passalidae) en las islas de bosque nuboso de las montañas al sur de Guatemala.

Universidad del Valle de Guatemala

Facultad de Ciencias y Humanidades

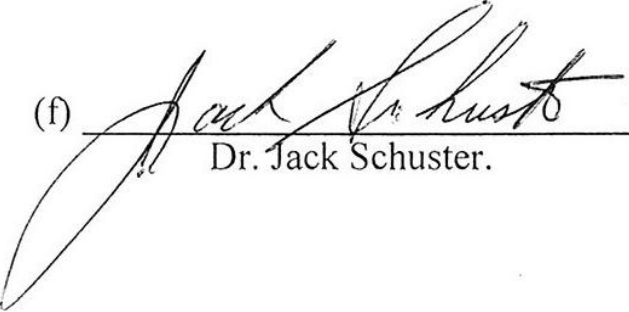


Caracterización molecular y análisis biogeográfico de tres especies de escarabajos del género *Ogyges* (*Coleoptera: Passalidae*) en las islas de bosque nuboso de las montañas al sur de Guatemala.

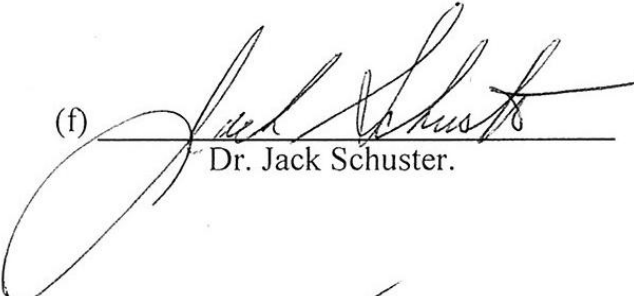
Trabajo de investigación presentado
por Cristian Fernando Beza Beza
para optar al grado de licenciado en Biología

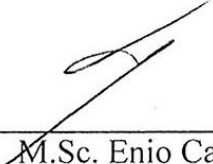
Guatemala
2009


Vo. Bo.:

(f) 
Dr. Jack Schuster.

Tribunal Examinador:

(f) 
Dr. Jack Schuster.

(f) 
M.Sc. Enio Cano.

(f) 
Lic. Margarita Palmieri.

Fecha de aprobación: Guatemala, 21 de julio del 2009

Prefacio

En el año 2005 para el curso de Biogeografía decidí evaluar la distribución y relación de tres especies de Passalidae como proyecto de curso. En 2006 el Dr. Jack Schuster, Lic. Enio Cano y la Lda. Margarita Palmieri me invitan a participar en el proyecto “Evaluación de áreas de endemismo por análisis de variedad genética y relaciones filogenéticas de Passalidae, utilizando marcadores moleculares”. Desde el 2005 quedé con la inquietud y con muchas dudas después de hacer mi evaluación, así que acepté la invitación para trabajar con marcadores moleculares en escarabajos pasálidos y desarrollar mi tema de investigación de grado en el proceso.

Desde el 2006 he trabajado desarrollando protocolos de extracción y amplificación para ADN de pasálidos, los que he usado para el análisis de este estudio. En el 2008-2009 trabajé digitalizando las distribuciones de *Ogyges laevissimus*, *O. politus* y *O. hondurensis*. El trabajo de tres años se reúne en este informe para optar a mi grado de Licenciatura. Durante este tiempo he experimentado y aprendido mucho.

Quisiera mencionar que no todo lo propuesto desde el inicio se pudo cumplir en el trabajo por diversas razones. Los tiempos de desarrollo de protocolos de extracción y amplificación son bastante largos y se complican en el camino. No logré amplificar todos los genes que deseaba y no pude evaluar las relaciones de la especie *O. politus* con las demás especies del estudio, debido a que la secuencia obtenida no fue apta para el análisis final. Sin embargo, este es un estudio que nos brinda información útil en la comprensión de la biogeografía y relación de los escarabajos pasálidos del género *Ogyges*.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología, gracias por financiar el proyecto donde fue posible realizar mi tesis de grado. Dr. Jack Schuster y Margarita Palmieri, gracias por aceptar ser mis asesores y guías en esta aventura. Lic. Enio Cano, gracias por tomarme en cuenta en la participación del proyecto que hizo posible la realización de mi estudio y por la asesoría extra oficial brindada en la identificación de especímenes e interpretación de resultados. Gracias al

Lic. Andrés Ávalos por su ayuda en la elaboración de protocolos de laboratorio para el análisis de ADN. Gracias a Daniel Ariano por su ayuda en la elaboración de los mapas digitales de distribución. Gracias a Luis Ríos por su asesoría extra oficial. Gracias a Luis Diego Archila Díaz y Marco Antonio García, por haber sido compañeros de trabajo que aportaron ideas y conocimiento a mi trabajo. Finalmente, gracias a mis padres que han sido pacientes en esperar el tiempo necesario para la elaboración de un trabajo final de calidad. Por último, gracias por lo anterior, pero sobre todo por ser buenos amigos y un apoyo incondicional en mi formación como un profesional. Este trabajo se lo dedico a los anteriormente mencionados, a mi familia paciente y amorosa, al Club Social y Deportivo Municipal y al Trinchera Escarlata.

Índice

Listado de figuras y cuadros	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
I. Introducción	1
II. Métodos	6
A. Obtención de especímenes	6
1. Especímenes de colección	6
2. Colecta	6
3. Métodos de colecta	6
4. Identificación	7
B. Trabajo de laboratorio	7
1. Extracción de ADN	7
2. Amplificación de ADN	7
3. Análisis de secuencias	9
C. Mapas de distribución	9
III. Resultados	10
A. Extracción de ADN	10
B. Rendimiento del método de extracción 6	11
C. PCR	12
1. Gen CO1	12
2. Gen ITS2	13
3. Gen 12S	14
D. Análisis filogenético	15
1. Máxima Parsimonia	15

Neighbor – joining	16
2. Reloj Molecular	16
E. Biogeografía	19
1. Distribución Potencial	19
2. Distribuciones utilizando la capa digital de uso de la tierra	20
3. Distribución de <i>Ogyges laevissimus</i>	21
4. Distribución de <i>Ogyges Hondurensis</i>	23
5. Distribución de <i>Ogyges politus</i>	24
IV. Discusión	25
V. Conclusiones	33
VI. Recomendaciones	35
VII. Literatura citada	36
VIII. Apéndice	40
1. Métodos de extracción de ADN evaluados	40
2. Listado de especímenes de <i>Ogyges</i> y localidades utilizados en el análisis filogenético	41
3. Datos de absorbancia en la extracción de ADN de Passalidae (2006)	43
4. Datos de absorbancia en la extracción de ADN De Passalidae, muestras anteriores al 2006	44
5. Análisis estadístico para predicción de amplificación, pureza y fecha de colecta, análisis “stepwise”	45
6. Modelo de regresión	46
7. Mapa de paleoclima hace 24,00 a 12,000 años	47
8. Mapa de paleoclima hace 10,500 años.....	48
9. Mapa de distribución altitudinal potencial de <i>Ogyges</i> linaje sur.	49

Listado de cuadros y figuras

Cuadros.

Cuadro 1. Ejemplo de hoja para toma de datos en colecta.	6
Cuadro 2. Secuencias de los cebadores a utilizar para la amplificación de 6 genes en Passalidae	8
Cuadro 3. Recetas iniciales para PCR en la amplificación de cebadores, con un volumen final de 25 ul.	8

Figuras.

Figura 1. Distribución de <i>O. laevissimus</i> , <i>O. politus</i> , <i>O. hondurensis</i> .	3
Figura 2. Comparación del porcentaje de muestras de Passalidae, con ADN presente (barra azul) y porcentaje de muestras útiles para amplificación de ADN (barra roja), utilizando 6 métodos de extracción.	10
Figura 3. Bandas de amplificación PCR, gen CO1 en 4 especies de Passalidae	12
Figura 4. Bandas de amplificación PCR, gen ITS2 en 4 especies de Passalidae	13
Figura 5. Bandas de amplificación PCR, gen 12S en 4 especies de Passalidae	14
Figura 6. Árbol filogenético de varias muestras de Passalidae utilizando el método de máxima parsimonia, con el gen 12S.	15
Figura 7. Árbol filogenético de varias muestras de Passalidae utilizando el método de Neighbor-joining, con el gen 12S.	17
Figura 8. Árbol de separación de ancestros de varias especies de Passalidae basado en la separación de las poblaciones de <i>Ogyges hondurensis</i> al final de la última glaciación (hace 12,000 años).	18
Figura 9. Mapa de distribución potencial de <i>O. laevissimus</i> , <i>O. hondurensis</i> y <i>O. politus</i> en Guatemala, El Salvador y Honduras.	19

Figura 10. Mapa de distribución de <i>O. laevissimus</i> , <i>O. hondurensis</i> y <i>O. politus</i> , tomando en cuenta la distribución de los bosques mixtos y latifoliados de la zona.	20
Figura 11. Distribución potencial de <i>O. laevissimus</i> .	22
Figura 12. Distribución potencial de <i>Ogyges hondurensis</i> .	23
Figura 13. Distribución potencial de <i>Ogyges politus</i> .	24

Resumen

Morfológicamente, *O. laevissimus*, *O. hondurensis* y *O. politus* (Passalidae) son muy parecidas. Analicé la diversidad genética de dos de estas especies, *Ogyges laevissimus* y *O. hondurensis*. El estudio lo basé en la secuenciación del gen constitutivo 12S, luego comparé los resultados de éste con estudios morfológicos y biogeográficos ya realizados. Realicé dos árboles filogenéticos con diecisiete especies de pasálidos, 15 fueron utilizadas como grupo externo y dos como grupo interno. Encontré que *Ogyges* es un género monofilético con alta variación para el gen 12S. *Ogyges laevissimus* y *O. hondurensis* salieron muy relacionados comparado con las otras especies de pasálidos. Asimismo, hice mapas de distribución potencial, tomando en cuenta la altura, precipitación y temperatura con Sistemas de Información Geográfica (SIG), para cada especie de *Ogyges* del grupo sur (*O. laevissimus*, *O. hondurensis* y *O. politus*). Identifiqué 3 bloques de distribución alopátricos, el de *O. laevissimus* con ocho poblaciones, el de *O. hondurensis* con quince poblaciones y el de *O. politus* con una población. Sugiero que los individuos pertenecientes a cada población están genéticamente más relacionadas entre sí que con otras poblaciones, formando poblaciones relativamente independientes. Este estudio puede ser aplicado en la priorización de áreas de conservación, pues sugiere las islas de bosque nubosos como reservorios genéticos únicos en el caso de *Ogyges*, implicando la presencia en estos escarabajos de genes y sustancias químicas exclusivas, potencialmente útiles.

Abstract

O. laevissimus, *O. hondurensis* and *O. politus* (Passalidae) have similar morphologies. I analyzed the genetic diversity of two species (*Ogyges laevissimus* and *O. hondurensis*) using molecular markers I based on the sequence of the constitutive gene 12S and the comparison of this analysis with previous morphological and biogeographical studies. I made two phylogenetic trees with seventeen species, finding that *Ogyges* is a highly variable monophyletic genus for the 12S gene. There is a close relationship between *O. laevissimus* and *O. hondurensis*. I generated potential distribution maps based on altitude, precipitation and temperature of the three *Ogyges* species using Geographic Information Systems (GIS). I identified three allopatric blocks of distribution: *O. laevissimus* with eight populations, *O. hondurensis* with fifteen populations and *O. politus* with one population. I suggest that the individuals within each population are more closely related to each other than to those of other allopatric populations. This study can be applied in the prioritization of conservation areas, it suggests the cloud forest islands as unique genetic reservoirs in the case of *Ogyges*, suggesting the presence of unique genes and chemicals in these beetles, with potential, for example, substances for pharmaceutical use.

I. INTRODUCCIÓN

Palabras clave: Passalidae, *Ogyges*, islas de montaña, franja de volcanes Guatemala, endemismo, filogenia, reacción en cadena de la polimerasa, vicarianza, autoapomorfía.

El endemismo se refiere a la distribución exclusiva de un taxón en un área geográfica; éste es producto de la separación de especies por medio de barreras biogeográficas infranqueables para los organismos. Como resultado de esta separación ocurre especiación y las especies quedan restringidas a una región geográfica. Esta región queda caracterizada por su biota única y las características fisicoquímicas que la definen. Guatemala ha sufrido una serie de movimientos tectónicos y actividad volcánica que definen su territorio actual (Iturralde –Vincent 2006). Iturralde – Vincent (2006) indica que la biota actual de Guatemala parece haberse originado a partir de inmigrantes norteamericanos y sudamericanos, pero principalmente especies que evolucionaron en el territorio guatemalteco, probablemente desde el terciario.

El clima actual de Guatemala está determinado por un conjunto de factores, entre ellos los más importantes son las variaciones altitudinales y la zona de convergencia intertropical; de la misma manera, también está influida la vegetación (Gerald & Leyden 2006). Gerald & Leyden (2006) indican que los cambios climáticos del Pleistoceno y del Holoceno han impactado sobre los tipos de vegetación de Guatemala; estiman que la temperatura tuvo un descenso máximo entre 6.5⁰C y 8⁰C durante el punto máximo de la última glaciación. Evidencias de glaciares en Guatemala fueron encontradas por Anderson (1968) y Hastenrath (1974) en la altiplanicie de la Sierra de los Cuchumatanes arriba de los 3500 m SNM. Estas evidencias no fueron encontradas en los volcanes que alcanzan altitudes arriba de los 3500 m, probablemente por efecto del vulcanismo (Hastenrath 1974).

Los lugares que ocupaban los glaciares en la época del Pleistoceno están ocupados ahora por vegetación de alta montaña. Con el descenso de la temperatura y el desplazamiento espacial que provocaron estas glaciaciones, los bosques nubosos tuvieron

que migrar a las tierras bajas ocupadas hoy por bosques húmedos, secos o montes espinosos. Los bosques nubosos que estaban aislados se conectaron entre sí debido a este descenso, lo que permitió el intercambio de biota entre los bosques previamente aislados, entre ellos probablemente el antecesor de las tres especies del género *Ogyges* a las que refiere este estudio. El avance y retroceso de los glaciares pudo causar especiación en este antepasado y dar origen a las tres especies de *Ogyges* que hoy conocemos en la parte sur de Guatemala (Schuster 2006). Esta especiación, indica Schuster (2006), parece ser más reciente que la especiación de *Ogyges* dada en la parte norte del país.

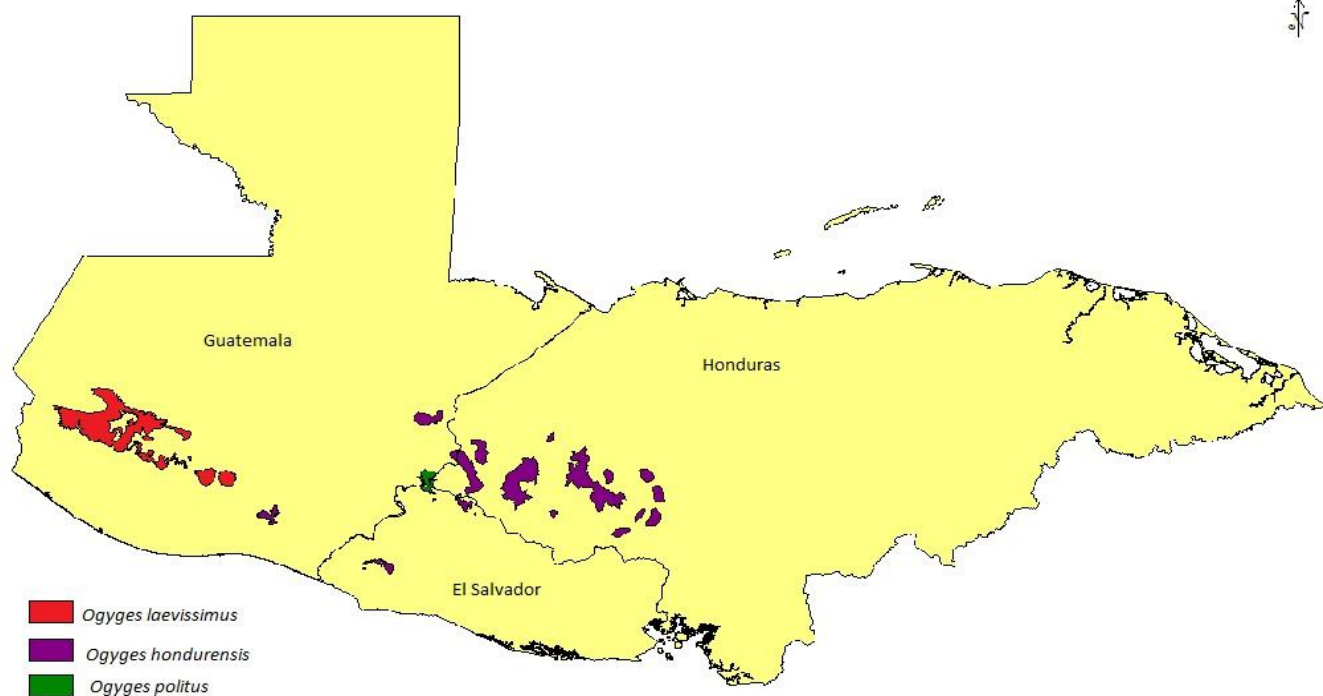
El endemismo en los escarabajos de la familia Passalidae es común (Schuster 1992). La fauna de los pasálidos ha sido muy estudiada en Guatemala (e.g., Schuster 2006); cuenta con aproximadamente 84 especies. MacVean y Schuster (1981) estudiaron la fauna de Passalidae en las montañas del sur de Guatemala. Encontraron que *Ogyges laevissimus* tiene una peculiar distribución que lo restringe a las islas de bosque nuboso que se forman en estas montañas; a estos escarabajos no se les ha encontrado a una altura menor de 1750 m SNM.

