

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación en Biología Ambiental**

---

**Estructura genética y filogeografía de la hormiga  
*Myrmecocystus* sp. en las dunas costeras de la península de  
Baja California**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Le Roy Anthony Sankey Alamilla**

Ensenada, Baja California, México  
2024

Tesis defendida por  
**Le Roy Anthony Sankey Alamilla**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Fadia Sara Ceccarelli**  
Directora de tesis

**Dra. María Clara Arteaga Uribe**

**Dr. Mario González Escobar**



---

**Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Le Roy Anthony Sankey Alamilla** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biología Ambiental

**Estructura genética y filogeografía de la hormiga *Myrmecocystus* sp. en las dunas costeras de la península de Baja California**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Fadia Sara Ceccarelli  
**Directora de tesis**

En la filogeografía se estudian los procesos que rigen la distribución de los linajes. Por ejemplo, se pueden encontrar distribuciones discontinuas en organismos adaptados a vivir únicamente en dunas costeras. La península de Baja California cuenta con dunas costeras a lo largo de sus costas y la mayoría de ellas no han sido estudiadas en términos geomorfológicos. Existen estudios de la flora y fauna de algunas dunas costeras bajacalifornianas, pero carecen estudios profundizados sobre un grupo de suma importancia: los artrópodos terrestres, en particular las hormigas. En un estudio previo de la diversidad de hormigas de la península de Baja California, se encontraron especies sin describir restringidas a dunas costeras, una de ellas nombrada *Myrmecocystus* sp. BCA-2. Debido a que no se conoce bien la distribución total de esta especie, se recolectaron hormigas del género *Myrmecocystus* en siete dunas costeras del Pacífico bajacaliforniano, encontrando ejemplares en seis de ellas. Se utilizaron secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) para corroborar la identificación de los individuos recolectados en campo y mediante una filogenia Bayesiana determinamos en cuales dunas se encontraba la especie *Myrmecocystus* sp. BCA-2, siendo estas las cuatro más norteñas. Para los análisis genético-poblacionales y filogeográficos únicamente de *Myrmecocystus* sp. BCA-2, además del gen COI, se utilizaron secuencias de cinco marcadores nucleares para estimar el número de poblaciones con métodos Bayesianos, y para calcular diversos valores de diversidad y diferenciación genética. Además, se calcularon las edades de divergencia de cada población, tamaños efectivos poblacionales ( $N_e$ ) y el flujo génico actual e histórico. En las cuatro dunas costeras, existen 3 poblaciones, las cuales no presentaron flujo génico estadísticamente significativo. La primera población en divergir fue la de Punta Mazo y la que presentó un menor  $N_e$  fue la de Santa Rosalíta. Concluimos que *Myrmecocystus* sp. BCA-2 es endémicas de la península de Baja California, que sus poblaciones están aisladas una de otra y que siendo algunas poblaciones más antiguas que los ecosistemas dunares que habitan, lo más probable es que las hormigas existían en paleodunas y colonizaban los nuevos sistemas conforme se formaba el ecosistema.

**Palabras clave: Filogeografía, dunas costeras, hormigas, genética de poblaciones**

Abstract of the thesis presented by **Le Roy Anthony Sankey Alamilla** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation Environmental Biology.

**Genetic structure and phylogeography of the ant *Myrmecocystus* sp. in the coastal dunes of the Baja California peninsula**

Abstract approved by:

---

Dra. Fadia Sara Ceccarelli  
**Thesis Director**

In phylogeography, the processes that govern the distribution of lineages are studied. For example, discontinuous distributions can be found in organisms adapted to living only in coastal dunes. The Baja California peninsula has coastal dunes along its coasts and most of them have not been studied in geomorphological terms. There are studies of the flora and fauna of some Baja Californian coastal dunes, but there are no in-depth studies on a very important group: terrestrial arthropods, particularly ants. In a previous study of ant diversity in the Baja California peninsula, undescribed species restricted to coastal dunes were found, one of them named *Myrmecocystus* sp. BCA-2. Because the total distribution of this species is not well known, ants of the genus *Myrmecocystus* were collected in seven coastal dunes of the Pacific Baja California, finding specimens in six of them. Sequences of the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase subunit I (COI) were used to corroborate the identification of the individuals collected in the field and through a Bayesian phylogeny we determined in which dunes the species *Myrmecocystus* sp. BCA-2 was found, these being the four most northern. For population-genetic and phylogeographic analyzes only of *Myrmecocystus* sp. BCA-2, in addition to the COI gene, sequences of five nuclear markers were used to estimate the number of populations with Bayesian methods, and to calculate various values of genetic diversity and differentiation. In addition, the divergence ages of each population, effective population sizes ( $N_e$ ) and current and historical gene flow were calculated. In the four coastal dunes, there are 3 populations, which did not present statistically significant gene flow. The first population to diverge was that of Punta Mazo and the one that presented a lower  $N_e$  was that of Santa Rosalita. We conclude that *Myrmecocystus* sp. BCA-2 is endemic to the Baja California peninsula, its populations are isolated from each other and since some populations are older than the dune ecosystems they inhabit, it is most likely that the ants existed in paleodunes and colonized the new systems according to the ecosystem was formed.

**Keywords: Phylogeography, coastal dunes, ants, population genetics.**

## Dedicatoria

Con mucho amor y cariño, a mi compañera de vida Paulina Figueroa Hernández por siempre estar conmigo incondicionalmente y por mostrarme lo maravillosa que puede llegar a ser la vida, a mis guías intelectuales, mi tía la Dra. María del Rayo Sankey García y a la memoria de mi tío, el Dr. Adrián Sergio Gimete-Welsh Hernández y a mis padres, Adriana Alamilla Ochoa y Le Roy Anthony Sankey García.

*What we see changes what we know. What we know changes what we see.*

***J. Piaget (1896–1980)***

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado a través de la beca 1136996

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California y al Posgrado en Ciencias de la Vida por todo el apoyo económico, tanto para asistir a la VI Reunión Formicidae de México en Querétaro, como al primer Congreso de la DBEA y por la beca de manutención que me permitió finalizar mi escrito.

Al Departamento de Biología de la Conservación por aceptarme en el programa. A todo el personal dedicado a la investigación por guiarme hacia un crecimiento académico, profesional y personal. Al personal administrativo, que con mucho cariño y respeto siempre atienden todas nuestras necesidades académicas. Un especial agradecimiento a Adriana Mejía por siempre estar al pendiente de nosotros, siempre de una manera atenta y amable.

A la Dra. Sara Ceccarelli, a quien, con mucho cariño, respeto y admiro mucho, por haber sido fundamental en el desarrollo de este trabajo y siempre guiarme en todas mis dudas. Gracias por aceptarme como su alumno y permitirme continuar con mi línea de investigación que tanto me apasiona, las hormigas. Gracias por todo el enorme apoyo que me brindó, tanto económico (de sus propios fondos), como profesional y personal. Agradezco enormemente toda la paciencia y el buen trato hacia mi persona que recibí todo el tiempo que fungí como su alumno.

A mis sinodales, la Dra. María Clara Arteaga y al Dr. Mario González por su disposición al momento de resolver dudas, por su compromiso con este trabajo y por todos sus aportes al momento de realizar correcciones y observaciones.