En las montañas sur y este de Guatemala se encuentran presentes tres especies de *Ogyges*: *O. laevissimus* (Kaup), *O. politus* (Hincks), *O. hondurensis* Schuster & Reyes-Castillo. La distribución de estas tres especies se puede apreciar en la figura 1 (Schuster & Reyes-Castillo 1990; Schuster *et al.* 2005). *O. laevissimus* se distribuye en los parches de bosques nubosos de los volcanes y montañas del sur-occidente de Guatemala. *O. politus* es de exclusiva distribución en El Trifinio. *O. hondurensis* se encuentra en la parte suroeste de Honduras, poblaciones aisladas en el Volcán San Salvador; el Cerro Miramundo, Santa Rosa y en la Unión, Zacapa, en Guatemala (Schuster y Reyes-Castillo 1990; Schuster *et al.* 2005).

Un estudio molecular de *O. laevissimus*, *O. politus* y *O. hondurensis* puede brindar información de cómo fue la separación del gran parche de bosque nuboso que existió durante el Pleistoceno en la parte sur de Guatemala. Además, Villatoro (1997) considera que un estudio de la variabilidad genética entre las poblaciones de *O.*

laevisissimus puede brindar información para hacer inferencia sobre las prioridades de conservación a lo largo de su distribución. Los estudios moleculares incluyen variaciones tanto interespecíficas como intraespecíficas; además, los estudios que incorporan tanto información molecular como morfológica proveen mejores interpretaciones que los enfocados en sólo una fuente de información (Moritz & Hillis 1996). Según Hoy (1994), el análisis de ADN es una herramienta importante, evita el sesgo de variaciones inducidas por el medio.

Fig. 1. Distribución de *O. laevisissimus*, *O. politus*, *O. hondurensis*.



Villatoro (1997) considera que Passalidae es un buen candidato para un enfoque molecular, pues su morfología, taxonomía y biogeografía es bien conocida. Esto permite patrones de referencia que facilitan la interpretación de los resultados a nivel molecular. Villatoro (1997) indica una alta diversidad inter e intraespecífica en el género *Proculus* al ser analizado con la técnica de SSCP para el gen ND5, identificando en total 10 haplotipos en 5 especies. ND5 podría utilizarse para examinar la subdivisión geográfica dentro de una especie en Passalidae (Villatoro 1997), caso específico para *O. laevisissimus*; sin embargo, la cantidad de variabilidad de los patrones dentro de una especie fue alta, lo

que indica que no es recomendable para el análisis interespecífico. Hiss *et al.* (1994), citado por Villatoro (1997), recomienda la utilización de regiones más conservadas como la región que codifica para la citocromo oxidasa I (CO1).

Hillis *et al.* (1996) recomiendan utilizar varios marcadores en genes no ligados versus el análisis profundo de un solo gen. Para el presente estudio se escogieron seis regiones de ADN no ligadas, entre ellas, (1) CO1, (2) ND5, (3) ITS1, (4) ITS2, (5) 12S, (6) 16S. Los marcadores (3) y (4) pertenecen al ADN nuclear; los marcadores (1), (2), (5) y (6) se encuentran en el ADN mitocondrial (Hwang 1999).

Existen dos divisiones principales dentro del ADN nuclear, las regiones codificadoras o genes constitutivos y los espaciadores (regiones que se encuentran separando las regiones codificadoras, colocadas entre una región codificadora y otra); las regiones codificadoras son más conservadas que las espaciadoras (Hwang & Kim 1999). Hwang & Kim (1999) indican que los espaciadores presentan mayor variabilidad que las regiones codificadoras, puesto que los cambios de nucleótidos en éstos no causan daños letales a los organismos. ITS1 e ITS2 son dos espaciadores que se encuentran a los extremos de la región codificadora 5.8S (Hwang & Kim 1999); debido su variabilidad, estos dos marcadores han sido utilizados para estudios filogenéticos de categorías taxonómicas inferiores (géneros, especies o poblaciones) (eg., Blair 1995, 1998, Blair *et al.* 1997).

El ADN mitocondrial es una molécula circular, generalmente con una longitud de 14,000 a 17,000 pares de bases y con una organización de genes bastante conservada (Hwang & Kim 1999). Se conoce que el ADN mitocondrial evoluciona más rápido que el ADN nuclear (Navajas *et al.* 1996). A pesar de la rápida evolución del ADN mitocondrial, existen dos regiones tan conservadas como las regiones codificadoras del ADN nuclear, las dos regiones que codifican para ARN ribosomal 12S y 16S (Hwang & Kim 1999). Según Ballard *et al.* (1992) 12S ha sido utilizado en estudios para niveles taxonómicos superiores tales como filo y subfilo. El gen 16S posee mayor variabilidad que 12S; por esta razón es utilizado para el estudio de categorías taxonómicas tales como

familia y muy raras veces género (Black & Piesman 1994; Kambhupati *et al.* 1996). Por aparte las regiones CO1 y ND5 son variables y han sido utilizadas para estudios de categorías taxonómicas inferiores tales como especie, subespecie y poblaciones (Hwang & Kim 1999). Esta amplia gama de marcadores moleculares permitirá tener una idea de la diversidad genética entre las especies objetivo del estudio y darle mayor validez a sus resultados.

Con este estudio se pretende: (1) el establecimiento de un protocolo de extracción de ADN para pasálidos, (2) el establecimiento de protocolos para la amplificación en PCR de cinco cebadores (CO1, 12S, 16S, ITS1 e ITS2), (3) la determinación de la filogenia de *O. laevissimus*, *O. politus* y *O. hondurensis*, utilizando la secuencia del gen constitutivo 12S, (4) la relación de la filogenia con la distribución geográfica de estas especies, (5) una hipótesis sobre el origen de las distribuciones geográficas de estas especies basada en las relaciones genéticas y morfológicas de las tres especies y (6) aplicar los resultados biogeográficos y de filogenia a propuestas para la conservación de germoplasma de estas especies con generalizaciones para la conservación de otras especies con los mismos requerimientos ecológicos.

Propongo las hipótesis siguientes: (1) *O. politus* y *O. hondurensis* están más relacionados entre sí que con *O. laevissimus*. (2) El cañón de Palín pudo ser la primera barrera biogeográfica en aparecer entre los bosques nubosos del Pleistoceno en la parte sur de Guatemala, separando en dos la población del ancestro común de *O. laevissimus*, *O. politus* y *O. hondurensis*, favoreciendo la especiación por vicarianza. (3) Las áreas de endemismo propuestas por Schuster, Cano y Cardona (2000) 7c (Cerro Miramundo – Volcán Tecuamburro y montañas del suroriente de Guatemala) y 6 (Trifinio) están más relacionadas entre sí que con el área 4 (volcanes suroccidentales de Guatemala).

II. MÉTODOS

A. Obtención de especímenes

1. Especímenes de colección. Trabajé con los especímenes de la Colección de Artrópodos de la Universidad del Valle de Guatemala y la colección personal del Dr. Jack Schuster. También, utilicé organismos de colectas durante la ejecución de la investigación y colectas realizadas por colaboradores externos al estudio. Los escarabajos recientemente colectados se guardaron en etanol 95% a una temperatura de 4⁰C para tener una buena conservación del material genético; algunos organismos de la colección entomológica de la Universidad del Valle de Guatemala están almacenados en propanol al 80% a temperatura ambiente. Utilicé los datos de colecta para la elaboración de mapas de contorno con las alturas donde se encontraron los especímenes.

2. Colecta. Los lugares de trabajo están definidos por la distribución de las tres especies de escarabajos a trabajar (ver Figura 1). Los lugares de colecta fueron: (1) Volcán de Agua (2) Volcán Acatenango, (3) Volcán Atitlán, (4) Cerro Carmona, (5) Cerro Zunil, (6) Reserva de Biósfera el Trifinio, (7) Cerro Miramundo, (8) Volcán Tecuamburro y (9) La Unión Zacapa. Realicé colectas exclusivamente en los parches de bosque nuboso que se encuentran en estos lugares.

3. Métodos de colecta. Se buscaron troncos de árboles caídos en estado de putrefacción. Con un hacha o machete se cortó el tronco hasta encontrar especímenes de pasálidos. Los pasálidos encontrados fueron puestos inmediatamente en un frasco con alcohol al 95% para transportarlos al laboratorio. La familia Passalidae no es estacional por lo que se encuentran adultos y larvas durante todo el año. Se tomaron datos como se muestra en el Cuadro 1

Cuadro 1. Ejemplo de hoja para toma de datos en Colecta.

Localidad	Altura mSNM	LAT-LONG	Fecha de recolección
Volcán Atitlán	2000	14.58407°N - 91.18664°W	08-VII-2009
Volcán Zunil	1800	14.73745°N - 91.44942°W	09-VII-2009
Volcán Chicabal	1760	14.79000°N - 91.655°W	11-VII-2009

4. Identificación. Los especímenes se llevaron al laboratorio y fueron identificados con la guía para géneros de passalidae de Schuster y Cano (2005). La identificación se hizo hasta género, luego las especies se confirmaron con la asesoría de Schuster (jschuste@uvg.edu.gt) y Cano (ecano@uvg.edu.gt), del Laboratorio de Entomología sistemática de la Universidad del Valle de Guatemala.

B. Trabajo de laboratorio

1. Extracción de ADN. Evalué seis métodos de extracción (Apéndice 1). Para evaluar los métodos de extracción utilicé tres especímenes colectados en el 2006. Obtuve las absorbancias de ADN a 260 nm, 280 nm y 320 nm, para evaluar la concentración y pureza del ADN obtenido. De las extracciones exitosas se amplificaron y se escogió el método con mayor porcentaje de amplificación. El método 1 es especial para especímenes de museo en alfiler y están en seco. Utiliza un buffer de lavado con DTAB al 8%, 1.5 M NaCl, 100 mM tris-HCl (pH 8.8), 50 mM EDTA y dos extracciones a base de cloroformo. Con el método 2, las patas fueron homogenizadas manualmente en nitrógeno líquido, se aplicó un buffer de lavado con tris-HCl 50 mM pH 8.25; EDTA 50 mM; NaCl 50 mM; SDS 1% y se hizo dos extracciones de fenol cloroformo. Con el método 3, las patas fueron homogenizadas manualmente en 100 µl de tampón de lisis con NaCl 0.1 M; sacarosa 0.2 M; EDTA 50 mM; tris-HCl 100 mM pH 8.25; SDS 0.05% y realicé dos extracciones con fenol cloroformo. El método 4 consistió en homogenizar las patas con un buffer estéril de Tris 10 mM, MgCl₂ 2.5 mM, 50 mM KCl. El método 5 consistió en homogenizar las patas con un buffer de proteinasa K 1 mg/ul, Tris HCl 1M pH 8, EDTA 0.5 M pH 8 y Nonidet P-40. El método 6 consistió en homogenizar las patas con nitrógeno líquido y lavar el residuo en dos buffers: un buffer TENT (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 25 mM EDTA, 10 mM NaCl y 0.5% Triton X-100) y un buffer TEN (Buffer TENT sin Tritón X) e hice dos extracciones con fenol cloroformo.

2. Amplificación de ADN. Para la reacción en cadena de la polimerasa analicé el ADN con 6 pares de cebadores, CO1, ND5, ITS 1, ITS 2, 12S y 16S (Cuadro 2). Se trabajó con los protocolos iniciales descritos en el cuadro 3 y en ellos se variaron las concentraciones de buffer 5x, MgCl, cebadores, Taq y concentración de ADN hasta dar paso a los protocolos presentados en los resultados. Se realizaron geles de agarosa al 1%,

para verificar la amplificación de los genes. Se utilizó un análisis multivariado “stepwise” para elaborar un modelo de regresión lineal múltiple en el software JMP y tratar de predecir la amplificación de un gen con la condición del espécimen. La variable dependiente del modelo fue la amplificación y las variables independientes fueron la concentración en ng/ul, la pureza y la fecha de recolección.

Cuadro 2. Secuencias de los cebadores a utilizar para la amplificación de 6 genes en Passalidae.

Cebador	Secuencia	Referencia
CO1		
mtD-10	5' TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT	(Gurney <i>et al.</i> 2000)
mtD-12	5' TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	(Gurney <i>et al.</i> 2000)
ITS-1		
BD 1	5' GTCGTAACAAGGTTTCCGTA	(Schullnburg <i>et al.</i> 2001)
4S	5' TCTAGATGCGTTTCGAAATGTCGATG	(Schullnburg <i>et al.</i> 2001)
ITS-2		
ITS3	5' GCATCGATGAAGAACGCAGC	(White <i>et al.</i> 1990)
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White <i>et al.</i> 1990)
ND5		
ND5P1	5' TWGCSCTAATCCKGCTATA	(Molina-Cruz <i>et al.</i> 2004)
ND5M2	5' YTWGGATGAGATGGSTTAGG	(Molina-Cruz <i>et al.</i> 2004)
12S		
12Sf	5' TACTATGTTACGACTTAT	(Kelley <i>et al.</i> 2006)
12Sr	5' AAAC TAGGATTAGATACCC	(Kelley <i>et al.</i> 2006)
16S		
16Sf	5' TTACGCTGTTATCCCTAA	(Kelley <i>et al.</i> 2006)
16Sr	5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT	(Kelley <i>et al.</i> 2006)

Cuadro 3. Recetas iniciales para PCR en la amplificación de cebadores, con un volumen final de 25 ul.

CO1. La receta fue la siguiente, 12.35 ul de H ₂ O, 2.5 ul Buffer 10x, 2.00 ul de MgCl 25 mM, 0.75 ul de Mtd10 10 uM y Mtd12 10 uM, 1.5 ul de DNTP's 2.5 mM, 0.15 ul de Taq, 4.5 ul de ADN.
ITS1 e ITS2. La receta fue la siguiente, 11.25 ul de H ₂ O, 5 ul Buffer 5x, 2.00 ul de MgCl 25 mM, 0.5 ul de primers 10 uM, 2.5 ul de DNTP's 2.5 mM, 0.25 ul de Taq, 3 ul de ADN.
16S y 12S. La receta fue la siguiente, 16.80 ul de H ₂ O, 2.5 ul Buffer 10x, 1.5 ul de MgCl 25 mM, 0.5 ul de primers 10 uM, 1.00 ul de DNTP's 2.5 mM, 0.20 ul de Taq, 2.5 ul de ADN.

3. Análisis de secuencias. Las secuencias obtenidas fueron editadas con la ayuda del paquete DNA Star. Realicé un análisis con el software Mega 4, utilizando *O. hondurensis* y *O. laevissimus* como grupo interno y *Ogyges tzutuhili*, *Ogyges cackchiqueli*, *Ogyges championi*, *Ogyges* sp.n., *Xylopassaloides chortii*, *Vindex sculptilis*, *Vindex* c.f. *sculptilis*, *Vindex* sp.n., *Vindex* c.f. *sculptilis*2, *Petrejoides guatemalae*, *Oileus sargi*, *Chondrocephalus granulum*, *Passalus caelatus*, *Proculus mniszzechi*, y *Proculejus nudicosta* como grupo externo. Se realizó un árbol con el método de Máxima Parsimonia, uno con el método de Neighbor-Joining, un tercer árbol basándose en la calibración del reloj molecular con la separación de las poblaciones de *O. hondurensis* El Portillo y *O. hondurensis* La Esperanza hace 12,000 años, que es el tiempo en que terminó la última glaciación aproximadamente y como consecuencia aisló las poblaciones.

C. Mapas de distribución.

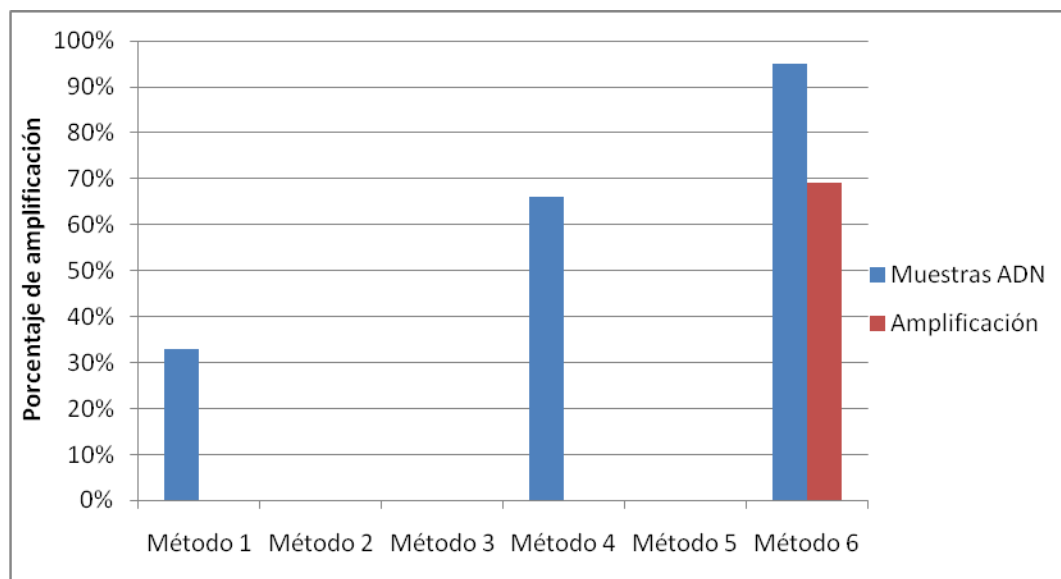
Con ayuda de software especializado (ArcGis y DivaGis) realicé la distribución potencial de *O. laevissimus*, *O. hondurensis* y *O. politus*. Utilicé once mapas digitales: (1) Mapas administrativos de Guatemala, (2) El Salvador y (3) Honduras; (4) Isotermas de Guatemala, (5) El Salvador y (6) Honduras; (7) Isoyetas de Guatemala y (8) Honduras; (9) El mapa de Zonas de Vida de Holdrige para Centro América; (10) Mapa de regiones ecológicas de Guatemala, (11) Mapa de Uso de la Tierra para el 2003 de Guatemala. Los mapas los cree utilizando un análisis multicriterio de tipo booleano.

III. RESULTADOS

A. Extracción de ADN

Con el método uno, después de dos extracciones, logré obtener ADN en una muestra, a partir de tres pasálidos distintos. Con el método 2 no logré obtener ADN de ninguna de las muestras; el mismo fenómeno se observó con el método 3 y método 5. Con el método 4 obtuve ADN de 2 de las tres muestras en las que apliqué el procedimiento. Con el método 6 obtuve ADN de la totalidad de las muestras. Para confirmar la presencia de ADN en las extracciones utilicé espectrofotometría de absorción. De las muestras con ADN, obtuve amplificación de PCR para los 6 cebadores únicamente con el ADN extraído por el método de extracción 6, cuya concentración de ADN excedía los 100 ng/ul; con los otros métodos en los que logré extraer ADN no obtuve amplificación para ningún cebador. De las muestras que eran anteriores al año 2006 se obtuvo ADN con el método 6, pero solamente amplificó para el gen 12S con modificaciones en el procedimiento de extracción y PCR (Figura 2).

Figura 2. Comparación del porcentaje de muestras de Passalidae, con ADN presente (barra azul) y porcentaje de muestras útiles para amplificación de ADN (barra roja), utilizando 6 métodos de extracción.



B. Rendimiento del método de extracción 6

Con el método 6 se extrajeron un total de 82 muestras. De las cuales 42 muestras eran de distintos géneros de Passalidae (*Chondrocephalus*, *Oileus*, *Passalus*, *Petrejoides*, *Proculejus*, *Proculus*, *Vindex*, *Xylopassaloides*) y 40 muestras exclusivas de *Ogyges*. De las muestras de *Ogyges* 32 muestras fueron colectadas antes del 2006 y evaluadas en concentración y pureza y ocho son provenientes de colectas del 2009 y fueron utilizadas solamente para la amplificación y análisis de secuencias.

Con un total de 42 muestras (año 2006) extraídas, obtuve una concentración promedio de 124.39 ng/ul y una pureza promedio de 1.81 (Apéndice 3). Catalogué tres grupos de concentraciones basados en los resultados de absorbancia y amplificación de PCR. El primer grupo son las muestras de las cuales obtuve concentración 0 ng/ul (9.52%). El segundo grupo son las muestras con concentraciones menores a 75 ng/ul y mayores a 0 ng/ul (21.43%). El tercer grupo son las muestras con concentración mayor a 75 ng/ul (69.41%). De los tres grupos sólo el tercero resultó utilizable en la reacción de PCR.

Para los especímenes anteriores al 2006 extraje un total de 32 muestras; obtuve una concentración promedio de 557.81 ng/ul y una pureza promedio de 1.64 (Apéndice 4). Existe un rango amplio de variación entre las concentraciones de las muestras con una desviación estándar de 434.76 ng/ul. En este grupo el 100% de muestras tuvieron una concentración mayor a 75 ng/ul.

En el análisis “stepwise”, individualmente cada variable se comporta de la siguiente manera: la pureza explica 0.0009%, siendo no significativa; la concentración explica 13% del modelo, aproximadamente, siendo significativa, y la fecha de colección explica un 53.02%, siendo significativa (Apéndice 5, análisis “stepwise”). Se realizó un modelo lineal multivariado con las dos variables significativas el cual resultó significativo y explica 53.06%.

C. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

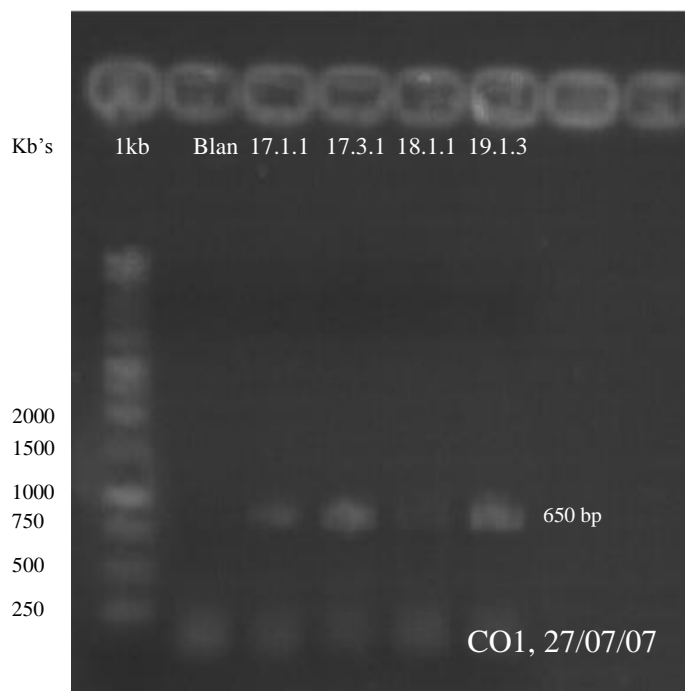
1. Gen CO1. Logré obtener una amplificación exitosa en todas las muestras del 2006. Utilicé el programa 1 y la receta 1. En la Figura 3 se pueden observar cómo se aprecian las bandas para el gen CO1, con muestras de pasálidos. Para las muestras anteriores del 2006 no se logró amplificación con el protocolo original ni con variaciones recomendadas por A. Ávalos (com. Pers.) (aavalos@uvg.edu.gt).

H2O	11.25 ul
Buffer 5x	5.00 ul
MgCl 25 mM	3.00 ul
Mtd10 10 uM	0.75 ul
Mtd12 10 uM	0.75 ul
DNTP's 2.5 mM	1.00 ul
Taq	0.25 ul
ADN	300 ng

Receta 1.
Programa 1.

- 1: 94C 4 minutos
- 2: 94C 30 segundos
- 3: 52C 30 segundos
- 4: 72C 40 segundos
- Ir a paso 2 por 38 ciclos
- 5: 72C 5 minutos
- 6: 4C mantener.

Figura 3. Bandas de amplificación PCR, gen CO1 en 4 especies de Passalidae



2. Gen ITS2. Logré obtener una amplificación exitosa en todas las muestras del 2006. Utilicé el programa 2 y la receta 2. La Figura 4 muestra las bandas para el gen ITS2, con muestras de pasálidos. Para las muestras anteriores al 2006 sólo se logró obtener en una muestra de las 32 extraídas utilizando el protocolo original, las otras 31 muestras no amplificaron con el protocolo original ni con las modificaciones propuestas por A. Ávalos (com. Pers.) (aavalos@uvg.edu.gt).

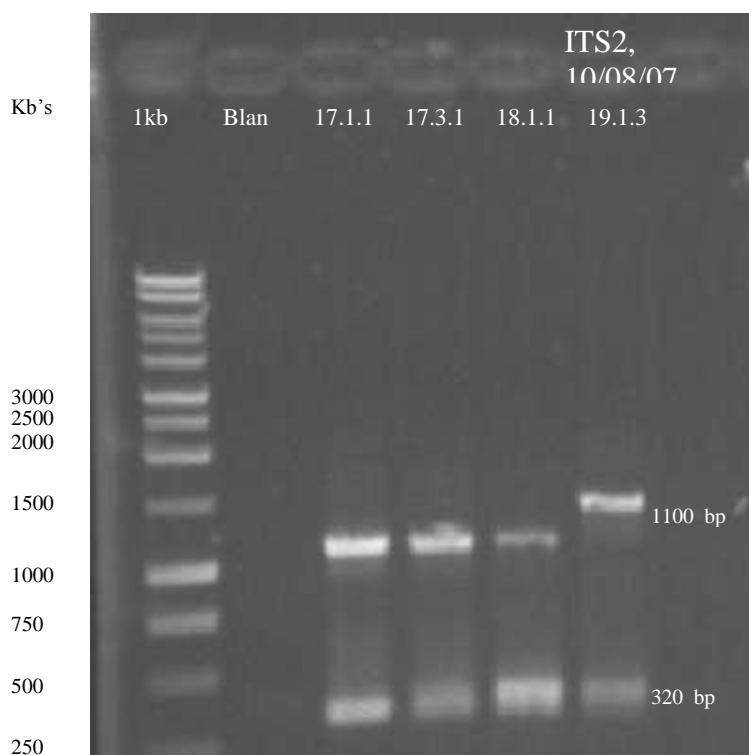
Receta 2.

H ₂ O	12.25 ul
Buffer 5x	5.00 ul
MgCl 25 mM	2.00 ul
ITS3 10 uM	0.50 ul
ITS4 10 uM	0.50 ul
DNTP's 2.5 mM	2.50 ul
Taq	0.25 ul
ADN	200.00 ng

Programa 2.

- 1: 94C 2 minutos
- 2: 94C 1 minuto
- 3: 54C 1 minuto
- 4: 72C 1 minuto
- 5: Ir a paso 2 30 ciclos
- 6: 72C 5 minutos.
- 7: 4C mantener.

Figura 4. Bandas de amplificación PCR, gen ITS2 en 4 especies de Passalidae



3. Gen 12S. Logré obtener una amplificación exitosa de todas las muestras del 2006. Utilicé el programa 3 y receta 3. En la Figura 5 se puede observar cómo se aprecian las bandas para el gen 12S, con muestras de pasálidos. De las muestras anteriores al 2006 se lograron 30 amplificaciones, con modificación en el protocolo original. Cada muestra respondió diferente a las modificaciones, la única que fue general fue el uso del ADN sin diluirlo a 100 ng/ul; utilicé las concentraciones del Apéndice 4. Las otras modificaciones fueron aumentar la cantidad de MgCl, cebadores, Buffer 5x, Taq. Además, algunas muestras tuvieron que reamplificarse para que la amplificación fuera detectada en la electroforesis de Agarosa.

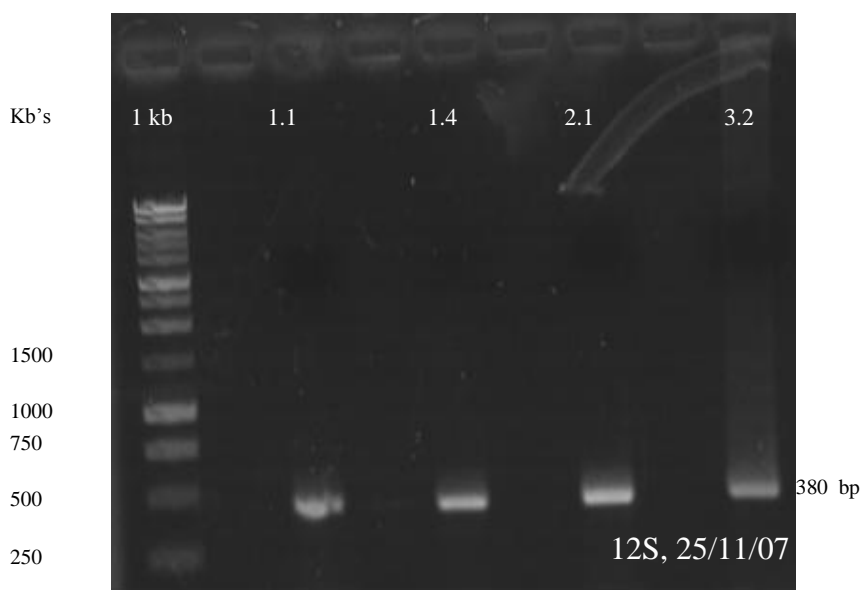
Receta 3.

H ₂ O	16.80 ul
Buffer 5x	2.50 ul
MgCl 25 mM	1.50 ul
SR-J-14199 10 uM	0.50 ul
SR-N-14594 10 uM	0.50 ul
DNTP's 2.5 mM	1.00 ul
Taq	0.20 ul
ADN	200.00 ng

Programa 3.

- 1: 95C 3 minutos
- 2: 95C 30 segundos
- 3: 40C 1 minuto
- 4: 72C 1 minuto
- 5: Ir a paso 2, 10 ciclos
- 6: 95C 30 segundos
- 7: 50C 1 minuto
- 8: 72C 1 minuto
- 9: 72C 7 minutos
- 10: 4C mantener.

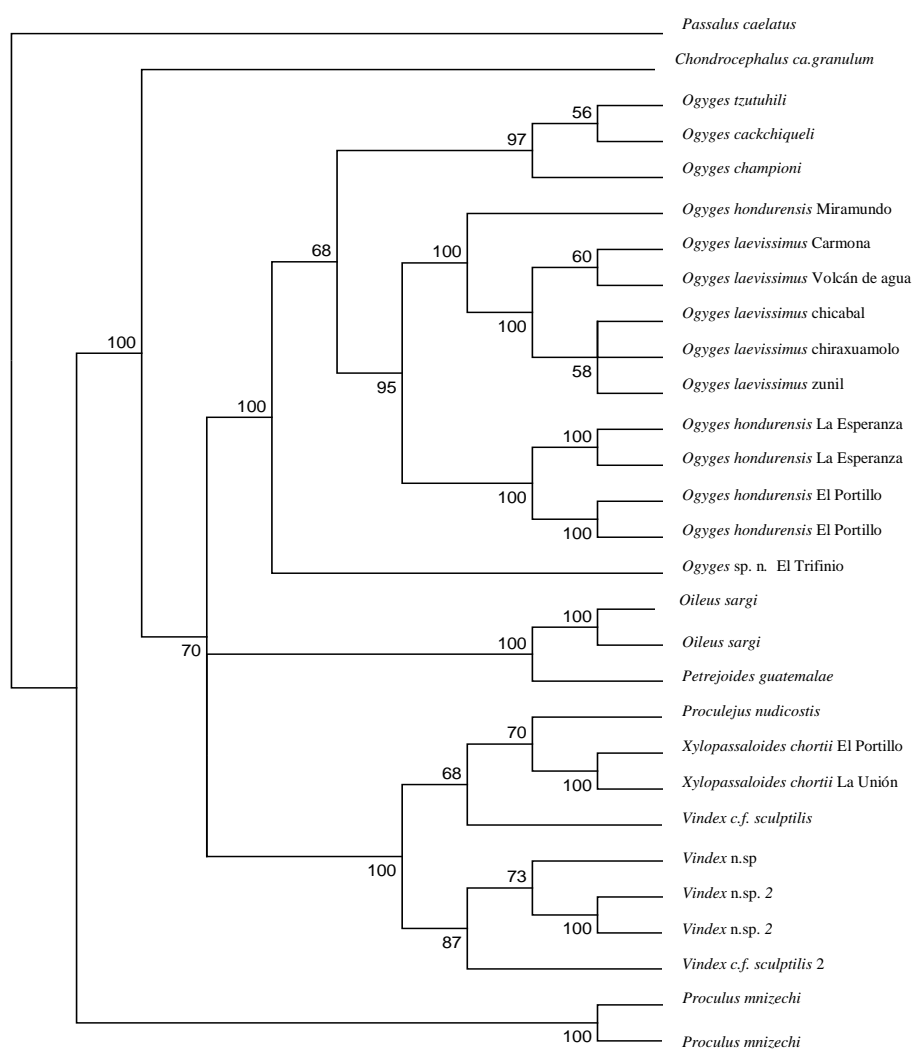
Figura 5. Bandas de amplificación PCR, gen 12S en 4 especies de Passalidae



D. Análisis Filogenético.

1. Máxima Parsimonia. La Figura 6 sugiere que *Ogyges* es un clado monofilético, que comparte una tricotomía con dos grupos hermanos, uno formado por *Proculejus*, *Vindex* y *Xylopassaloides*, y otro formado por *Petrejoides* y *Oileus*. *Ogyges* se divide en dos clados, el primero formado por *Ogyges* n.sp. y el segundo que está subdividido en dos. La primera subdivisión contiene tres especies pertenecientes al norte de la línea divisoria propuesta por Schuster & Cano (2005) (*O. tzutuhili*, *O. championii*, *O. cackchiqueli*). El segundo grupo lo forman dos especies de *Ogyges* del lado sur (*O. hondurensis*, *O. laevissimus*). Según este cladograma, la población de *O. hondurensis* Miramundo, que es la más al sur en Guatemala, está más relacionada a *O. laevissimus* que a otras poblaciones de *O. hondurensis* que se encuentran más al norte.