Al Dr. Andrés Martínez Aquino (UABC) por quien siento un profundo respeto, por haberme compartido su invaluable conocimiento sobre evolución, además de todo el apoyo brindado a lo largo del desarrollo del presente trabajo y haberme aceptado como un alumno más.

Al Oc. Eulogio López Reyes por haberme aguantado durante varios días en campo, además de todas esas pláticas interesantes que me motivaban a ser una mejor persona, en general, en general le agradezco todo el apoyo principalmente en campo, tanto con la logística como en el trabajo de colecta de individuos. Su compromiso con los estudiantes es admirable.

A toda mi familia por su enorme apoyo: a mi tía la Dra. María del Rayo Sankey por su inmenso apoyo a lo largo de mi vida, sin ella simplemente yo no estaría aquí; a mis padres Le Roy Anthony Sankey García y Adriana Alamilla Ochoa por apoyarme y enseñarme a ser mejor persona cada día y a mis hermanos, con quienes siempre cuento en las buenas y en las malas.

A mi colega, compañero y muy buen amigo M.C. Samuel Antonio Hernández Jiménez por ser una persona auténtica y sincera, con quien compartí la mayoría de los momentos vividos en CICESE y de quien aprendí mucho sobre su mayor pasión, la biología.

A la M.C. Dariana Guerrero por sus enseñanzas y apoyo en el laboratorio de Genética de la Conservación.

A la M.C. Khutzy Ketzaly Munguía quien con mucho cariño me enseñó a trabajar en el Museo de Artrópodos de Baja California además de aportar con comentarios y correcciones a lo largo del presente trabajo.

A la Bioing. Alejandra Santana por su invaluable apoyo y compromiso en la extracción de ADN y posteriores PCR de las hormigas colectadas en las dunas costeras.

Al M. C. Luis Carlos Hernández por haberme compartido parte de su experiencia y conocimientos en distintos aspectos académicos, tanto en bioinformática como en diseños de presentación.

Agradezco a aquellos que apoyaron en la colecta de campo: Al Biol. Arturo Sandoval por su captura de ejemplares importantes para este trabajo y sus valiosas fotografías, así como al Oc. Edgar Lima por el apoyo en campo, tanto colectando ejemplares como tomando valiosas fotografías. A mi estimada y querida amiga Paulina “Pajarita” Anguiano por haberme llevado en su propio vehículo a buscar hormigas y apoyado en la búsqueda de ejemplares en Ensenada.

A la Dra. Natalia Rodríguez Revelo y al Dr. Óscar Jiménez Osorio por haberme hecho incursionar en el tema de las dunas costeras y mostrarme la enorme importancia de estos ecosistemas.

Al Dr. Michael Wall (quien antes pertenecía al Museo de Historia Natural de San Diego) por todos sus consejos sobre el trabajo de artrópodos en dunas costeras y por haberme invitado a una serie de excursiones a las dunas costeras de Baja California.

# Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas .....	x
Glosario.....	xi
<b>Capítulo 1.      Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1    Antecedentes .....	5
1.1.1    Estudios de <i>Myrmecocystus</i> en Baja California .....	5
1.1.2    Estudios previos de estructura genética en hormigas de dunas costeras .....	5
1.2    Justificación .....	6
1.3    Hipótesis.....	7
1.4    Objetivos .....	7
1.4.1    Objetivo general .....	7
1.4.2    Objetivos específicos.....	7
<b>Capítulo 2.      Metodología .....</b>	<b>9</b>
2.1    Trabajo de campo.....	9
2.2    Análisis en laboratorio.....	10
2.2.1    Identificación morfológica.....	10
2.2.2    Procedimiento de análisis genético .....	11
2.3    Análisis de datos.....	13

2.3.1	Identificación molecular .....	14
2.3.2	Límites geográficos de la hormiga <i>Myrmecocystus</i> sp. BCA-2 .....	14
2.3.3	Análisis filogeográfico.....	15
2.3.4	Tiempos de divergencia .....	16
<b>Capítulo 3. Resultados.....</b>		<b>17</b>
3.1	Trabajo de campo e identificación .....	17
3.2	Límites geográficos de la hormiga <i>Myrmecocystus</i> sp. BCA.2 .....	18
3.3	Análisis genético-poblacionales y filogeográficos.....	19
3.4	Edades de divergencia entre las poblaciones de <i>Myrmecocystus</i> sp. BCA-2.....	26
<b>Capítulo 4. Discusión .....</b>		<b>28</b>
4.1	Identificación taxonómica y límites geográficos .....	28
4.2	Genética de poblaciones y filogeografía .....	30
4.3	Edades de divergencia.....	32
4.4	Consideraciones finales.....	33
4.5	Perspectivas a futuro.....	33
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>		<b>35</b>
<b>Literatura citada .....</b>		<b>36</b>
<b>Anexos .....</b>		<b>45</b>

## Lista de figuras

Página

Figura 1. Mapa del área de estudio. Dunas costeras de la Península de Baja California con costa en el Océano Pacífico. ....	9
Figura 2. Reconstrucción filogenética Bayesiana de individuos colectados en dunas costeras de la PBC del género <i>Myrmecocystus</i> a partir del análisis del gen mitocondrial COI. ....	18
Figura 3. Mapas de la distribución de los diferentes haplotipos con sus respectivas redes. ....	23
Figura 4. Delta K. Gráfico del análisis de aproximación del número de poblaciones inferidas por las iteraciones en Structure. ....	24
Figura 5. Gráfico de barras. Las líneas verticales (individuos) representan con colores la probabilidad en la que cada individuo pertenece a cada K inferida por Structure (K= 3).....	24
Figura 6. Una representación de un modelo estimado de aislamiento con migración generado por IMA3 y el programa IMfig (Hey et al., 2018).....	26
Figura 7. Curvas de acumulación de haplotipos calculadas con diferentes paqueterías de R y para cada marcador molecular. ....	47
Figura 8. Propuesta sintética de las ecorregiones de Baja California, obtenido de González et al, (2010). ....	48
Figura 9. Principales zonas de discrepancia en las regionalizaciones biológicas de la península de Baja California: a) Transición región mediterránea a desértica, b) Sub-regionalización mediterránea, c) grandes islas del Pacífico Norte, d) Transición de los desiertos costeros del Golfo de California, e) Transición del centro peninsular, f) Singularidad de la Sierra de la Giganta y g) Transición región tropical desértica.....	48
Figura 10. Imágenes de <i>Myrmecocystus</i> sp. BCA-2 tomadas con una cámara marca Nikon® modelo "SMZ 745T" montada en un microscopio estereoscópico y con el software INFINITY CAPTURE 6.3.2. A) .....	49
Figura 11. Vista de perfil de la hormiga <i>Myrmecocystus</i> sp. BCA-2.....	49
Figura 12. Fotografías de <i>Myrmecocystus</i> sp. BCA-2 tomadas en campo por el Biólogo Arturo Sandoval (UABC). A) Obreras fuera del hormiguero. B) Obrera cargando una larva. C) Reina sin alas capturada durante una excavación de nido.....	50