Figura 6. Árbol filogenético de varias muestras de Passalidae utilizando Método de Máxima Parsimonia, con el gen 12S



2. Neighbor-Joining. La Figura 7 también sugiere que *Ogyges* es un grupo monofilético, con un grupo hermano formado por *Chondrocephalus*. Esta hipótesis sostiene una separación temprana de *Ogyges* sp.n. proveniente del Trifinio, de los demás *Ogyges* evaluados. El resto de *Ogyges* se divide en dos clados principales, el primero formado por tres especies pretenecientes al norte de la línea divisoria propuesta por Schuster & Cano (2005) (*O. tzutuhili*, *O. championi* y *O. cackchiqueli*). Un segundo grupo lo forman dos especies de *Ogyges* del lado sur (*O. hondurensis* y *O. laevissimus*). Al igual que en la figura 6, la figura 7 también apoya la relación entre *O. hondurensis* Miramundo y *O. laevissimus*.

3. Reloj molecular. Utilizando el árbol producido por el método de Neighbor-Joining, se analizó el evento de separación de las poblaciones de *Ogyges hondurensis* El Portillo y *O. hondurensis* La Esperanza. Para la calibración del árbol, se consideró la hipótesis de que esta separación fue hace doce mil años al final de la última glaciación. Las fechas de separación que da este árbol para el género *Ogyges* son: La separación de la población ancestral de *Ogyges* en dos poblaciones hace 72,000 años: la que dio origen a la población que ahora es *Ogyges* sp. n. del Trifinio y una segunda que, a su vez, se dividió en dos grupos, los de *O. tzutuhili*, *O. championi*, *O. cackchiqueli*, cuya separación probablemente ocurrió hace 60,000 años; una tercera población que originó *O. laevissimus*, *O. hondurensis* (y *O. politus*) que se separó aproximadamente hace 60,000 años. Otra fecha importante es la separación del ancestro común entre el clado de *Ogyges*, el de *Chondrocephalus* y el formado por *Vindex*, *Xylopassaloides*, *Petrejoides* y *Proculejus*, ocurriendo hace 101,000 años, aproximadamente.

Figura 7. Árbol filogenético de varias muestras de Passalidae utilizando el método de Neighbor-Joining, con el gen 12S.

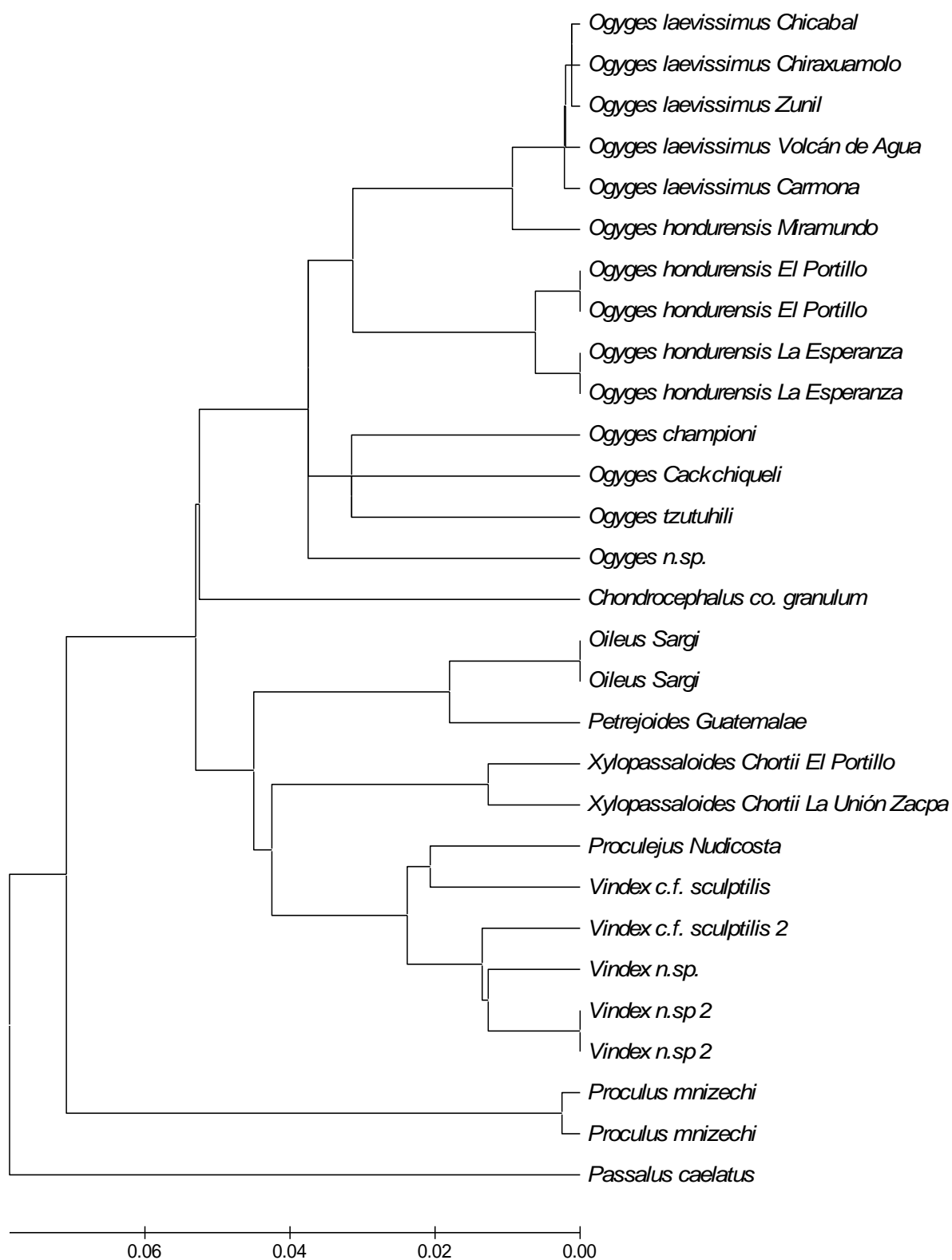
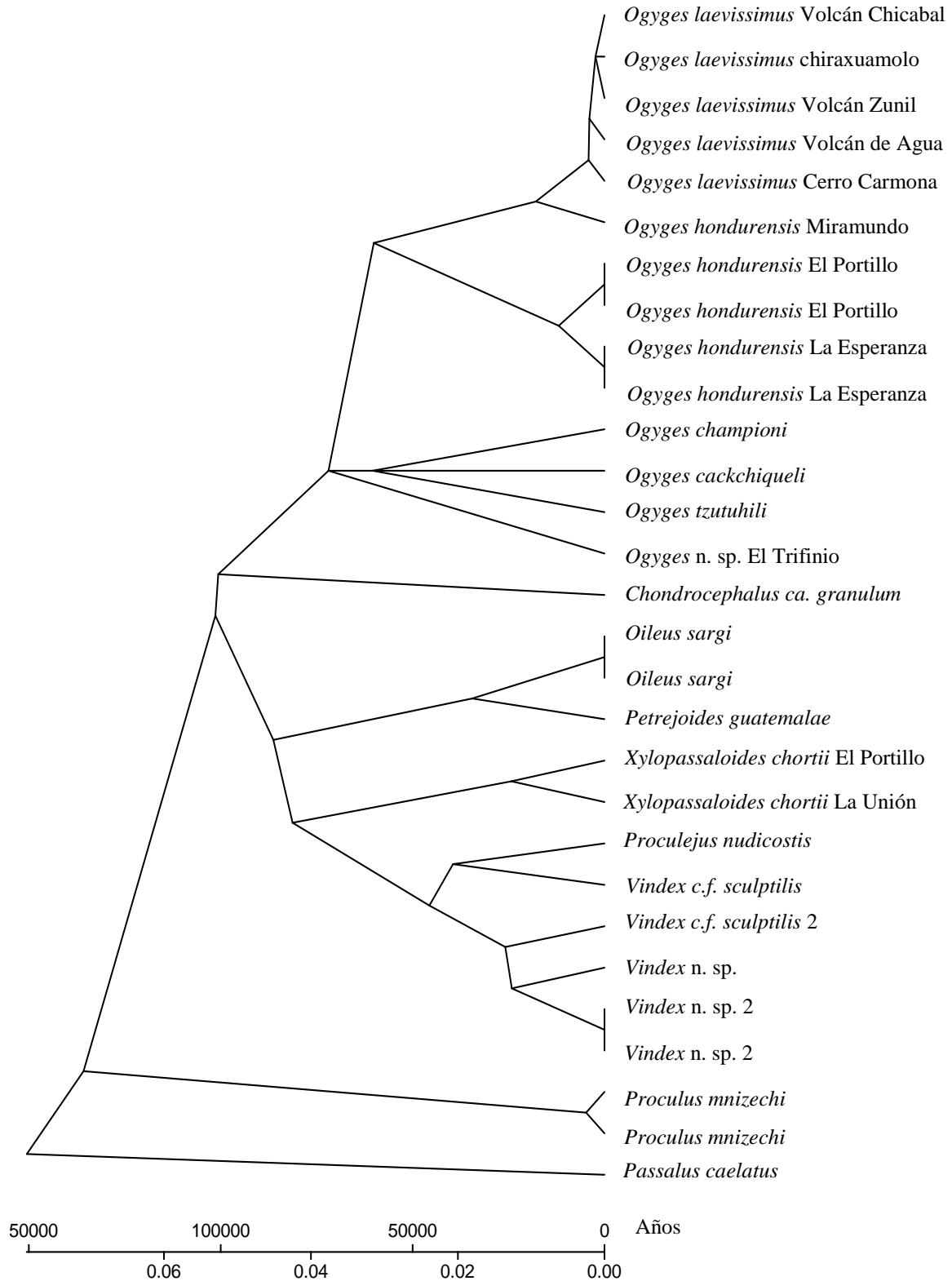


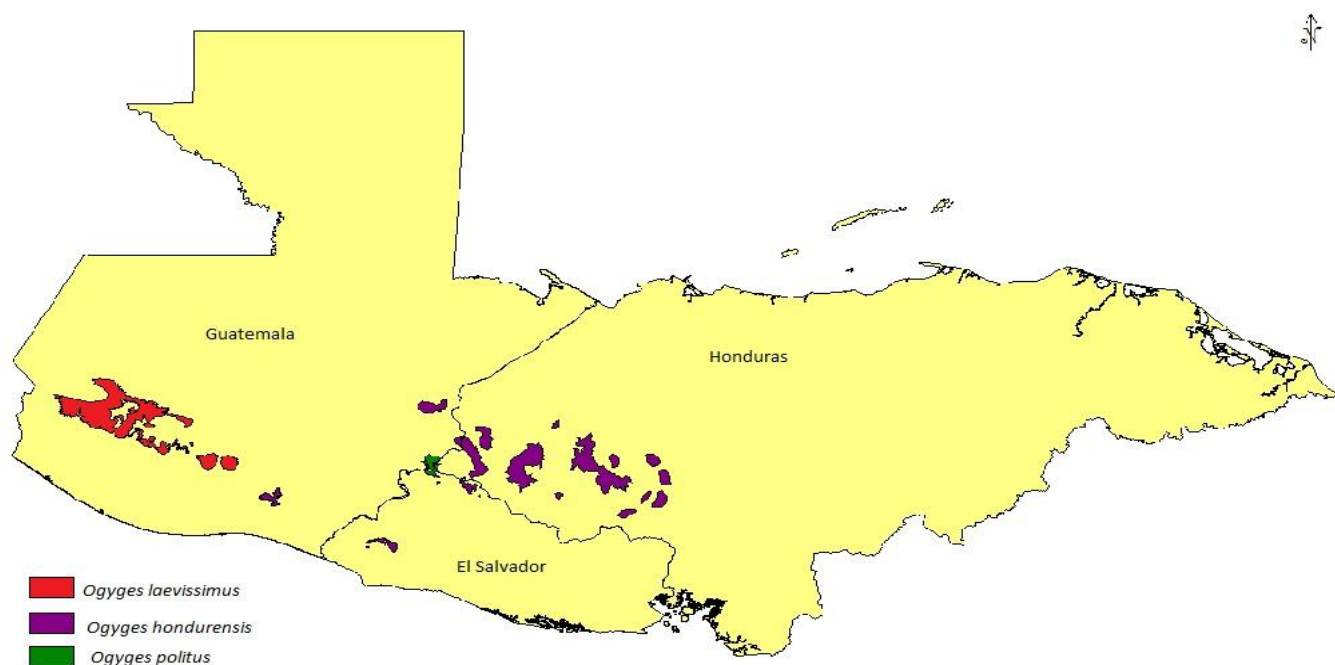
Figura 8. Árbol de separación de ancestros de varias especies de Passalidae basado en la separación de las poblaciones de *Ogyges hondurensis* al final de la última glaciación (hace 12,000 años).



E. Biogeografía de *O. laevissimus*, *O. politus* y *O. hondurensis*

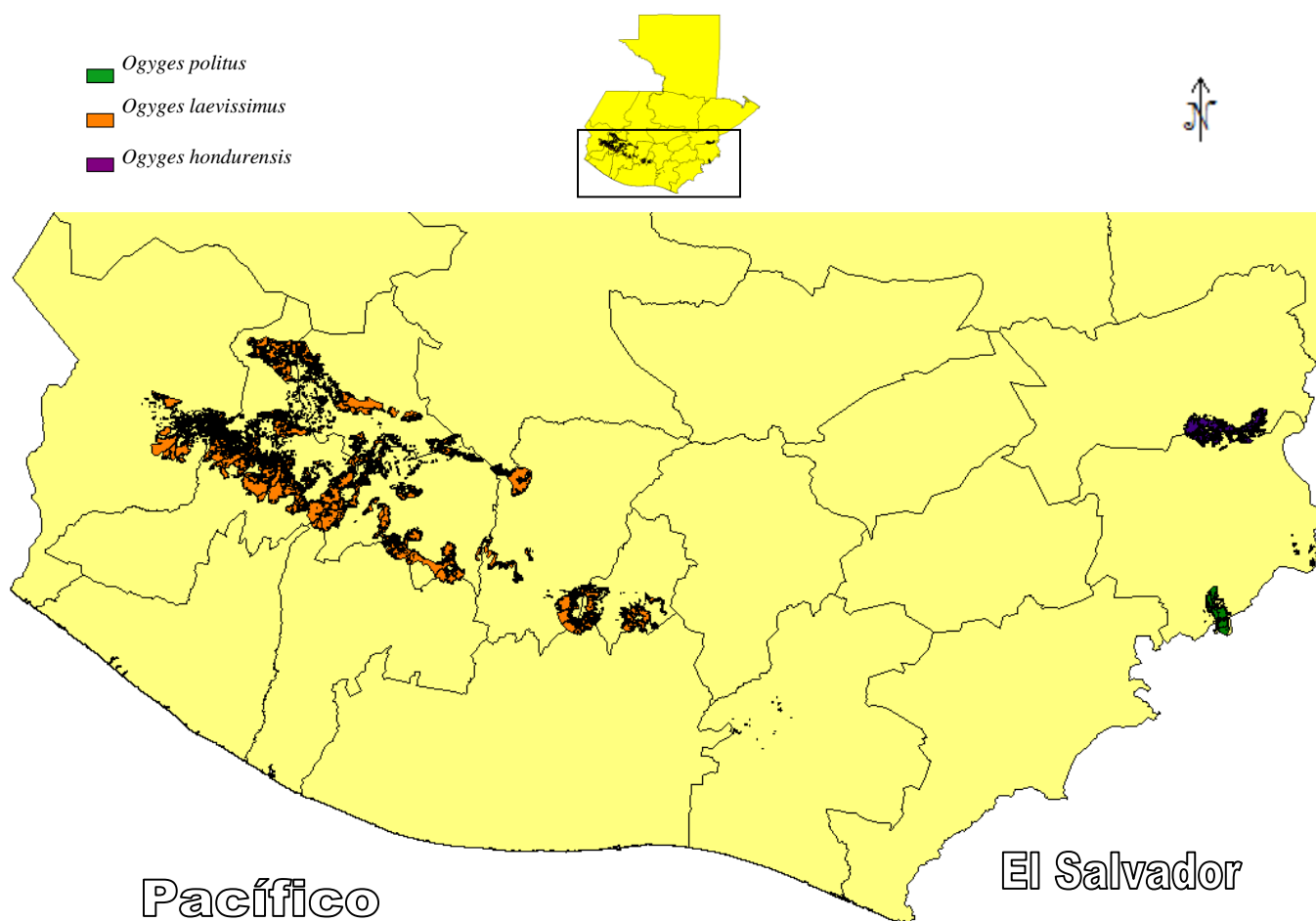
1. Distribución potencial. Generé un mapa de la distribución potencial de las tres especies de *Ogyges* del grupo sur dentro de Guatemala y uno para Guatemala, el Salvador y Honduras. Para el análisis se utilizaron cinco mapas digitales y realicé un análisis de multicriterio de tipo booleano. Se identificaron tres bloques de distribución alopátricos (Figura 9). El primer bloque contiene ocho polígonos donde se encuentra potencialmente distribuido *Ogyges laevissimus* desde el Volcán Tajumulco hasta el Volcán de Agua. El segundo bloque contiene quince polígonos en los que está potencialmente distribuido *Ogyges hondurensis*, tres de ellos ubicados en Guatemala (uno concentrado en el área de Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa; otro entre la parte oriente del límite entre Zacapa y Chiquimula y otro en Chanmagua, Esquipulas) dos en el Salvador y el resto en el suroeste de Honduras. El tercer bloque posee un polígono donde se distribuye potencialmente *Ogyges politus*, ubicado en la Reserva de Biósfera el Trifinio (RBT).