## Lista de tablas

Página

Tabla 1. Resumen de colecta de hormigas del género <i>Myrmecocystus</i> capturadas en las dunas costeras del Pacífico bajacaliforniano. ....	10
Tabla 2. Cebadores nucleares utilizados para análisis genético-poblacionales de <i>Myrmecocystus</i> sp. BCA-2.....	12
Tabla 3. Información del tamaño y número de secuencias de ADN de <i>Myrmecocystus</i> sp. usados para inferencia filogeográfica y análisis genético–poblacionales. ....	19
Tabla 4. Análisis de polimorfismos en 5 marcadores nucleares y en el gen COI mitocondrial, número de sitios variables (S), haplotipos por cada marcador molecular (H), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), diversidad haplotípica (Hd) y el índice de fijación global ( $F_{ST}$ ) de los marcadores moleculares utilizados en <i>M.</i> sp. BCA-2 obtenidas en DnaSP.....	20
Tabla 5. Distancia entre sitios y Valores de $F_{ST}$ pareados entre los distintos sitios de estudio y para cada marcador molecular. ....	25
Tabla 6. Cebadores basados en Ströher (2013) probados en <i>Myrmecocystus</i> sp. BCA-2.....	45

## Glosario

**Alelo:** Un alelo es cada una de las dos o más variantes de un gen. Un individuo diploide hereda dos alelos para cada gen, uno del padre y el otro de la madre. Los alelos se encuentran en la misma posición dentro de los cromosomas homólogos. Si los dos alelos son idénticos, el individuo es homocigoto para este gen.

**Aridificación:** El cambio gradual de una región de un clima más húmedo a uno más seco.

**Biogeografía:** Ciencia, rama de la geografía general que estudia la distribución de los seres vivos (fenómenos biológicos) sobre la superficie terrestre, las causas de dicha distribución, las relaciones locales de los seres vivos entre sí y con su ambiente, y su evolución en el tiempo.

**Casta:** Miembros de una determinada especie que cumplen diferentes funciones dentro de la comunidad.

**Cebadores:** Una secuencia corta de oligonucleótidos que se utiliza en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la creación de moléculas más largas de ADN.

**Cuello de botella:** Drástico descenso en el número de miembros de una población.

**Divergencia:** dos o más organismos con un antepasado común cambian algunos de sus rasgos comunes según transcurren las generaciones.

**Ecorregiones:** Unidades geográficas con flora, fauna y ecosistemas característicos.

**Endémico:** Las especies endémicas son aquellas que sólo habitan en un lugar determinado. Sin embargo, el término es relativo porque una especie puede ser endémica de un continente, un país, una región, un bioma (comunidad de organismos que ocupan un área muy amplia) o de una localidad de unas cuantas hectáreas.

**Especialista:** Corresponde a aquellas que se alimentan de una sola especie o unas pocas, en un estrecho rango de condiciones ambientales, con lo que su nicho potencial es de tamaño pequeño.

**Especies crípticas:** Especies poco diferenciadas en su morfología o comportamiento, difíciles de distinguir entre sí, pero reproductivamente aisladas.

**Exones:** Secuencia codificante de ADN. El exón es la región de un gen que no se separa durante el proceso de splicing (corte y empalme) manteniéndose en el ARN mensajero.

**Filogenética:** Ciencia de construir y evaluar hipótesis acerca de los patrones históricos de descendencia en forma de árboles evolutivos.

**Genoma:** El genoma es la secuencia total de ADN que posee un organismo en particular.

**Genotipos:** Constitución genética de un organismo o célula; se refiere también al grupo específico de alelos heredados en un locus.

**Grupo monofilético:** Un grupo es monofilético si todos los organismos incluidos en él han evolucionado a partir de una población ancestral común, y todos los descendientes de ese ancestro están incluidos en el grupo.

**Haploide:** La mitad del número diploide o normal de cromosomas en una célula somática. Coincide con el número de cromosomas en un gameto (óvulo o espermatozoide), que son 23 en el ser humano; un cromosoma de cada par.

**Haplotipos:** Conjunto de alelos contenidos en un locus (o en varios loci) de una misma dotación haploide. El haplotipo podemos referirlo a un solo locus o a un genoma completo, pero siempre se refiere a uno de los dos alelos de cada gen.

**Interglaciación:** Que está comprendido entre dos glaciaciones consecutivas.

**Intrones:** Secuencia no codificante de ADN que se transcribe a ARN mensajero (ARNm) en su estado inmaduro, pero es escindida del mismo al transformarse en ARNm maduro antes de la traducción.

**Linaje:** Un linaje evolutivo es una secuencia de especies que forman una línea directa de descendencia, siendo cada nueva especie el resultado directo de la evolución desde una especie ancestral inmediata.

**Morfometría:** Estudio de la covariación de la forma con factores subyacentes.

**Mutualismo:** Consiste en una interacción entre dos individuos de la misma especie o de especies diferentes que resulta beneficiosa para ambos.

**Nativas:** Especie que se encuentra dentro de su área de distribución natural u original (histórica o actual) de acuerdo con su potencial de dispersión natural.

**Necuazcatl:** Del Náhuatl, "*Hormiga de miel*".

**Paleoduna:** Son formas de acumulación de los granos de arena y de gránulos de limos, sedimentados por la disminución de la velocidad del viento que transportaba los materiales detríticos (arenas y limos), proceso de transporte y deposición eólica (masas de aire como agente de transporte) inexistente en la actualidad y que conformaba, unas acumulaciones de sedimentos areno-limosos, constituidas por una cresta principal y dos flancos o pendientes bien definidas a ambos lados de esta.

**Polimórfico:** La existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un locus determinado.

**Prístinos:** Que se mantiene inalterado, puro, tal como era en su forma primera u original.

**Provincia fisiográfica:** Una provincia fisiográfica es una región geográfica con una geomorfología característica y, a menudo, un tipo específico de roca del subsuelo o elementos estructurales.

**Recombinación:** Intercambio de un segmento de ADN entre dos cromosomas homólogos durante la meiosis (aunque en algunas ocasiones se puede dar en mitosis), cuyo resultado es una combinación nueva de material genético en el gameto.

**Regresión marina:** Retracción marina es la retirada duradera del mar de una zona anteriormente sumergida.

**SNPs:** Variación en la secuencia del ADN (con respecto a una secuencia consenso) que afecta a una única base (A,T,G,C) en posiciones concretas del genoma (1 cada 1000 bases en promedio), y que se observa en la población con una frecuencia de al menos 1%.

**Terrazas marinas:** Accidente geográfico que consiste en una plataforma que ha sido expuesta como resultado de la combinación de dos fenómenos: variaciones del nivel del mar y cambios tectónicos de alzamiento y subsidencia a lo largo de la costa.

**Topología filogenética:** Forma en que se ramifica un árbol.

**Transgresión marina:** Evento geológico por el cual el mar ocupa un terreno continental, desplazándose la línea costera tierra adentro.

## Capítulo 1. Introducción

---

La filogeografía es una rama de la biogeografía en la que se estudian los procesos de diversificación en los distintos linajes intraespecíficos, contemplando los eventos geológicos y climáticos en la distribución actual de las especies (Avice, 2000). El objetivo de quienes llevan a cabo estudios de filogeografía, de acuerdo con Arbeláez (2012) es el de comprender los procesos y patrones de diversificación de los linajes intraespecíficos en el tiempo y en el espacio. Los estudios filogeográficos se basan en el análisis de diferentes secuencias de ADN de diferentes individuos de una misma especie, al comparar estas secuencias entre poblaciones con diferente distribución, se puede construir la historia de la especie en un contexto geográfico (Avice et al, 1987). Las secuencias de ADN son uno de los numerosos tipos de marcadores moleculares que existen.

Los marcadores moleculares pueden ser regiones del genoma (ya sea ADN nuclear o mitocondrial) de algún individuo, son muy vastos y con muchas aplicaciones que dependen del objetivo del trabajo. Existen marcadores moleculares con la capacidad de conservar información a través de las generaciones, los cuales resultan útiles en estudios filogenéticos y filogeográficos. Un ejemplo es el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I, el cual presenta un nivel de variación asociado a la acumulación de mutaciones adecuado para estudios de poblaciones (Avice et al, 1987; Grover y Sharma, 2016). Dicho marcador es ampliamente utilizado en estudios filogenéticos y genealógicos debido a su elevada tasa mutacional, herencia casi siempre matrilineal (con excepción de algunas plantas) y a la ausencia de recombinación (Avice 1986, 1994; Ballard y Whitlock, 2004; Cardoso et al, 2011) como sucede con el ADN nuclear. Algunos autores como Kawakami y colaboradores (2007) recomiendan combinar genes nucleares y mitocondriales para inferencias filogenéticas y genealógicas más confiables. A pesar de las recomendaciones de combinar datos mitocondriales con nucleares, el gen COI ha sido ampliamente utilizado para identificar y delimitar especies de animales incluyendo hormigas (Ng'endo et al, 2013; Ojha et al, 2014; Chen y Zhou, 2017; Siddiqui et al, 2019; Serracanta, 2022). Actualmente, también se utilizan datos genómicos como SNPs (polimorfismos de nucleótido único) que son marcadores distribuidos por todo el genoma y se aplican en estudios genético-poblacionales y de filogeografía (Peterson et al, 2012).

Una de las mayores ventajas de la filogeografía es la de poder visualizar patrones y procesos que explican el origen de la diversidad en zonas de alta riqueza de especies, un ejemplo de esto serían los diferentes estudios de la región Neotropical (Solomon et al., 2008; Carnaval et al., 2009). Otra aplicación de la filogeografía es el análisis genético de las poblaciones que habitan ecosistemas aislados (o muy separados

entre sí) debido a que se puede evaluar si existe un flujo genético entre estas poblaciones o bien, si están totalmente aisladas, explicar hace cuánto ocurrió este fenómeno (Hedrick, 2009). Un ejemplo idóneo de ecosistemas aislados son las dunas costeras de la península de Baja California.

La península de Baja California se formó a partir de una serie de eventos geológicos, sin embargo, son dos los eventos que más destacan (Stock y Hodges, 1989); El primero fue la extensión del protogolfo (de California) el cual ocurrió en el Mioceno, hace aproximadamente 12 millones de años (Moore y Buffington, 1968) y el segundo fue el desarrollo del límite de la placa del Pacífico Norteamericano, evento el cual inició durante el Plioceno hace aproximadamente 5 millones de años y continúa hasta hoy en día (Larson et al., 1968). Referente a los eventos climáticas históricas de la península de Baja California, la que más destaca es la glaciación del Cuaternario, la cual inició hace 2.58 millones de años y que se extiende hasta la actualidad (Gradstein, 2004). Dentro de este periodo, en el planeta hubo una serie de procesos glaciares e interglaciares en las cuales el nivel del mar retrocedía en el punto más frío de la glaciación y avanzaba tierra adentro en los interglaciares más cálidos (Penck y Bruckner 1909; Walker y Thompson, 1968, Rockwell et al, 1989; Muhs et al, 1992). Lo anterior conduce al inevitable desplazamiento de los ecosistemas que dependen de la línea de costa, como las dunas costeras.

Las dunas costeras son ecosistemas altamente dinámicos debido a las condiciones climáticas extremas, incluso las condiciones meteorológicas pueden cambiar repentinamente a lo largo del día, lo que demanda un alto grado de adaptación por parte de las especies que las habitan (Pedroza et al, 2013). De acuerdo con Maun (2009), estos ecosistemas consisten en un sistema de montículos de arena (o arena con arcilla) que fue transportada y depositada en ese sitio por medio de la acción conjunta del mar (al erosionar rocas y transportar sedimento) y del viento (al transportarlo en la atmósfera y depositarlo en la duna). Cuentan con un alto número de organismos especialistas y endémicos, además, son las encargadas de proteger contra la erosión marina a los ecosistemas tierra adentro (Martínez y Psuty, 2004). Martínez (2009) menciona que durante el periodo cámbrico (hace 500 millones de años) pudieron haber existido dunas costeras, pero los registros geológicos más confiables datan del terciario temprano (hace 65 millones de años). Las dunas costeras que existen hoy en día se formaron durante el pleistoceno tardío y el holoceno, distribuidas a lo largo de las distintas franjas costeras y con tamaños muy variables que dependen principalmente de las condiciones climáticas y de las características geológicas de la región (Martínez y Vázquez, 2009).

En Baja California, las dunas costeras se encuentran distribuidas discontinuamente a lo largo de toda la costa, tanto del lado del Pacífico como del Golfo de California, algunas están muy separadas entre sí (más

de 50km) mientras que algunas se encuentran muy cerca una de otra (menos de 5 km). En tamaño, también son muy variables, por ejemplo, las dunas costeras de Guerrero Negro son consideradas las más grandes de México con una extensión de 8,000 km<sup>2</sup> (Inman et al, 1966), mientras que las dunas costeras de Santa Rosalita son pequeños manchones dispersos de aproximadamente 2 km<sup>2</sup>. En 2017, Peterson y colaboradores realizaron una datación de las dunas costeras más grandes de la península, Guerrero Negro y Bahía Magdalena. En esta datación encontraron que los núcleos más antiguos de Guerrero Negro databan de hace 99.8 ± 9.4 miles de años, mientras que los de Bahía Magdalena databan de hace 72.5 ± 18.6 miles de años. Sin embargo, el sistema de dunas costeras actual de Guerrero Negro se estima que tan solo tiene 1,800 años (Inman et al, 1966).

Debido a las condiciones tan dinámicas de las dunas costeras, se forma un hábitat único y peculiar para plantas y animales que no podrían habitar el ecosistema que les rodea, por lo que las dunas costeras son consideradas “Islas biogeográficas” (MacArthur y Wilson, 1963; Garrido-Pérez, 2020). Para evaluar si el aislamiento geográfico afecta a los organismos especializados a vivir en este hábitat, se pueden realizar análisis filogeográficos a especies con capacidad reducida de dispersión, como lo son los artrópodos de suelo.