Figura 9. Mapa de distribución potencial de *O. laevissimus*, *O. hondurensis* y *O. politus* en Guatemala, El Salvador y Honduras.



2. Distribuciones utilizando la capa digital de Uso de la Tierra. Realicé una intersección del mapa de distribución potencial de *O. laevissimus*, *O. politus* y *O. hondurensis* con la distribución de los bosques mixtos y latifoliados, en la capa de uso de la tierra para el 2003. Como se puede apreciar en la Figura 10 el área de distribución disminuye con respecto a la distribución potencial. Suponiendo que las tres especies no son tolerantes a la perturbación, ésta sería el área de distribución hasta el 2003. Se nota una reducción y fragmentación significativa en el polígono de *O. hondurensis* dentro de la región de Pueblo Nuevo Viñas y la región de Chanmagua. Con *O. laevissimus* ocurre una clara fragmentación de los 8 polígonos identificados en este bloque.

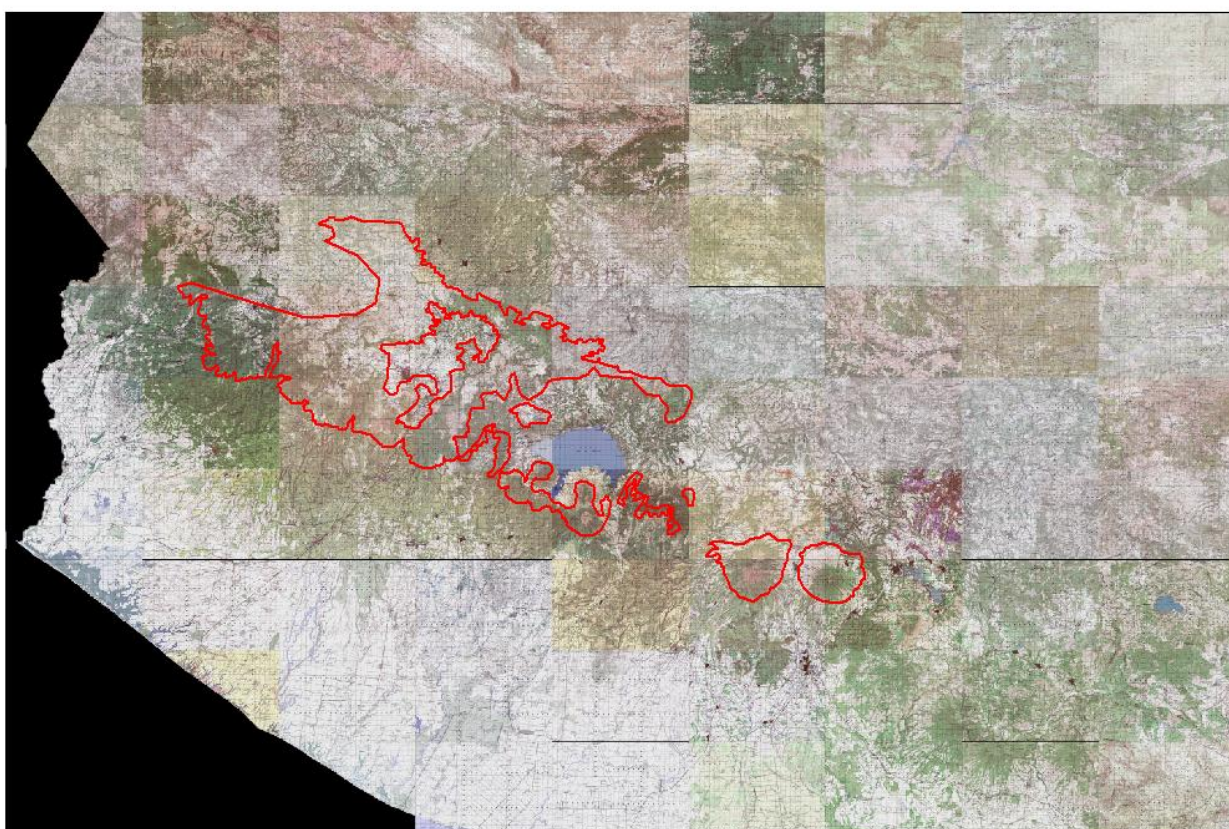
Figura 10. Mapa de distribución de *O. laevissimus*, *O. hondurensis* y *O. politus*, tomando en cuenta la distribución de los bosques mixtos y latifoliados de la zona.



3. Distribución de *O. laevissimus*. La distribución potencial de *O. laevissimus* va desde el Volcán Tajumulco hasta el Volcán de Agua. Se encuentra en los bosques montanos de la zona entre los 1,600 y 3,000 m SNM a una temperatura media de 15° C y precipitación promedio anual de 1,000 a 3,000 mm. Los registros de especímenes para *O. laevissimus* se encuentran a partir de 1,750 m SNM, la ausencia de registros por debajo de esta altura podría deberse a las plantaciones de café que se encuentran entre los 1,600 y 1,750 m SNM, a pesar de que las condiciones para *O. laevissimus* parecen ser idóneas a partir de 1,600 m SNM. El análisis nos indica la existencia de 8 distintas poblaciones de esta especie (ver Figura 11). Empezando desde el oeste, (1) una gran metapoblación está formada por las poblaciones del Volcán Tajumulco y Cerros de la Sierra Madre (El Bojonal, La Fraternidad, El Tablero, El Mirador, Cerro Tuinincantzé, Volcán Chicabal, Volcán Santa María, Volcán Santo Tomás, Panquix, Cerro Jolom, Cerro Chonajtajuyub, Cerro Chuicham, Montaña Siete Cruces), (2) otra población está comprendida por el Cerro La Paz, Cerro San Marcos, Cerro Chuiraxamoló, Cerro Batzibajuyub, (3) otra población incluye a la montaña el Pojooj, Cerro Xiquichó y Cerro Paculam, (4) otra población está compuesta por una conectividad de la Sierra Parpaxquim, Cerro Chuichimil, Cerro Paquixtan, Cerro Paquisís, Cerro Panán, Cerro Cabeza de Burro incluyendo el Volcán San Pedro, Volcán Tolimán y el Volcán Atitlán, (5) otra población está establecida al sureste de la Cuenca del lago de Atitlán en la cual no se pudo identificar nombres de algún cerro, montaña o volcán en el mapa y tres poblaciones aisladas (6) una está en el Cerro La Cumbre, (7) otra está en el Volcán de Acatenango, y la última (8) está en el Volcán de Agua. De estas localidades, *O. laevissimus* se conoce solamente de: Volcán de Agua, Volcán Acatenango, Volcán Atitlán, Volcán Chicabal, Cerro Carmona, Cerro Zunil.

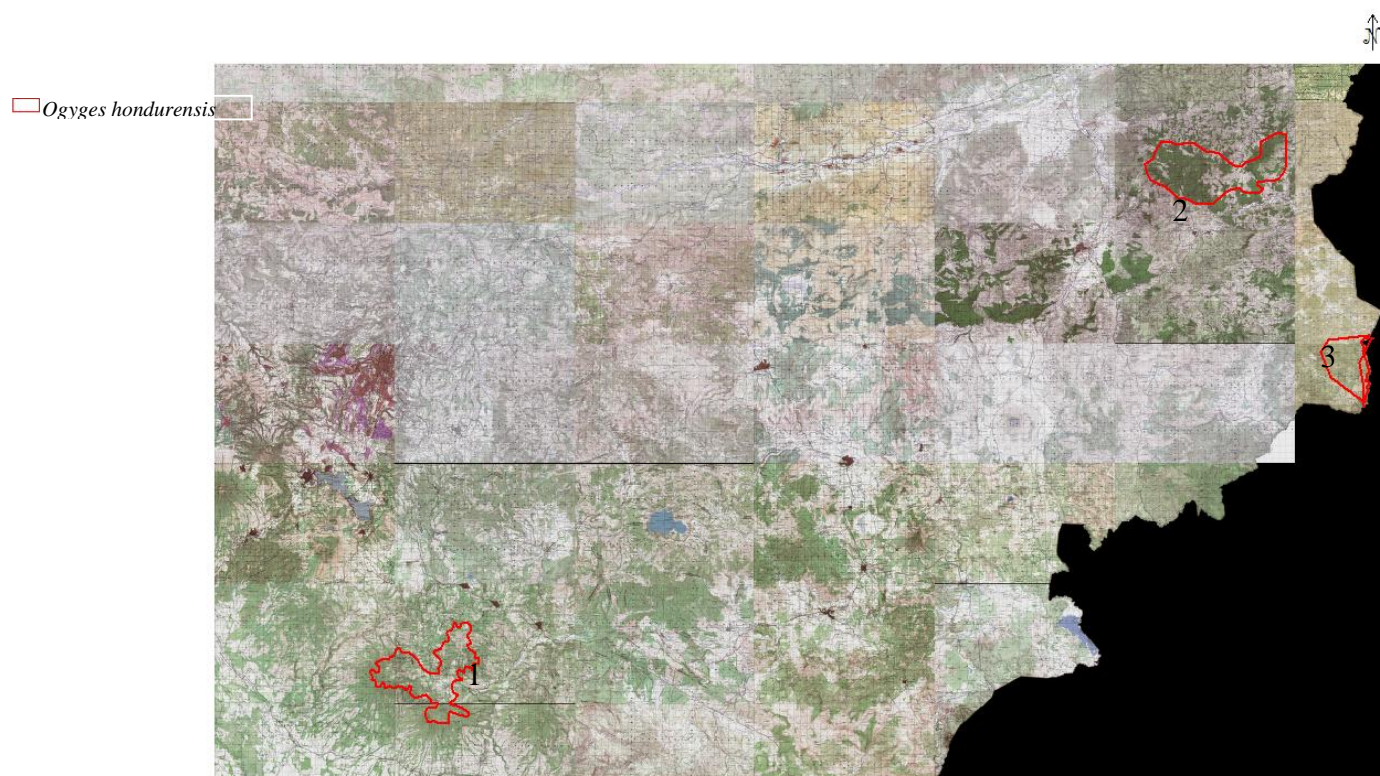
Figura 11. Distribución potencial de *O. laevissimus*.

Ogyges laevissimus



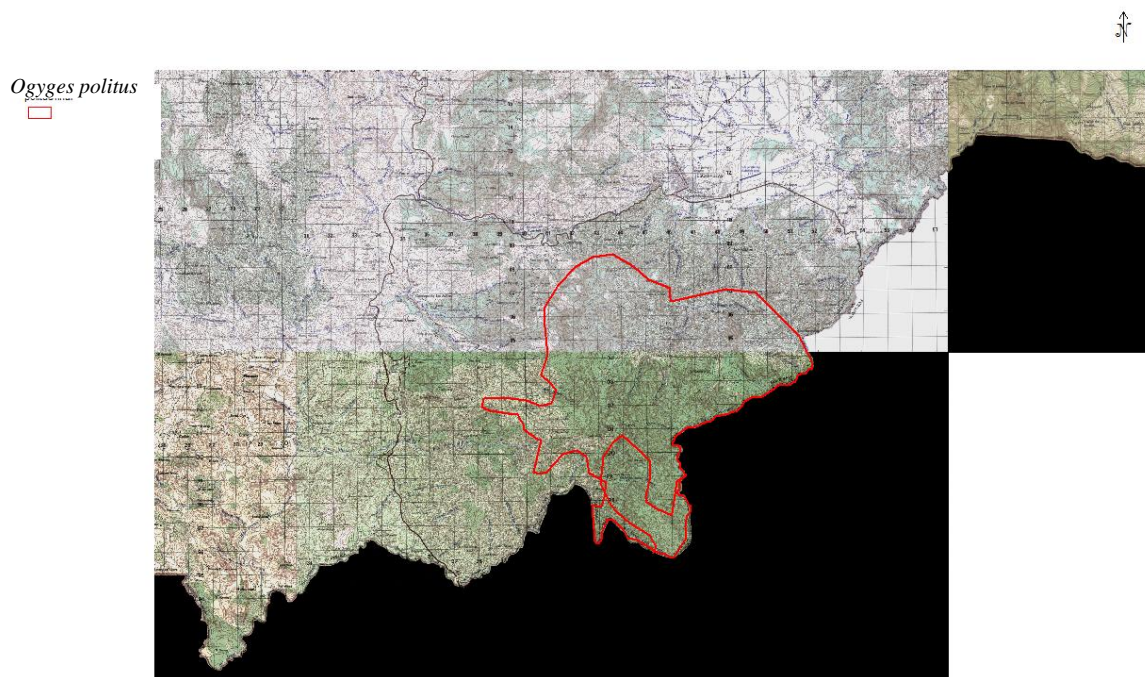
4. Distribución de *O. hondurensis*. La distribución dentro de Guatemala de *O. hondurensis* se limita potencialmente a tres sitios, (1) el Cerro Miramundo en Pueblo Nuevo Viñas, departamento de Santa Rosa; (2) en el límite entre los municipios de Camotán de Chiquimula y la Unión en el departamento de Zacapa y en (3) Chanmagua en el municipio de Esquipulas (Figura 12). Se encuentra en los bosques montanos entre los 1,400 y 1,900 m SNM con una temperatura que varía entre los 25 y 26 °C, con una precipitación promedio anual de 1,500 a 1,800 mm. Se conocen poblaciones actuales de estos sitios.

Figura 12. Distribución potencial de *Ogyges hondurensis*.



5. Distribución de *O. politus*. *Ogyges politus* se encuentra potencialmente distribuido en Guatemala en la RBT como especie endémica del sitio. Habita en los bosques montanos de la zona entre los 1,600 y 2,300 m SNM a una temperatura promedio de 25 °C y una precipitación promedio anual de 1,600 mm. De acuerdo con el análisis booleano existe una población aislada en Guatemala (Figura 13). Empezando con la población del sur, está formada por Cerro Pelón, macizo montañoso Montecristo de la RBT, Cerro Paspado, Las Granadillas, Cerro el Chino, El Sillón, El Volcancito o Cerro Montenegro. Esta especie es la de menor distribución de las tres especies tomadas en cuenta por este estudio. Se conoce actualmente del macizo montañoso Montecristo de la RBT, del lado de Guatemala y El Salvador.

Figura 13. Distribución potencial de *Ogyges politus*.



IV. Discusión

A. Extracción de ADN y amplificación de PCR.

Varios factores (fijador, tiempo de fijación, tamaño del tejido, edad del organismo) son importantes en la calidad del ADN obtenido de las extracciones (Jiménez *et al.* 2007). Distintos métodos de extracción son diseñados para obtener ADN útil dependiendo de las condiciones de las muestras. El éxito de la aplicación de la PCR depende en la calidad del ADN obtenido (Chan *et al.* 2001, Sato *et al.* 2001, Frank *et al.* 1996). De los 6 métodos de extracción evaluados sólo uno mostró ser útil en la extracción de material utilizable para los escarabajos pasálidos.