Jiménez y colaboradores (2015) afirman que el orden de artrópodos más abundante en dunas costeras es Hymenoptera (hormigas, abejas y avispas), seguido de Lepidóptera (mariposas). Dentro de los artrópodos de suelo de las dunas costeras, las hormigas (Hymenoptera: Formicidae) son los artrópodos de suelo que mayor presencia tienen en este tipo de ecosistemas. Cuentan con importantes interacciones con plantas y otros artrópodos (Martínez, 2009; Chen et al, 2015; Jiménez *et al*, 2015), lo que las vuelve un organismo sumamente importante en este tipo de ecosistemas. Además, son las que poseen una menor capacidad de dispersión debido a que no todos los individuos de una colonia tienen la capacidad de volar.

Las hormigas (Hymenóptera: Formicidae) son insectos con una alta organización social y con una diversidad que, hasta 2023, alcanza las 16 mil especies, de acuerdo con lo publicado por AntWeb (2023). Son sumamente importantes para la mayoría de los ecosistemas terrestres debido a la gran cantidad de servicios ecosistémicos que llevan a cabo, como lo son la dispersión de semillas, el control de plagas, la remoción de materia orgánica, la ventilación del suelo, las relaciones mutualistas con otras especies tanto vegetales como animales, entre otras (Noss, 1990; Bonte et al, 2003; Cautle et al, 2005).

Existen hormigas con adaptaciones especiales para habitar zonas áridas, como lo es la península de Baja California (Johnson y Ward, 2002), estas hormigas han evolucionado a partir de la aridificación de diversas

regiones donde habitaban, como es el caso del género *Myrmecocystus* (van Elst et al, 2021). El género de hormigas *Myrmecocystus* Wesmael 1838 actualmente cuenta con 29 especies registradas (16 nativas de Baja California) y se distribuye ampliamente en Norteamérica, con un mayor número de especies nativas en el Norte de México y Sur de Estados Unidos (Guenard et al, 2017). Las especies de este género están presentes en una variedad de hábitats, sin embargo, se reporta una mayor concentración en zonas áridas con suelo preferentemente muy sólido, esto para evitar derrumbes y proteger los almacenes de alimento (Snelling, 1976, 1982; Guenard et al, 2017). La mayor diversificación del género de hormigas *Myrmecocystus* ocurrió en el periodo de aridificación del suroeste de Estados Unidos y norte de México que inició lentamente desde el Mioceno, hace 14.08 millones de años (Ma) (Snelling 1976; van Elst et al, 2021).

Snelling (1976) dividió al género en tres subgéneros llamados *Myrmecocystus*, *Eremnocystus* y *Endiodioctes*. Las hormigas del subgénero *Myrmecocystus* se caracterizan por ser especies estrictamente nocturnas y de colores claros, las del subgénero *Eremnocystus* por poseer especies mayormente pequeñas, de colores uniformemente oscuros. Por último, las hormigas del subgénero *Endiodioctes* son especies con cabeza y tórax de tipo ferruginosos y con gáster más oscuros. Snelling (1976) explicó que las subdivisiones entre estos subgéneros se dieron por los hábitos nocturnos versus los hábitats diurnos, de esta manera diferentes especies surgieron a partir de estos diferentes hábitos.

La especie más ampliamente estudiada de este género es *Myrmecocystus mexicanus*, debido a que es la hormiga mielera más conocida entre las culturas nativas de las regiones donde habitan (conocida como *Necuazcatl*, en náhuatl) y, por lo tanto, la más explotada y consumida (Snelling, 1972). Los fluidos dulces almacenados provienen principalmente del néctar de algunas plantas angiospermas, exudados de agallas y secreciones de pulgones y otros hemípteros (Snelling, 1976).

En 2002, Johnson y Ward detectaron la presencia de dos especies no descritas de *Myrmecocystus* en Baja California, las cuales llamaron momentáneamente como *Myrmecocystus* sp. BCA-1 y *Myrmecocystus* sp. BCA-2. Posteriormente, Kronauer y colaboradores (2004) realizaron una filogenia de todo el género basándose en el gen COII mitocondrial y en el tRNA nuclear, aquí encontraron que efectivamente esas dos especies son nuevas y diferentes entre sí, además, destacan algo muy importante al mencionar que la hormiga llamada *M. sp. BCA-2* se le encontró en dunas costeras, para ser preciso, se encontró en las dunas costeras ubicadas al norte de Guerrero Negro, lo que podría indicar que esta hormiga, al no aparecer en otros ecosistemas dentro de los muestreos realizados, podría tratarse de una especialista de dunas costeras.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Estudios de *Myrmecocystus* en Baja California

Johnson y Ward (2002) realizaron una investigación para determinar la distribución y el endemismo de las hormigas de Baja California, este trabajo fue llevado a cabo mediante el uso de diversas colecciones de museo y por caracteres morfológicos, representa el primer gran estudio de hormigas de la península. En su trabajo mencionan que existen al menos 4 especies de *Myrmecocystus* aún sin describir y que son aparentemente endémicas de Baja California (*M. sp. cf. flaviceps* ; *M. sp. cf. mendax* , *M. sp. BCA-1* , *M. sp. BCA-2* ). Kronauer y colaboradores (2004) realizaron una filogenia utilizando ADN mitocondrial del género *Myrmecocystus* y reportaron la presencia de las especies *M. sp. BCA-1* y *M. sp. BCA-2*, esta última ubicada al Norte de Guerrero Negro, Baja California Sur, donde el ecosistema predominante es de dunas costeras, En el trabajo realizado por Kronauer y colaboradores (2004), se observa que *M. sp. BCA-1* y *M. sp. BCA-2* forman un grupo monofilético con la hormiga *M. wheeleri*, lo que sugiere que estas hormigas sin describir pertenecen a la subfamilia *Endiodioctes* al igual que *M. wheeleri*.

En 2021, van Elst y colaboradores realizaron la primera filogenia completa del género *Myrmecocystus* mediante el uso de marcadores moleculares UCE (Elementos Ultraconservados en español), en el cual encontraron la presencia de especies crípticas, describieron el proceso de diversificación durante la aridificación del suroeste de Estados Unidos hace unos 14 millones de años y develaron que el proceso temprano de búsqueda de alimento pudo haber sido mediante hábitos nocturnos, adaptación que sería consistente al habitar en zonas tan áridas, sin embargo, aquí no se incluyeron las especies sin describir *M. sp. BCA-1* y *M. sp. BCA-2*.

### 1.1.2 Estudios previos de estructura genética en hormigas de dunas costeras

Cardoso y colaboradores (2014, 2015) realizaron un estudio filogenético de la hormiga (Hymenoptera: Formicidae) *Mycetophylax simplex* la cual es endémica de las dunas costeras del este de Brasil. En este estudio se reconoce la importancia de las glaciaciones en la distribución de especies con preferencias por hábitats no boscosos. Se utilizó el gen mitocondrial COI y el gen nuclear *Wingless* para evaluar la estructura genética de la especie en toda su distribución conocida, sugiriendo que la especie sufrió cambios de expansión y contracción opuestos a las especies de hábitats boscosos durante las diferentes glaciaciones.

También encontraron una estructura filogeográfica superficial con un aislamiento por distancia. La estructura genética de la población marca una clara distinción entre poblaciones norteñas y sureñas. En este estudio los autores demostraron la importancia del nivel medio del mar en la expansión demográfica de estas hormigas de dunas costeras, argumentando que pudieron haber vivido interconectadas durante las expansiones costeras del cuaternario, cuando descendió el nivel del mar.

En diversos estudios donde se analiza la estructura genética de hormigas se utilizan diferentes marcadores moleculares, sin embargo, cabe mencionar que para análisis filogeográficos el marcador mitocondrial más utilizado es el Citocromo c Oxidasa Subunidad I (COI), este marcador es muy útil para la identificación de especies a nivel molecular, pertenece al gran proyecto que tiene como objetivo registrar toda la vida del mundo llamado “Código de barras de la vida” (*Barcode of Life, BOL*) propuesto por Hebert y colaboradores (2003) y Savolainen y colaboradores (2005) pero también se suelen utilizar otros marcadores mitocondriales como lo es el CytB y COII. Al agregar datos nucleares, los resultados pueden ser más robustos. Dentro de los marcadores nucleares, los más ampliamente utilizados en estudios de hormigas son Wingless, Lw Rh y tRNLeu (Kronauer et al, 2004; Shoemaker et al, 2006; Mehdiabadi et al, 2012; Schmidt, 2013; Cardoso et al, 2014, 2015).

En 2013, Ströher y colaboradores propusieron el uso de marcadores moleculares basados en las regiones intrónicas del ADN para estudios filogeográficos de hormigas, a estos marcadores se les denomina “EPIC markers” (Exon Primed Intron Crossing) los cuales utilizan una región exónica para ser cebada y la región intrónica para ser secuenciada (Lessa 1992; Slade et al. 1993; Palumbi, 1996). Las regiones intrónicas que se flanquean desde los exones son regiones con una alta tasa de acumulación de mutaciones, mucho más que las regiones transcritas (Graur y Li, 2000). Ströher y colaboradores (2013) evaluaron distintos marcadores EPIC en hormigas genéticamente muy distantes entre ellas y demostraron su aplicabilidad a diferentes taxones, asegurando que son aptos para realizar estudios de genética de poblaciones y filogeografía. Hasta la fecha sólo se ha publicado un trabajo relacionado con este tipo de marcadores en hormigas, sin embargo, se utilizó un solo marcador EPIC para evaluar su fiabilidad en las inferencias filogenéticas (Oliveira et al, 2017), más no en los análisis de genética poblacional.

## 1.2 Justificación

Las dunas costeras son ecosistemas importantes por albergar un gran número de especies endémicas y altamente especializadas (Maun, 2009; Pedroza, 2013). Lamentablemente, también son altamente frágiles

a los disturbios antropogénicos, por lo que son hábitats propensos a degradarse con mucha facilidad. Por esta razón, impera realizar estudios ecológicos y evolutivos sobre poblaciones de flora y fauna que las habitan, con el fin de evaluar los niveles de diversidad genética y de flujo génico entre poblaciones en diferentes dunas. En este sentido, las hormigas representan un buen objeto de estudio al ser abundantes en ese tipo de ecosistemas y por su papel ecológico en los servicios ecosistémicos que brindan. Dado que las hormigas *Myrmecocystus sp.* BCA-2 se han encontrado sólo en dunas costeras del Pacífico Bajacaliforniano, se esperaría que la estructura genética se encuentre relacionada con esta distribución discontinua, lo que sugiere que cada duna costera albergaría una sola población y que existe también un reducido flujo genético entre poblaciones. Por último, se espera que el origen de esta especie se encuentre relacionado con la formación de las dunas costeras.

### 1.3 Hipótesis

Dado que las hormigas *Myrmecocystus sp.* BCA-2 se han encontrado sólo en dunas costeras del Pacífico bajacaliforniano, se esperaría que la estructura genética se encuentre relacionada con esta distribución discontinua, lo que sugiere que cada duna costera albergaría a una sola población y que existe también un reducido flujo genético entre poblaciones. Por último, se espera que la divergencia de cada población se encuentre relacionada temporalmente con la formación de cada duna costera respectiva durante el holoceno.

### 1.4 Objetivos

#### 1.4.1 Objetivo general

Evaluar la estructura genética de las poblaciones de *Myrmecocystus sp.* BCA-2 en las dunas costeras de Baja California y relacionar su historia demográfica con eventos geo-climáticos del pasado.

#### 1.4.2 Objetivos específicos

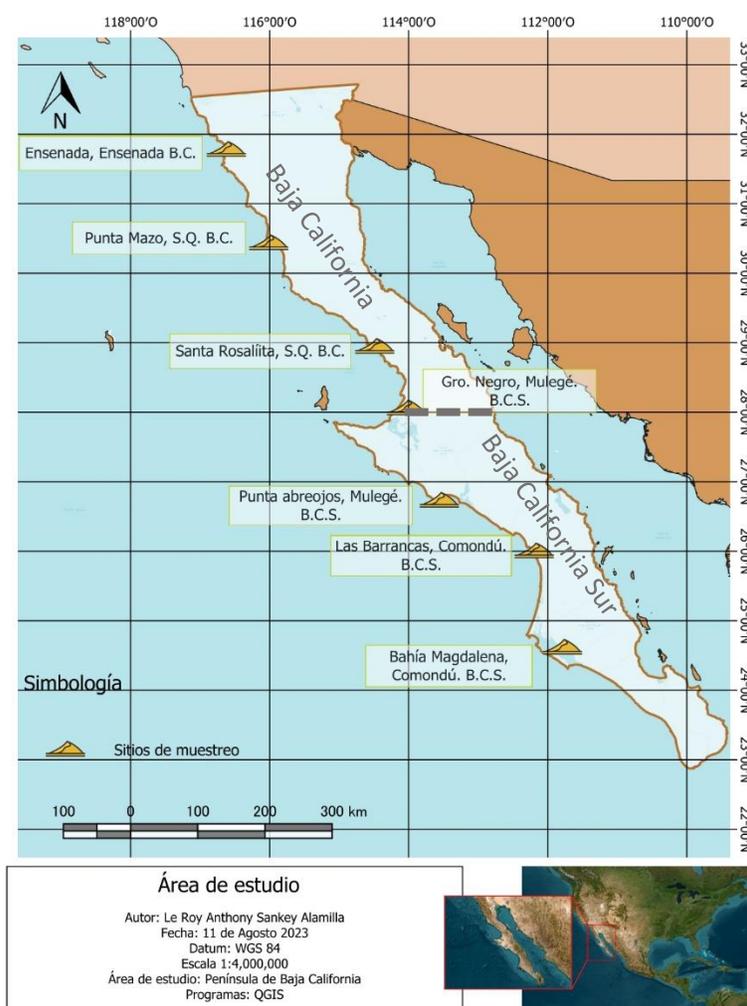
1. Determinar los límites geográficos de la especie *Myrmecocystus sp.* BCA-2 en la península de Baja California, mediante el marcador molecular mitocondrial Citocromo Oxidasa I.