El método 6, a diferencia de los otros evaluados, tiene varias etapas de purificación y ruptura de proteínas. Jiménez *et al.* 2007 señalan que los pasos de purificación y precipitación pueden eliminar eficientemente los inhibidores de la PCR. El método 6 cuenta con 5 etapas de purificación: dos purificaciones fenólicas que liberan el ADN del material proteico, una con etanol al 70%, otra con etanol al 99% y una purificación con ARNasa al final del proceso para eliminar el ácido ribonucleico. El método cuenta con sólo una etapa de precipitación que, en nuestra modificación, se realiza durante toda la noche y parece ser bastante efectiva.

Otro factor crítico en la extracción de ADN de pasálidos es la dura coraza que rodea los músculos de las que se obtiene el ADN. A excepción del método 1 los otros tratan de mitigar esta característica triturando la muestra con nitrógeno líquido. La trituración y lavado con un detergente parece ser no suficientes con los pasálidos. El método 6, además de los pasos anteriormente nombrados, posee un lavado inicial posterior a la trituración con Triton X y un lavado con SDS y proteínasa K, una enzima degradadora de proteínas, a 36⁰C durante 4 horas.

Según lo que observé, no sólo los métodos de extracción son factores limitantes en el análisis de PCR, sino también el estado de las muestras. Las variables que fueron

significativas en el experimento son la fecha de colecta y la concentración de ADN, como factores limitantes para que el ADN de pasálidos sea útil en las reacciones de PCR. Considero que existen otras variables que no medimos que pueden ser críticas en el éxito de la reacción de PCR. Jewtuchowicz *et al.* (2007) y Jiménez *et al.* (2007) proponen que el fijador es una variable importante. Los escarabajos utilizados del 2006 estaban todos guardados en etanol absoluto a una temperatura aproximada de 4⁰C, las muestras anteriores al 2006 estaban almacenadas a temperatura ambiente y con varios fijadores (etanol, propanol). Todos los métodos probados a excepción del método 1 recomiendan almacenar las muestras con etanol absoluto a una temperatura de 4⁰C. Con esta evidencia sugiero que la temperatura y sustancia de almacenaje son variables que se deben medir en el futuro para saber el efecto en el éxito de la PCR. La integridad del ADN resulta ser otro posible factor crítico en la PCR (Jiménez *et al.* 2007); sin embargo, éste no salió significativo en mi modelo lineal que explica los factores que afectan la amplificación de una muestra en la PCR.

Uno de los resultados preocupantes fue la amplificación nula en genes hipervariables para las muestras anteriores al 2006. El único gen que se pudo amplificar con la mayoría de las muestras fue el gen 12S, un gen constitutivo considerado conservativo. Jiménez *et al.* (2007) indica que es de esperarse para genes constitutivos una alta eficacia en la PCR. Para estudios futuros se recomienda utilizar materiales frescos en la extracción de ADN. Además, recomiendo almacenar las muestras en etanol absoluto a una temperatura de 4⁰C. La continuación del estudio es necesaria para la amplificación con genes hipervariables como CO1, ITS1, ITS2 y ND5. Esta amplificación nos proporcionará mayor información de la variabilidad a nivel de estos genes, además de que tendrá la oportunidad de amplificar en distintas poblaciones de *O. laevisimus* y *O. politus*, puesto que sólo se lograron amplificar muestras para tres poblaciones de *O. hondurensis* y para cinco poblaciones de *O. laevisimus*. La importancia de la amplificación de los otros genes es tener un análisis filogenético con más información y un análisis más a detalle a nivel de poblaciones.

B. Análisis filogenético y biogeográfico

Ogyges es un género de 16 especies descrito por Kaup (1871). Boucher (2005), citando a Schuster y Reyes–Castillo, menciona que el género no está sostenido por ninguna autoapomorfía. Las afinidades que Reyes–Castillo (1970) menciona para la consolidación del género están basadas sobre el conjunto de las estructuras medio frontales y el desarrollo de las arrugas frontales; estas características lo relacionan a *Proculejus* (Boucher 2005).

El estudio de genitales realizado por Boucher (2005) relaciona a *Ogyges* estrechamente con *Proculus* y *Proculejus*. En ambos sexos los genitales de *Ogyges* son similares con los de *Proculejus*. La semejanza presentada entre *Ogyges* y *Proculus* es solamente en los genitales femeninos. Las relaciones encontradas por Boucher (2005) corroboran las encontradas por Schuster & Reyes–Castillo (1981) en larvas. Utilizando larvas Schuster & Reyes–Castillo (1981) colocan a *Ogyges* dentro del grupo Vindex, junto con *Vindex*, *Pseudacanthus*, *Proculejus*, *Proculus*, *Undulifer*, *Oileus*. Este grupo se sostiene con la presencia de pelos en lugar de las setas notales primarias, la falta de setas tergaes laterales, presencia de tres o cuatro pares de setas tergaes medias y doce setas en el anillo anal.

El estudio molecular que realicé con el gen conservado 12S utilizando el método de Máxima Parsimonia indica que *Ogyges* es un clado monofilético y posee como grupo hermano al clado formado por *Vindex*, *Proculejus*, *Xylopassaloides*, *Petrejoides* y *Oileus*. Utilizando el método de Neighbor–Joining se sostiene a *Ogyges* como grupo hermano de *Chondrocephalus* y al clado formado por estos dos relacionado con *Vindex*, *Proculejus*, *Xylopassaloides*, *Petrejoides* y *Oileus*. Si bien está establecida la relación entre los géneros anteriormente mencionados, tanto los árboles producidos por el método de Máxima Parsimonia y Neighbor–Joining indican que *Ogyges* es un grupo bastante diferenciado y que se separó antes del antecesor que dio origen a los otros géneros mencionados. Este estudio, en general, apoya las relaciones mencionadas por Boucher (2005) con genitales y Schuster & Reyes–Castillo (1981) con larvas.

El estudio molecular no apoya la relación entre el género *Proculus* y *Ogyges* propuesta por Boucher (2005) con genitales y Schuster & Reyes – Castillo (1981) con larvas. *Proculus* es el género más diferenciado de la tribu Proculini según las relaciones del gen conservado 12S. Para los estudios de Schuster y Reyes–Castillo (1981) y Boucher (2005) *Proculus* y *Ogyges* están altamente relacionados entre sí.

Otra cosa a notar dentro de los clados de *Ogyges* es la alta diversidad que presenta con respecto al clado *Vindex-Proculejus-Xylopassaloides-Oileus-Petrejoides*. Por ejemplo, la distancia genética que hay entre el grupo de *O. laevissimus* y *O. hondurensis* con *O. cakchiqueli*, *O. championi* y *O. tzutuhili* es similar a la que existe entre *Proculejus* y *Vindex* (Fig. 7). *Ogyges* sp. n. es la especie más basal del clado *Ogyges*; con Neighbor-Joining se diferencia tanto de los otros dos grupos de *Ogyges*, como el clado *Xylopassaloides* con el complejo *Proculejus-Vindex*, pero no con Máxima Parsimonia (figura 6). Se debe evaluar si la categoría de género que se le da a *Ogyges* es apropiada o valdría la pena hacer una división con los grupos que propone el análisis molecular.

La secuencia de *O. politus* no resultó ser elegible para el análisis filogenético. De este estudio propongo una hipótesis con respecto a la colonización de *Ogyges* en la Reserva de Biósfera el Trifinio. Existieron dos colonizaciones de *Ogyges* en la RBT, una primera que da origen a *O. sp. n.* y una posterior del antecesor que dio origen a *O. laevissimus*, *O. hondurensis* y *O. politus*, formando así la población que dio origen a *O. politus*. La evidencia morfológica y molecular otorga evidencia a favor de la hipótesis de la doble colonización, pues morfológicamente *O. politus* está más relacionado a *O. laevissimus* y *O. hondurensis* que a *O. sp. n.*

Para el análisis poblacional de *O. laevissimus* el análisis de Sistemas de Información Geográfica (SIG) sugiere que las poblaciones dentro de un polígono son más relacionadas entre sí que a poblaciones de otros polígonos y que, antes de la destrucción de los bosques por el hombre, pertenecían a una sola gran población. Las poblaciones de *Ogyges laevissimus* más aisladas de los demás son las de Volcán de Agua, Volcán de

Acatenango, Cuenca sur del lago Atitlán y Cerro La Cumbre. El gen conservado 12S no mostró diferencias en las relaciones entre las poblaciones de *O. laevissimus* del Volcán Chicabal, Chiraxuamoló, Volcán Zunil, sugiriendo una separación reciente de estas poblaciones. Sin embargo, sí sugiere una separación menos reciente entre las poblaciones del Volcán de Agua y Carmona, con las anteriormente mencionadas, apoyando las relaciones que predice el análisis SIG.

Debido a las dificultades explicadas para la amplificación de las otras poblaciones de *O. laevissimus* y *O. politus*, no es posible esclarecer relaciones genéticas entre ellas; sin embargo, estudiando la biogeografía es posible hacer algunas inferencias. Las tres especies son parte de la Región II (desde el Istmo de Tehuantepec hasta la depresión de Nicaragua) propuesta por Schuster (2006). Como lo propuso Halffter (1987) cumplen el patrón de distribución Mesoamericano de Montaña (Schuster 2006). Las tres especies analizadas son alopátricas y se infiere que han sufrido una separación reciente al final de las glaciaciones (Fig. 8). *Ogyges laevissimus* potencialmente llega al Volcán Tajumulco al occidente; la cuenca del río Cutzalehima al oeste de Volcán Tajumulco limita su distribución hacia Chiapas; al oriente llega al Volcán de Agua donde se limita al este por la depresión del cañón de Palín. El *Ogyges* del linaje sur más ampliamente distribuido es *O. hondurensis* que tiene como barrera en el occidente al cañón de Palín y en el oriente llega hasta las montañas de la Esperanza en Honduras, con una población aislada en la Unión, Zacapa y potencialmente otras dos en El Salvador, incluyendo un registro de *O. hondurensis* en el Volcán San Salvador. *Ogyges politus* se encuentra rodeado por el valle de Esquipulas y lo restringe solamente al área del Trifinio.

La hipótesis más probable para explicar esta distribución es que durante la última glaciación existió un continuo de bosque nuboso donde habitó un ancestro común *Ogyges* sur; al calentarse el planeta, en el Holoceno las condiciones climáticas para los bosques nubosos se movilizaron arriba causando que las asociaciones vegetales y faunísticas relacionadas a éstas se movilizaran con ellas quedando éstas en su distribución actual. Actualmente las condiciones idóneas para que ocurra el bosque nuboso ahora se encuentran en las tierras altas. Este movimiento ocasionó un fraccionamiento gradual en

el continuo de bosque nuboso, causando que, por vicarianza, el ancestro común *Ogyges* sur se subdividiera en dos poblaciones las cuales se sometieron a especiación dando origen a la distribución actual. Una población quedó al oeste del Cañón de Palín y dio origen a *O. laevissimus*. Otra población quedó al oriente del Cañón de Palín dando origen a *O. hondurensis* y *O. politus*. En un estudio morfológico del 2005 (Beza, no publicado), *O. politus* resultó estar más relacionado con *O. hondurensis* versus *O. laevissimus*. Sin embargo, según 12S, la población más al sur de *O. hondurensis* en Guatemala está más relacionada a *O. laevissimus* que a las poblaciones de *O. hondurensis* más al norte de Guatemala y de Honduras. Esto sugiere que las tierras bajas del oriente de Guatemala actuaron como una barrera primaria entre la población que dio origen a *O. laevissimus* - *O. hondurensis* Miramundo contrario a la idea original del Cañón de Palín como la primer barrera que separó a *O. laevissimus* del linaje “Ogyges” sur, volviéndose significativo el Cañón de Palín hasta más tarde, separando *O. laevissimus* y *O. hondurensis* Miramundo. Evidencia a favor de la hipótesis vicariante son las distribuciones parecidas de otros taxa e.g. Salamandras (Schuster 1992), lagartijas *Abronia* (Ariano & Torres no publicado), víboras *Bothriechis* (Travis *et al.* 2001) y ecarabajos *Chrysina* (Monzón com. Pers. 1999). Según Schuster (com. pers.) la explicación de vicarianza es más probable cuando varios taxa obedecen a un mismo patrón de distribución, apoyando la hipótesis vicariante de la separación del linaje “Ogyges” sur. Las implicaciones taxonómicas de este estudio para el grupo “Ogyges” sur sugieren revisar la morfología de *O. hondurensis* Miramundo pues según los análisis genéticos se puede decir que *Ogyges hondurensis* y *Ogyges laevissimus* forman una sola especie, *Ogyges hondurensis* Miramundo forma otra especie diferente de *O. hondurensis* relacionada a *O. laevissimus* o que *O. hondurensis* Miramundo es realmente *O. laevissimus*.

Evaluando y comparando los mapas de paleoclima realizados por C. Monzón (no publicado) (ver apéndice) y los mapas de la distribución potencial altitudinal del linaje “Ogyges” sur (Ver apéndice), existe evidencia a favor de la hipótesis del origen de las especies del linaje *Ogyges* sur por vicarianza. Según C. Monzón (no publicado) el rango de temperaturas donde habitan los *Ogyges* de linaje sur se ubicaba en tierras de media altura hace algunos 24,000 años manteniéndose más frío hasta hace 12,000 años. En un

segundo escenario hace más o menos 10,500 años, la temperatura baja se desplaza hacia tierras altas y se dividen en dos grupos, uno al occidente del Cañón de Palín conectado aún entre sí, y otro al oriente del Cañón de Palín con una distribución parchada parecida a la distribución actual de *O. hondurensis* en Guatemala, incluyendo la población de Miramundo. La conexión de las condiciones idóneas para *O. laevissimus* en el bloque suroccidente nos ayuda a explicar que esta especie haya sufrido un fraccionamiento reciente y no ha tenido tiempo suficiente para dar origen a nuevas especies en cada polígono de bosque nuboso actual; esto también es apoyado por el análisis molecular. La separación de la población que dio origen a *O. hondurensis* y *O. politus* no puede ser explicada en este estudio. Al parecer *O. hondurensis* y *O. politus* son más tolerantes a temperaturas cálidas que *O. laevissimus*, lo que les otorga más vagilidad y permitió un flujo genético más reciente entre este linaje. Si bien en el ADN no se pudo resolver la relación de *O. politus* con las otras dos especies de *Ogyges* linaje sur, Beza (no publicado), basándose en la morfología, indica que *O. politus* está más relacionado a *O. hondurensis* que a *O. laevissimus*, lo que sostiene la conexión entre el bloque suroriente.

El análisis de SIG, combinado con la información del reloj molecular y los árboles filogenéticos, explica cómo ocurrió la fragmentación de los parches de bosque que albergaban a las especies del estudio. Para *Ogyges laevissimus* parece que aún existe conexión entre algunos conos montañosos como lo indican las distribuciones potenciales. Para *Ogyges hondurensis*, las poblaciones de La Esperanza y El Portillo parecieran haberse separado después que se separaran las poblaciones del Portillo y la Unión. Esto lo sabemos si suponemos que *X. chortii* posee una tasa de mutación similar a la de *O. hondurensis*. Según el reloj molecular, la separación entre *O. hondurensis* de la Esperanza y del Portillo fue hace 12,000 años y la de *X. chortii* del Portillo y *X. chortii* de la Unión se separaron hace 24,000 años. Es lógico pensar que, con el tiempo, el cambio climático y la fragmentación causada por el hombre afectarán las distribuciones actuales de *Ogyges* linaje sur.

La comparación de la Figura 9 y la Figura 10 nos indica la fuerte reducción y fragmentación ocurrida en el hábitat de estos pasálidos en Guatemala. La mayor

reducción es para *Ogyges hondurensis*, en las áreas de Chanmagua y Miramundo. Propongo que se deben agilizar esfuerzos de conservación en estas áreas urgentemente antes de perder las poblaciones de pasálidos y la biota peculiar de estas áreas. Las 8 poblaciones de *Ogyges laevissimus* también han sufrido fragmentación causando que se corte el flujo genético normal de las poblaciones. El análisis molecular apoya la idea que las islas de bosque nuboso son reservorios genéticos únicos; para este caso se debe poner particular atención al bosque de Miramundo, pues pareciera ser un área distinta genéticamente del bloque *O. hondurensis* y también del bloque *O. laevissimus*.

C. Reloj molecular

Según el reloj molecular, la tribu Proculini ha evolucionado en los últimos 135,000 años. Sin embargo, existen ciertas limitaciones que hay que señalar con respecto a la metodología utilizada en este estudio: (1) calibré el reloj molecular bajo el supuesto de la separación temporal de dos especies, (2) asumí que la tasa de mutaciones para el gen 12S es la misma para todos los géneros de Passalidae que analicé. El reloj molecular no es una técnica actualmente muy refinada y hay muchas limitaciones en su uso; sin embargo, no deja de ser una herramienta útil. La técnica se puede complementar con registros fósiles, que para pasálidos solamente es conocido *Passalus indormitus* (Reyes–Castillo 1977) del Oligoceno hace más o menos 33.9 a 23.3 millones de años. Al parecer la morfología de este fósil ya es bastante consistente con las características de la tribu Passalini y el género *Passalus*, subgénero *Passalus* sección “Neleus” de la actualidad, sugiriendo la división entre Passalini y Proculinii en América mucho antes que lo sugerido por el reloj molecular de este estudio; sugiriendo también una tasa evolutiva baja para los pasálidos de esta sección contrario a lo que indica el reloj molecular de este análisis, siendo más confiable el dato fósil.

V. Conclusiones.

- ❖ El método de extracción de Henry *et al.* (1990) funciona en la extracción de ADN para pasálidos. Otros métodos también proveen ADN pero no con la calidad necesaria para la amplificación de producto PCR.
- ❖ No sólo el método de extracción es crítico para el éxito de la PCR en los pasálidos. El estado de almacenaje de las muestras también son variables críticas en este éxito.
- ❖ Es posible la amplificación de seis cebadores (CO1, ND5, ITS1, ITS2, 12S, 16S) en pasálidos recién colectados utilizando las recetas 1, 2, 3 y los programas de amplificación 1, 2, 3. Para pasálidos que fueron colectados hace mucho es difícil la amplificación de genes variables, pero es probable la amplificación de genes conservados, como 12S. Las dificultades pueden ser debido al mal almacenaje de muestras y a la calidad del ADN de las muestras viejas, según lo discutido en la sección IV A.
- ❖ El género *Ogyges* es un clado monofilético bastante diferenciado de su grupo hermano. El grupo hermano incluye *Vindex*, *Petrejoides*, *Oileus*, *Proculejus*. Según el método de Neighbor – Joining *Ogyges* es grupo hermano de *Chondrocephalus*.
- ❖ El género *Ogyges* está dividido en tres grupos principales, uno formado por *Ogyges* sp. n., otro por las especies del norte (*O. tzutuhili*, *O. cackchiqueli*, *O. championi*), y el tercero por las especies del sur (*O. laevisimus*, *O. hondurensis*). Pero, este estudio no toma en cuenta todas las especies de *Ogyges*.
- ❖ Probablemente la especiación entre *O. laevisimus*, *O. hondurensis* y *O. politus* se dio debido a vicarianza, después del retroceso de los bosques nubosos a los conos volcánicos al final de las glaciaciones del Pleistoceno.

- ❖ Debido a la relación entre *O. laevissimus* y *O. hondurensis* Miramundo, rechazo la hipótesis del Cañón de Palín como la primera barrera en separar a la población que dio origen a las tres especies del grupo “Ogyges” sur; en cambio propongo a las tierras bajas del oriente de Guatemala como la barrera biogeográfica más importante.

- ❖ 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 que deben ser priorizados en conservación.

VI. Recomendaciones.

Recomiendo reforzar la colecta de escarabajos pasálidos de montaña y almacenar éstos de una forma apropiada para la extracción posterior de ADN, en etanol al 100% y a 4°C.

En el análisis de distribución potencial de *Ogyges laevissimus* hecho en este estudio se identifican nuevas áreas de distribución donde la especie no ha sido colectada. Se recomienda hacer colectas en estos sitios para verificar su presencia en dichas áreas.

Se debe continuar el estudio evaluando las poblaciones de *O. laevissimus*, de las cuales sus secuencias no fueron útiles en el análisis filogenético.

Se debe continuar el estudio de caracterización molecular de *Ogyges* utilizando más cebadores, tanto para taxa generales (Tribu, Género) como para taxa más específicos (Poblaciones).

VII. Literatura citada:

- Anderson, T. H. 1968. *First evidence for glaciations in the Sierra de los Cuchumatanes range, north western Guatemala*. Geological Society. American Special Paper 121, Boulder, Colorado.
- Ballard, J.; G. Olsen; D. Faith; W. Odgers; D. Rowell & P. Atkinson. 1992. *Evidence from 12S ribosomal RNA sequence that onychophorans are modified arthropods*. Science 258:1345–1348.
- Black, W. & R. Roehrdanz. 1998. *Mitochondrial gene order is not conserved in arthropods: Prostriate and metastriate tick mitochondrial genomes*. Molecular Biology and Evolution 15: 1772–1785.
- Cano, E.B. (ed.). 2006. *Biodiversidad de Guatemala, Volumen I*. Universidad del Valle de Guatemala, Fondo Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Guatemala. 400 pp.
- Chan, P.; D. Chan; K. To; M. Yu; J. Cheung & A. Cheng. 2001. *Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA*. Journal of Clinical Pathology 54(5):401-403.
- Frank, T.; S. Svoboda & E. Shi. 1996. *Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR*. Diagnostic Molecular Pathology 5(3):220-224.
- Gerald, A. & B. Leyden. 2006. *La vegetación de Guatemala durante el Pleistoceno terminal y Holoceno*. En: Cano, E.B. (ed.). *Biodiversidad de Guatemala, Volumen I*. Universidad del Valle de Guatemala, Fondo Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Guatemala. Pp. 15–23.
- Gurney, Jr., T.; R.E. Elbel & D. Ratnapradipa. 2000. *Preliminary studies of Utah mosquitoes by DNA sequencing*. University of Utah, Dept. of Biology. En: <http://www.umaa.org/proceedings/webpages/2000/PRELIMINARY%20STUDIES%20OF%20UTAH%20MOSQUITOES.htm>. (accesado en diciembre 2006)
- Hasténrath, S. 1974. *Spuren pleistozäner Verisierung in den altos de Cuchumatanes, Guatemala*. Eiszeitalter und Gegenwart 25:25–34.
- Hillis, D.M.; C. Moritz y B. K. Mable. 1996. *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. 655 pp.

- Hiss, R.; D. Norris; C. Districh; R. Whitcomb; D. West; S. Kambhupati; J. Pisman; M. Anolini & W. Black. 1994. *Molecular taxonomy using single strand conformation polymorphism (SSCP`s) analysis of mitochondrial ribosomal DNA genes*. *Insect Molecular Biology* 3:171–182.
- Hoy, M. 1994. *Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications*. Academic Press, San Diego. 546 pp.
- Hwang, U. & W. Kim. 1999. *General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics*. *The Korean Journal of Parasitology* 37:215-228.
- Iturralde-Vinent, M. A. 2006. *El origen paleogeográfico de la biota de Guatemala*. En: Cano, E.B. (ed.). *Biodiversidad de Guatemala, Volumen I*. Universidad del Valle de Guatemala, Fondo Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Guatemala. Pp 1-6.
- Jewtuchowicz, V.M.; J.L. Finguelievich; E. Durán; M.T. Mujica; C.A. Iovannitti. 2007. *Comparación de métodos de extracción de ADN de sangre para detectar ADN fúngico por PCR*. Universidad de Buenos Aires, Centro de Micología, Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina. En: www.scielo.org.ar/pdf/ram/v39n1/v39n1a04.pdf (accesado en enero 2009).
- Jiménez, A.G.; M.J. Villalobos; E. Jiménez & W. Palma. 2007. *Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares*. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*.En: www.revistamedica.ucr.ac.cr/busquedas/descargaPDF.php?id=3&tipo=pdf (accesado en enero 2009).
- Kambhupati S.; K. Kjer & B. Thorne. 1996. *Phylogenetic relationship among termite families based on DNA sequence of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene*. *Insect Molecular Biology* (5):229–238 .
- Kelley, M.B.; S.W. Wingard; A.L. Szalanski & F.M. Stephen. 2006. *Molecular Diagnostics of Enaphalodes rufulus (Coleoptera: Cerambycidae)*. *Florida Entomologist* 89 (2):251–256.
- Macvean, C. & J.C. Schuster. 1981. *Altitudinal distribution of passalid beetles (Coleoptera: Passalidae) and Pleistocene dispersal on the volcanic chain of northern Central America*. *Biotrópica* (13):29–83.

- Molina-Cruz, A.; A.M. de Mérida; K. Mills; F. Rodríguez; C. Schoua; M. M. Yurrita; E. Molina; M. Palmieri & W.C. Black. 2004. *Gene flow among Anopheles albimanus populations in Central America, South America, and the Caribbean assessed by micosatellites and mitochondrial DNA*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 71(3):350–359.
- Moritz, C. & D. Hillis. 1996. *Molecular systematics: context and controversies*. En: Hills, D., C. Moritz & B. Mable (eds). *Molecular systematics*. 2da. ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. Pp. 1–13.
- Navajas M.; J. Gutierrez & J. Lagnel. 1996. *Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: a comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits*. Bulletin of Entomological Research 86:407 – 417.
- Phillips, A. & C. Simon. 1995. *Simple, efficient and nondestructive DNA extraction protocol for arthropods*. Annals of the Entomological Society of America 88(3): 281-283.
- Reyes-Castillo, P. 1977. *Systematic interpretation of the Oligocene fossil Passalus indormitus (Coleoptera: Passalidae)*. Annals of the Entomological Society of America 70: 652-654.
- Ritchards, M.K.; T.R. Glare & D.C.A. Hall. 1997. *Genetic variation in grass grub, Costelytra zealandica, from several regions*. 50th NZ Plant Protection Conference (1997). En: <http://www.nzpps.org>. (con acceso el 19-02-2007).
- Sato, Y.; R. Sugre; B. Tsuchiya; T. Kameya; M. Natori & K. Mukai. 2001. *Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues*. Diagnosis Molecular Pathology, 10(4): 265-271.
- Schuster, J. 1992. *Biotic areas an the distribution of passalid beetles (Coleoptera) in Central America: post-Pleistocene montane refuges*. En: *Biogeography of Mesoamerica*. Tulane studies in zoology and botany, Supplementary Publ. no. 1, New Orleans. Pp. 285-293.
- Schuster, J. 2006. *Passalidae (Coleoptera) de Mesoamérica: diversidad y biogeografía*. En: Cano, E.B. (ed.). *Biodiversidad de Guatemala, Volumen I*. Universidad del Valle de Guatemala, Fondo Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Guatemala. Pp. 379–392.

- Schuster, J. & E. B. Cano. 2005. *La distribución mesoamericana de montaña: síntesis de Passalidae (Coleoptera : 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)*. Las Prensas de Ciencias Facultad de Ciencias, UNAM, México. Pp. 257-268.
- Schuster, J.; E. 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. & P. Reyes-Castillo. 1990. *Coleoptera, Passalidae: Ogyges Kaup, revisión de un género mesoamericano de montaña*. Acta Zoológica Mexicana (n.s) 40:1-49.
- Scullburg, J. H. G.; M. Habig; J.J. Sloggett; M. Webberley; D. Bertrand; G. D. Hurst & M. Majerus. 2001. *Incidence of male-killing Rickettsia spp. (α-Proteobacteria) in the ten-spot ladybird beetle Adalia decempunctata L. (Coleoptera: Coccinellidae)*. Applied and Environmental Microbiology 67(1): 270–277.
- Villatoro, K.E. 1997. *Evaluación del método de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para el estudio taxonómico de Passalidae (Coleoptera: Scarabaeoidea)*. Trabajo de Graduación de licenciatura, Departamento de Biología, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Londres. Pp 315-322.

VII. Apéndice

Apéndice 1. Métodos de extracción de ADN evaluados

Método 1. Perforar el espécimen con una aguja entomológica en el abdomen varias veces, atravesando el exoesqueleto. Colocar la muestra en un tubo que contenga 600 µl de DTAB al 8%, 1.5M NaCl, 100 mM tris-Cl (pH 8.8), 50 mM EDTA. Dejar en baño María a 68° C, durante una noche. Agitar el tubo varias veces. Sacar la muestra, lavarla con cloroformo y guardarla. Añadir 600 µl de cloroformo, mezclar y centrifugar a 10, 000 g por 2 minutos. Transferir la capa acuosa (capa superior) a otro tubo y repetir extracción con cloroformo, se le agregan 900 µl de agua y 100 µl de solución de CTAB 5% y NaCl 0.4 M. Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugar a 10000 g por 10 minutos, descartar sobrenadante. Resuspender en 300 µl de NaCl 1.2 M. Se precipita el ADN agregando 750 µl de etanol al 100%, centrifugación a 10000 g por 10 minutos. Se descarta el etanol y se lava con 300 µl de etanol al 70% y hacer centrifugación. Se seca al vacío por 10-15 minutos y se resuspende en 50 µl de buffer TE 0.5x pH 8.0. (Philips & Simons 1995).

Método 2. Dos patas fueron homogenizadas de forma manual en nitrógeno líquido y 1 ml de tampón de lisis (tris-HCl 50mM pH 8,25; EDTA 50 mM; NaCl 50 mM; SDS 1%). La suspensión se incubó con 2 mg/ml de proteinasa K (Boehringer Mannheim) toda la noche a 37°C. Seguidamente se realizaron 3 extracciones de proteínas con igual volumen de fenol, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), con sus respectivas centrifugaciones a 8000 g por 10 min a 4° C. El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.3; durante 30 min a -20° C. El precipitado de ADN genómico que se obtuvo por centrifugación a 10000 g durante 20 min se lavó con etanol 70% y se secó a temperatura ambiente; fue resuspendido finalmente en 50 µl de tampón tris-EDTA (TE) (tris-HCl 1 mM pH 8.0; EDTA 1 mM pH 8.0). El ARN presente en la muestra se digirió con la adición de RNasa H (Boehringer Mannheim, Germany), incubándose durante 1 h a 37°C. Seguidamente, se realizó una extracción empleando un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y el sobrenadante se conservó a -20°C.

Método 3. Dos patas fueron homogenizadas de forma manual en 100 µl de tampón de lisis (NaCl 0.1M; sacarosa 0.2M; EDTA 50mM; tris-HCl 100mM pH 8.25; SDS 0.05%). La suspensión se incubó durante 30 min a 65°C. Los ácidos nucleicos se extrajeron adicionando 14 µl de acetato de potasio 8M incubándose en hielo durante 15 min, seguido de una centrifugación a 8000 g durante 10 min a 4°C donde se colectó la fase acuosa. El ADN se precipitó a -20°C durante 30 min en presencia de 2 volúmenes de etanol absoluto que contenía acetato de sodio 0.3 M. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a 10000 g durante 20 min y el precipitado se lavó con etanol (70%). Después de secar a temperatura ambiente, el ADN se disolvió en 50 µl de tampón TE. El ARN restante se eliminó con RNasa H (Boehringer Mannheim), la suspensión se incubó a 37°C durante 1 h. Después de extraer con igual volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), la fase acuosa se conservó a -20°C.

Método 4. Homogenizar insectos o parte de éstos en tubos de microcentrífuga con un pistilo en 200 ul de buffer estéril (10mM Tris, 2.5mM MgCl₂, 50mM KCl), 200 ul de fenol y 10 ul de SDS 20%. Se separan las fases centrifugando. Precipitar el ADN usando etanol. Resuspender en 20 ul de TE (10mM Tris pH 8.0 y EDTA 1mM).

Método 5. Tomar 2 patas, una media y una posterior, o tomar material del interior del torax y el abdomen de un escarabajo pasárido adulto. Macerar en 10 ul de buffer de lisis (Proteinasa K 0.001g, Tris HCl 1M pH 8, EDTA 0.5M pH 8, Nonidet P-40) dentro de un tubo eppendorf con pistilo. Luego agregar los otros 100 ul de buffer de lisis lavando el área de maceración. Se transfiere a un eppendorf. Calentar por 15 minutos a 65°C y luego 10 minutos a 95°C. Meter las muestras en hielo si van a ser trabajadas inmediatamente, de lo contrario se almacenan a -20°C.

Método 6. Método de extracción según (Henry *et.al.* 1990). Macerar la parte del insecto de donde se va hacer la extracción (pata, músculo del tórax). Añadir un ml de TENT buffer (10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 25 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100). Mezclar y centrifugar a 13,000 rpm por 5 min. Resuspender en 540 ul de buffer TEN (Buffer TENT sin Triton X) con 1 mg/ml de proteinasa K. Añadir 60 ul SDS para tener una concentración de 1% de SDS. Incubar a 37°C durante 4 horas. Agregar 5 ul de NaCl 5M. Realizar dos extracciones con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1. Precipitar con isopropanol durante 30 min a -20°C. Resuspender en 50ul de buffer TE. Remover residuos de RNA incubando durante una hora a 37°C con RNAasa A, libre de DNAasa.

Apéndice 2. Listado de especímenes de *Ogyges* y localidades utilizados en el análisis filogenético.

1.1 – 1.3: *O. cackchiqueli*; GUATEMALA, Huehuetenango, Montaña de Cuilco 2,100 m SNM; 1996.

2: *O. cackchiqueli*; GUATEMALA, Huehuetenango, Fca. San Luis 8. 1994.

3.1 – 3.2: *O. adamsi*; HONDURAS, Morazán, La Tigra. 1971.