2. Determinar el número de poblaciones de *Myrmecocystus sp.* BCA-2 en dunas costeras de Baja California utilizando COI y marcadores nucleares.
3. Medir la estructura poblacional y el flujo génico actual e histórico de *Myrmecocystus sp.* BCA-2 en dunas costeras.
4. Estimar edades de divergencia poblacional y procesos demográficos para relacionar la estructura poblacional y el flujo génico actual e histórico de *Myrmecocystus sp.* BCA-2 en dunas costeras con eventos geo-climáticos del pasado, en particular relacionados con la formación del ecosistema de las dunas costeras.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Trabajo de campo

Se seleccionaron siete dunas costeras del Pacífico bajacaliforniano. De acuerdo con Morrone (2019) estas dunas se encuentran en la provincia fisiográfica de la Planicie costera de Baja California. Las provincias biogeográficas reconocidas en México (Morrone et al, 2017) indican que las dunas costeras estudiadas se encuentran principalmente en la Provincia de Baja California, a excepción de la duna costera de Punta Mazo, las cuales se encuentran en la Provincia Californiana.



**Figura 1.** Mapa del área de estudio. Dunas costeras de la Península de Baja California con costa en el Océano Pacífico.

Se realizó un muestreo directo de las poblaciones de hormigas *Myrmecocystus sp.* en las dunas costeras de la península de Baja California utilizando un artefacto que, por medio de la succión bucal, aspira a las

hormigas del suelo y las deposita en un tubo de tipo cónico marca Falcon®. La colecta se realizó del 21 al 28 de agosto de 2021. Los sitios muestreados (Figura 1), de norte a sur, fueron: 1) Lengüeta Arenosa (Municipio de Ensenada, B.C.), 2) Punta Mazo (municipio de San Quintín, B.C.), 3) Playa María (Santa Rosalíita, Municipio de San Quintín, B.C.), 3) Guerrero Negro (Municipio de Mulegé, B.C.S.), 5) Punta Abreojos (Municipio de Mulegé, B.C.S.), 6) Las Barrancas (Municipio de Comondú, B.C.S) y 7) Bahía Magdalena (Municipio de Comondú, B.C.S).

Los ejemplares colectados fueron fijados en EtOH 96%. Las hormigas fueron limpiadas de agentes externos como tierra, ramas e incluso de otros artrópodos, posterior a esto, se les realizó un cambio de EtOH 96% por uno limpio. Después, las muestras colectadas ya limpiadas, se conservaron en hielo hasta su adecuada disposición en un congelador de laboratorio.

## 2.2 Análisis en laboratorio

### 2.2.1 Identificación morfológica

**Tabla 1.** Resumen de colecta de hormigas del género *Myrmecocystus* capturadas en las dunas costeras del Pacífico bajacaliforniano.

Sitio de estudio	Coordenadas		Hormigas capturadas
	Latitud	Longitud	
Ensenada	31.7689232	-116.6237386	0
Punta Mazo	30.424333°	-116.012529°	60
Santa Rosalíita	28.93ñ3796°	-114.488113°	50
Guerrero Negro	28.048205°	-114.033533°	50
Punta Abreojos	26.719174°	-113.559251°	110
Las Barrancas	25.990841°	-112.194048°	35
Bahía Magdalena	24.604968°	-111.789952°	9
		<b>TOTAL</b>	<b>314</b>

En laboratorio, se separaron entre 9 y 25 individuos por sitio (ver Tabla 1) para análisis genéticos, los cuales fueron resguardados en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Otros individuos fueron montados para su identificación con caracteres morfológicos bajo un microscopio estereoscopio (marca Nikon® modelo "SMZ 745T") y con claves dicotómicas (Fisher y Cover, 2007) para corroborar que los organismos se traten efectivamente del mismo género de hormigas (*Myrmecocystus*) antes de ser analizadas genéticamente.

### 2.2.2 Procedimiento de análisis genético

Se realizó la digestión y extracción de ADN con el DNeasy blood and tissue kit de la compañía Qiagen a 10 hormigas de cada sitio, utilizando el individuo completo e intacto (sin perforaciones o mutilaciones), esto debido a que los ejemplares serán utilizados en otros estudios morfométricos. Antes de iniciar el proceso de digestión, se colocaron a las hormigas individualmente en cuadros de papel aluminio de 3 cm x 3 cm, esto, con la finalidad de secar todo el EtOH 96% del exoesqueleto y también para que estén a temperatura ambiente antes de ser puestas en digestión. El proceso de digestión se realizó utilizando tubos Eppendorf de 1.5 ml, en donde se colocó a cada hormiga junto con 20 $\mu\text{L}$  de Proteinasa K y 180 $\mu\text{L}$  de Buffer ATL. Los tubos preparados fueron sometidos a vortex durante 15 segundos y se pusieron en incubación a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas en un Termomixer sin mezclar.

La extracción de ADN se llevó a cabo agregando 200 $\mu\text{L}$  de EtOH 96% y 200 $\mu\text{L}$  de Buffer AL a cada muestra ya digerida, posteriormente, se realizó un vórtex durante 15 segundos antes de poner a incubar durante 15 min a  $56^{\circ}\text{C}$ . Luego, con la ayuda de pipetas, se colocó todo el líquido obtenido (con todo y precipitados) en una columna de extracción Eppendorf con tubo de recolección de 2 ml. Los organismos a los cuales se les extrajo el ADN fueron resguardados en EtOH70% en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las columnas listas se centrifugaron a 8,000 rpm durante 1 min, se desechó el líquido de los tubos de recolección y se colocó la columna sobre un nuevo tubo de 2 ml. Se agregó 500 $\mu\text{L}$  de Buffer AW1 a cada columna y se centrifugaron a 8,000 rpm durante 1 min, se desechó el líquido del tubo de 2 ml y se colocó la columna en un nuevo tubo. Se agregaron 500 $\mu\text{L}$  de Buffer AW2 y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 3 min, se desechó el líquido del tubo de 2 ml y se colocó cada columna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, posteriormente, se agregaron 50 $\mu\text{L}$  de agua ultrapura al centro de la membrana de la columna de extracción y se centrifugaron a 8000 rpm durante 1 min, se repitió dos veces este paso. El ADN obtenido se guardó en un congelador a  $-15^{\circ}\text{C}$ .

Se realizaron distintas amplificaciones del ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las PCR para la amplificación del gen mitocondrial COI se realizaron mediante el uso de los cebadores RON (GGATCACCTGATATAGCATTCCC, Simon et al 1994) y NANCY (CCCGGTAAAATTAATAAACTTC, Simon et al 1994). Para la amplificación de los genes nucleares se experimentó con 15 pares de cebadores (Anexos 1), basados en Ströher y colaboradores (2013). Para este estudio fueron de utilidad 5 de esos cebadores (Tabla 2) debido a que mostraron buen producto de PCR para *Myrmecocystus sp.* y además tienen la resolución necesaria para estudios genético-poblacionales. Los reactivos utilizados para las PCRs fueron: 12.3µL de agua ultrapura, 5µL de Buffer 5X, 2µL de MgCl<sub>2</sub>, 1µL de cada cebador, 0.2µL de Taq polimerasa y se utilizó 3µL de ADN. Para el gen mitocondrial se utilizó un protocolo de termociclador que realizó 30 ciclos de 45°C por 45s y 72°C por 1 min, con una temperatura estabilizadora de 95°C por 3.5 min. Los genes nucleares se amplificaron con un termociclo de 5 min a 95°C, 35 ciclos de 92°C por 1 min, 58–60 °C durante 1 min y 70 °C durante 2 min, seguido de extensión final a 72°C durante 6 min.