4.1 – 4.3: *O. tzutuhili*, GUATEMALA, Zacapa, San Lorenzo. 1993.

5.1 – 5.3: *O. laevisimus*; GUATEMALA, Sacatepéquez, Volcán Acatenango, 2,300 m SNM. 1982.

6.1 – 6.3: *O. laevisimus*; GUATEMALA, Quetzaltenango, Volcán Santa María, 2,100 m SNM; 1977.

7.1 – 7.3: *O. laevisimus*; GUATEMALA, Sololá, Volcán Atitlán, 2,500 m SNM. 1977

8.1 – 8.3: *O. laevisimus*; GUATEMALA, Sacatepéquez, Volcán de agua, 2,700 m SNM.

9.1 – 9.2: *O. hondurensis*; GUATEMALA, Santa Rosa, Pueblo Nuevo Viñas, 1,800 m SNM; 1999.

10.1 – 10.3: *O. hondurensis*; HONDURAS, Ocotepeque, El Portillo, 1900 m SNM. 1981.

11.1 – 11.2: *O. hondurensis*; HONDURAS, Intibuca, La Esperanza; 1980.

12.1 – 12.2: *O. hondurensis*; HONDURAS, Cortez, 1420 m SNM; 1991.

13.1 – 13.2: *O. politus*; GUATEMALA, Concepción Las Minas, RBT. 1998.

Apéndice 3. Datos de absorbancia en la extracción de ADN de Passalidae (2006).

	A260	A280	A320		Pureza	Concentración
19.2.1	0.039	0.018	0.001		2.235294	190
19.1.4	0.048	0.024	0.003		2.142857	225
19.1.3	0.022	0.01	0		2.2	110
18.1.2	0.061	0.029	0.002		2.185185	295
17.1.2	0.066	0.036	0.005		1.967742	305
19.2.2	0.042	0.022	0.002		2	200
19.1.1	0.039	0.022	0.005		2	170
17.3.2	0.055	0.031	0.004		1.888889	255
19.1.2	0.021	0.014	0.006		1.875	75
19.2.6	0.034	0.018	0.001		1.941176	165
2.3	0.059	0.044	0.018		1.576923	205
2.4	0.0314	0.026	0.013		1.415385	92
3.3.1	0.005	0.004	0		1.25	25
3.3.2	0.004	0.003	0		1.333333	20
3.4	0.043	0.021	0.001		2.1	210
4.1	0.021	0.01	0		2.1	105
5.4.2	0.042	0.023	0.002		1.904762	200
5.4.3	0.035	0.018	0		1.944444	175
5.4.4	0.031	0.016	0		1.9375	155
5.4.5	0.035	0.01	0.002		4.125	165
5.4.6	0.003	0.001	0		3	15
5.4.7	0.007	0.004	0		1.75	35
5.5.1	0.001	0.003	0.002		-1	-5
5.5.2	0	0	0		0	
6.1.2	0.034	0.024	0.013		1.909091	105
7.2	0.027	0.016	0.005		2	110
7.3	0.007	0.004	0.001		2	30
7.4	0.056	0.032	0.007		1.96	245
7.5	0.016	0.011	0.005		1.833333	55
7.7	0.013	0.006	0		2.166667	65
8.2	0.001	0	0			
9.5	0.015	0.007	0		2.142857	75
5.3.7	0.004	0.001	0		4	20
5.3.6	0.016	0.006	0		2.666667	80
5.3.5	0.008	0.003	0		2.666667	40
7.4	0.01	0.008	0.003		1.4	35
5.4.2					0	
2.3	0.051	0.042	0.023		1.473684	140
5.4.3	0.029	0.025	0.014		1.363636	75
1.5.1	0.023	0.018	0.008		1.5	75
2.4	0.121	0.109	0.083		1.461538	190
promedio					1.815064	124.3947
S					0.914861	84.00854

Apéndice 4. Datos de absorbancia en la extracción de ADN de Passalidae, muestras anteriores al 2006

	A260	A280	A320	()	Pureza
1.1	0.359	0.207	0.053	1530	1.98701299
1.2	0.571	0.464	0.27	1505	1.55154639
1.3	0.235	0.184	0.037	990	1.34693878
2	0.279	0.2	0.075	1020	1.632
3.1	0.312	0.228	0.111	1005	1.71794872
3.2	0.142	0.116	0.065	385	1.50980392
4.1	0.147	0.119	0.058	445	1.45901639
4.2	0.3	0.102	0.045	1275	4.47368421
4.3	0.104	0.082	0.038	330	1.5
5.1	0.037	0.027	0.012	125	1.66666667
5.2	0.038	0.029	0.014	120	1.6
5.3	0.064	0.049	0.025	195	1.625
6.1	0.101	0.077	0.041	300	1.66666667
6.2	0.07	0.052	0.026	220	1.69230769
6.3	0.03	0.021	0.006	120	1.6
7.1	0.044	0.03	0.007	185	1.60869565
7.2	0.092	0.057	0.013	395	1.79545455
7.3	0.138	0.093	0.033	525	1.75
8.1	0.129	0.102	0.06	345	1.64285714
8.2	0.109	0.088	0.04	345	1.4375
8.3	0.114	0.102	0.069	225	1.36363636
9.1	0.022	1.013	0.003	95	0.01881188
9.2	0.057	0.034	0.008	245	1.88461538
10.1	0.069	0.047	0.017	260	1.73333333
10.2	0.203	0.141	0.055	740	1.72093023
10.3	0.134	0.102	0.051	415	1.62745098
11.1	0.12	0.093	0.041	395	1.51923077
11.2	0.534	0.454	0.237	1485	1.36866359
12.1	0.267	0.223	0.132	675	1.48351648
12.2	0.401	0.346	0.208	965	1.39855072
13.1	0.11	0.084	0.036	370	1.54166667
13.2	0.185	0.142	0.065	600	1.55844156
Promedio				557.1875	1.64006087
S				434.757881	0.60568224

Apéndice 5. Análisis estadístico para predicción de amplificación a partir de la concentración, pureza y fecha de colecta.

Análisis “stepwise”.

Stepwise Regression Control

Step History

Step	Parameter	Action	L-R ChiSquare	"Sig Prob"	RSquare	p
1	Concentración	Entered	13.36055	0.0003	0.1305	3
2	Concentración	Removed	13.36055	0.0003	-1e-9	2
3	Pureza	Entered	0.094671	0.7583	0.0009	3
4	Pureza	Removed	0.094671	0.7583	-1e-9	2
5	Fecha de colecta{01.01.71-01.01.06}	Entered	54.29772	0.0000	0.5302	4
6	Fecha de colecta{01.01.71-01.01.06}	Removed	1.42e-14	1.0000	0.5302	3
7	Concentración	Entered	0.036956	0.8476	0.5306	4
8	Fecha de colecta{01.01.93&01.01.91&01.01.99&01.01.98&01.01.77&01.01.82&01.01.81&01.01.80-01.01.71&01.01.06}	Removed	40.97412	0.0000	0.1305	3
9	Concentración	Removed	13.36055	0.0003	-1e-9	2
10	Concentración	Entered	13.36055	0.0003	0.1305	3
11	Fecha de colecta{01.01.71-01.01.06}	Entered	40.97412	0.0000	0.5306	5
12	Concentración	Removed	0.036956	0.8476	0.5302	4
13	Concentración	Entered	0.036956	0.8476	0.5306	5
14	Fecha de colecta{01.01.93&01.01.91&01.01.99&01.01.98&01.01.77&01.01.82&01.01.81&01.01.80-01.01.71&01.01.06}	Removed	40.97412	0.0000	0.1305	3
15	Fecha de colecta{01.01.71-01.01.06}	Entered	40.97412	0.0000	0.5306	5
16	Concentración	Removed	0.036956	0.8476	0.5302	4
17	Concentración	Entered	0.036956	0.8476	0.5306	5
18	Fecha de colecta{01.01.93&01.01.91&01.01.99&01.01.98&01.01.77&01.01.82&01.01.81&01.01.80-01.01.71&01.01.06}	Removed	40.97412	0.0000	0.1305	3
19	Pureza	Entered	1.339433	0.2471	0.1435	4
20	Concentración	Removed	14.60531	0.0001	0.0009	3
21	Pureza	Removed	0.094671	0.7583	-1e-9	2
22	Concentración	Entered	13.36055	0.0003	0.1305	3
23	Concentración	Removed	13.36055	0.0003	-1e-9	2
24	Fecha de colecta{01.01.93&01.01.91&01.01.99&01.01.98&01.01.77&01.01.82&01.01.81&01.01.80-01.01.71&01.01.06}	Entered	54.29772	0.0000	0.5302	3
25	Concentración	Entered	0.036956	0.8476	0.5306	4
26	Pureza	Entered	0.005828	0.9391	0.5306	5
27	Pureza	Removed	0.005828	0.9391	0.5306	4

Análisis es significativo para Fecha de Colecta y para Concentración.

Apéndice 6. Modelo de regresión.

Ordinal Logistic Fit for Amplificación

Whole Model Test

Model	-LogLikelihood	DF	ChiSquare	Prob>ChiSq
Difference	11.307514	2	22.61503	<.0001
Full	39.894765			
Reduced	51.202278			

RSquare (U) **0.2208**
 Observations (or Sum Wgts) **68**

Converged by Objective

Lack Of Fit

Source	DF	-LogLikelihood	ChiSquare
Lack Of Fit	106	39.894765	79.78953
Saturated	108	0.000000	Prob>ChiSq
Fitted	2	39.894765	0.9730

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	ChiSquare	Prob>ChiSq	Lower 95%	Upper 95%
Intercept[1]	-4.683344	0.8393557	31.13	<.0001	.	.
Intercept[2]	-2.0486093	0.4495441	20.77	<.0001	.	.
Concentración	0.0030982	0.0010415	8.85	0.0029	0.00126344	0.00516499
Fecha de colecta{01.01.93&01.01.91&01.01.99&01.01.98&01.01.77-0	1.42185437	0.500295	8.08	0.0045	0.4871196	2.47293129

Effect Wald Tests

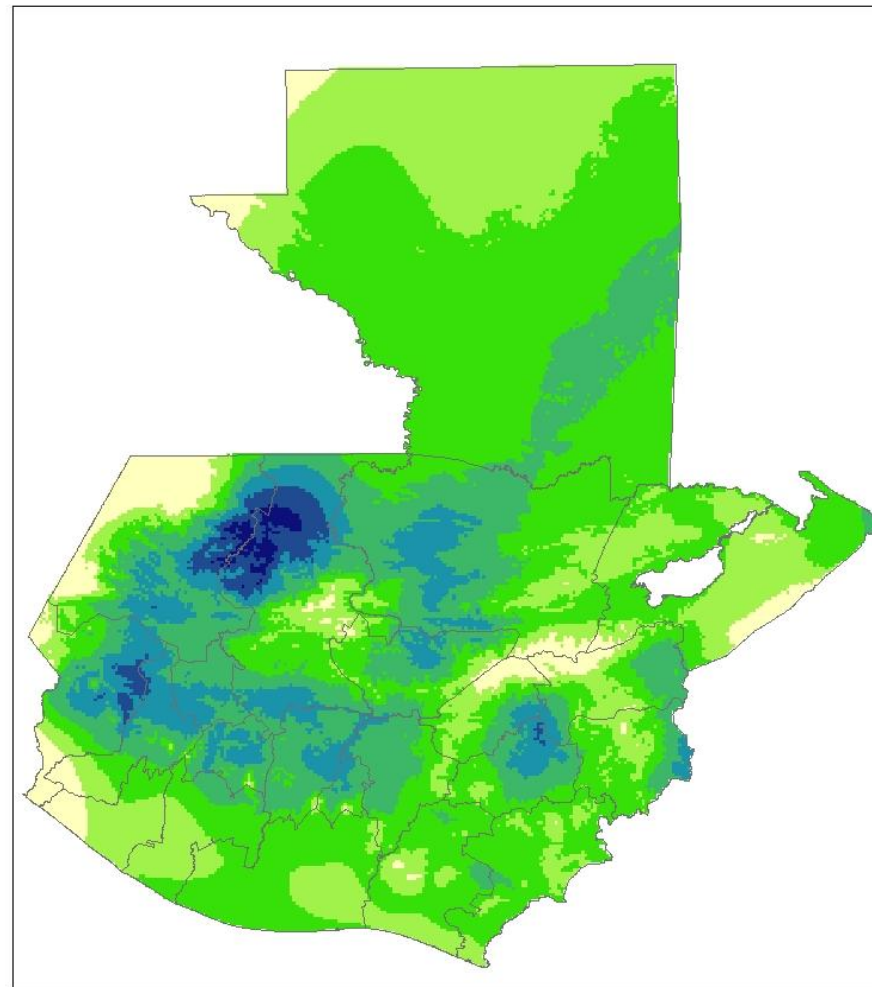
Source	Nparm	DF	Wald ChiSquare	Prob>ChiSq
Concentración	1	1	8.84987005	0.0029
Fecha de colecta{01.01.93&01.01.91&01.01.99&01.01.98&01.01.77-0	1	1	8.07714453	0.0045

Effect Likelihood Ratio Tests

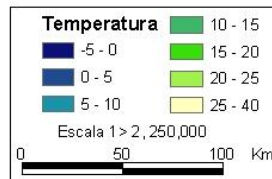
Source	Nparm	DF	L-R ChiSquare	Prob>ChiSq
Concentración	1	1	10.78945	0.0010
Fecha de colecta{01.01.93&01.01.91&01.01.99&01.01.98&01.01.77-0	1	1	9.25447706	0.0023

La regresión es significativa para la variable dependiente Amplificación y las independientes Concentración y fecha de colecta.

Apéndice 7. Mapa de paleoclima hace 24,000 a 12,000 años (Monzón no publicado)



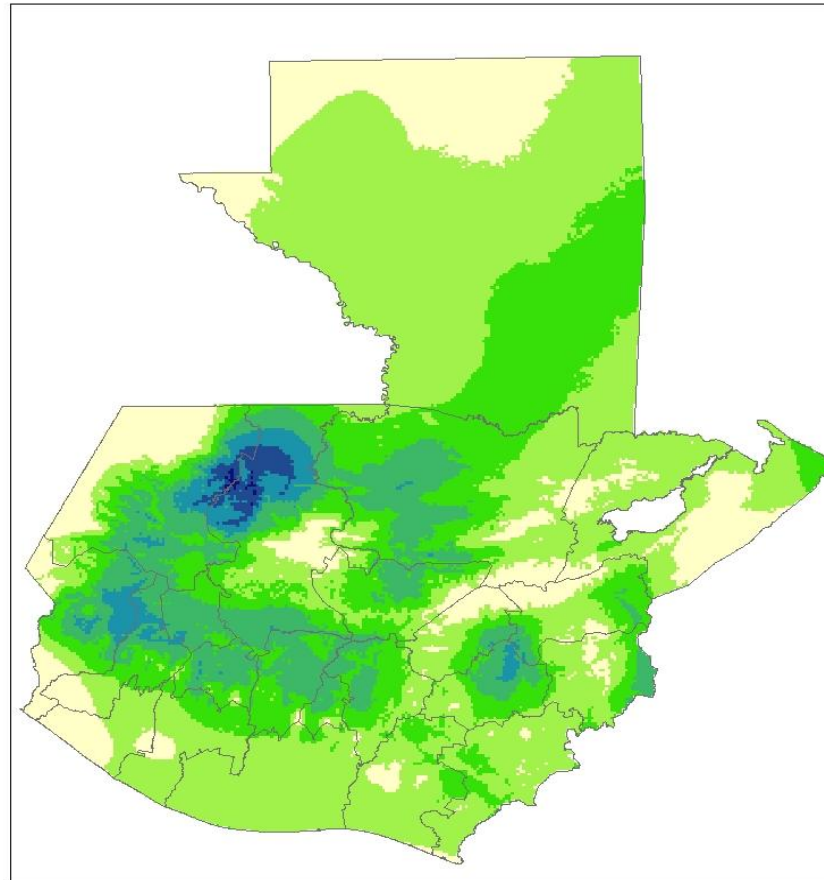
**Paleoclima STAGE 2
(24 a 12 kyr BP)**



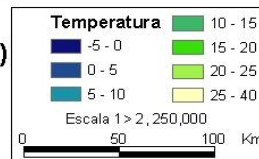
Universidad del Valle de Guatemala
Laboratorio Sistemas de
Información Geográfica

UTM Z15 Nad 1927
Elaborado por C. Monzón
Impreso Mayo 2003

Apéndice 8. Mapa de paleoclima hace 10,500 años (Monzón no publicado)



**Paleoclima STAGE 1
(luego de 10.5 kyr BP)**



Universidad del Valle de Guatemala
Laboratorio Sistemas de
Información Geográfica

UTM Z15 Nad 1927
Elaborado por C. Monzón
Impreso Mayo 2003

Apéndice 9. Mapa de distribución altitudinal potencial de *Ogyges* linaje sur.