**Tabla 2.** Cebadores nucleares utilizados para análisis genético-poblacionales de *Myrmecocystus sp.* BCA-2

Cebador	Secuencia
Ant.1076F	AAAATCTNATGTGGAACACGGTCA
Ant.1076R	CCGTATCTGATYCCATGTAGCA
Ant.1281F	GACGCAGGTTGYAACGAAATCAC
Ant.1281R	GCCRCTAATATCCAGCTTCACGAG
Ant.1F	CCTTCGTGCCTAYGAGAATAGYGTAC
Ant.1R	AACGACGTCSGACGGTCCAT
Ant.202F	CCYATCAACTCTGTTAATATCGAACG
Ant.202R	GACACAATGTTGGAAGCCCTTG
Ant.389F	ACGGACCCACATTGAGAAGAAC
Ant.389R	CYTTACCCACCTCCTCCACCA

Se comprobó la calidad de las PCR mediante el uso de geles de agarosa (al 1.4%), los cuales usan un flujo de electricidad constante para separar los diferentes fragmentos de ADN obtenidos y así visualizar la calidad del producto amplificado antes de enviarse a secuenciar. Los geles se elaboraron con 0.6 g de agarosa y 40 ml de TAE 1X (procedimiento en Anexos 2).

La cámara se configuró para realizar una “corrida” de 20 minutos a 120V. Se utilizó un fotodocumentador marca Bio-Rad® y el software ImageLab para visualizar el resultado de los geles. Los productos obtenidos de las PCR fueron enviados al laboratorio MacroGen Inc., Corea, para ser purificados y secuenciados mediante el método Sanger con los mismos cebadores en las dos direcciones que se utilizaron para amplificar los 6 genes.

### 2.3 Análisis de datos

Las secuencias de ADN fueron analizadas y editadas mediante el software Sequencher® versión 4.1.6 (2018), en el cual se eliminó cada extremo anterior y posterior de cada cebador utilizado, los extremos eliminados variaron entre 5 y 25 bases según la calidad de la secuencia. Se detectaron y corrigieron posibles errores de lectura en las secuencias de ADN y se ensamblaron los contigs de las secuencias *forward* y *reverse* mediante los siguientes parámetros de ensamblaje: Porcentaje mínimo de coincidencia = 60%; Sobreposición mínima = 20. Se realizó una edición manual de aquellos sitios donde los cebadores no concordaban con la lectura de los mismos nucleótidos, utilizando la secuencia de mejor calidad para definir el nucleótido que está siendo leído de manera errónea en la otra secuencia y así poder modificarlo. En los casos donde ambas fueron de buena calidad y no concordaban los nucleótidos, entonces se consideró como un sitio polimórfico, evidencia de dos alelos heterocigotos en los marcadores nucleares.

Se construyeron los alineamientos con el programa MAFFT (Katoh et al 2009) para cada marcador molecular por separado mediante una estrategia: Automático (FFT-NS-1, FFT-NS-2, FFT-NS-i o L-INS-i) con los siguientes parámetros: Matriz de puntuación para secuencias de aminoácidos: BLOSUM62; Matriz de puntuación para secuencias de nucleótidos: 200PAM/ $\kappa=2$ ; Penalización por apertura de hueco: 1.53 y un Valor de compensación = 0. Se obtuvo un archivo con secuencias alineadas y gaps (-) por cada marcador.

Para la edición de las secuencias alineadas con gaps, se utilizó el programa MEGA11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 11, Tamura et al, 2021) en donde se construyó primero un alineamiento utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Las secuencias alineadas y con gaps fueron modificadas manualmente, primero, se eliminó cada extremo que tuviera gaps. Por último, se tomó la decisión de conservar o modificar cada sitio polimórfico al comparar las diferentes secuencias modificadas en el programa Sequencher 4.1.6.

### 2.3.1 Identificación molecular

Se utilizaron las secuencias nucleotídicas obtenidas del gen COI para realizar una búsqueda en BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el fin de identificar molecularmente a la especie dentro de la base de datos (GenBank) que ofrece NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés). El proceso consiste en colocar la secuencia nueva en el motor de búsqueda de BLAST, de este modo se compara con las secuencias más parecidas en la base de datos, para determinar cuál es la secuencia (especie) con el porcentaje de identidad de nucleótidos más alto, es decir que involucra procesos estadísticos donde el resultado es una lista de los nombres de las especies con sus respectivos valores de identidad. Este proceso corresponde a lo propuesto en el proyecto taxonómico de identificación molecular basada en la región Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) llamado “*Barcoding animal life*” (Hebert et al, 2003), aunque dentro de la plataforma también se pueden someter diversas regiones del ADN, tanto nuclear como mitocondrial.

### 2.3.2 Límites geográficos de la hormiga *Myrmecocystus* sp. BCA-2

Con el fin de determinar los límites geográficos de la especie *Myrmecocystus* sp. BCA-2 y evaluar si entre las hormigas muestreadas se encontraron especies crípticas (es decir, aquellas que no se pudieron delimitar con base en la morfología) se utilizaron métodos Bayesianos para la reconstrucción filogenética. El programa PartitionFinder (Lanfear et al., 2017) fue utilizado para seleccionar el esquema de partición y el modelo de sustitución nucleotídico más adecuado. Posteriormente se utilizó el software MrBayes versión 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) para la reconstrucción filogenética del gen COI, agregando a la matriz de datos las secuencias del gen COI obtenidas en el GENBANK (ID entre paréntesis) de otras 5 especies del género *Myrmecocystus*: *M. mimicus* (EU143036), *M. yuma* (EU143041), *M. kennedyi* (EU143014), *M. wheeleri* (EU143027) y *M. flaviceps* (EU143012), las cuales también se distribuyen en la región florística de California. Como grupo externo (y para enraizar el árbol COI) se agregó una secuencia de la hormiga *Lasius parolineus* (LT977532), la cual, de acuerdo con lo encontrado en NCBI BLAST y con filogenias previas, es el género de hormiga que más se asemeja a *Myrmecocystus* (Snelling, 1976; Bolton, 1994). Se realizaron 2 corridas de 4 cadenas Markovianas por 20 millones de generaciones (MCMC), muestreando un árbol por cada 2,000 generaciones. Se evaluó la calidad de las corridas mediante los valores del PSRF y los ESS de los parámetros, y se verificó que las dos corridas hayan convergido mediante el comando “sump”. De los árboles resultantes, se descartó el primer 25% y se compiló un árbol consenso mediante el comando “sumt”, el cual fue editados con el software FigTree v 1.4.4 (Rambaut, 2007).

### 2.3.3 Análisis filogeográfico

Una vez determinado cuales individuos pertenecían a la especie *Myrmecocystus* sp. BCA-2, se agregaron a los datos del COI las secuencias de los genes nucleares para los análisis genético-poblacionales y demográficos de esta especie. Con el programa DnaSP (Rozas et al., 2017) se determinaron los haplotipos de la matriz de datos del alineamiento del marcador mitocondrial COI. Se aplicó el algoritmo de PHASE (Stephens et al., 2001; Stephens y Donnelly, 2003) con los parámetros: Número de iteraciones= 1,000, Intervalos de adelgazamiento= 1 e Iteraciones de quemado= 1,000 para obtener los haplotipos de los marcadores nucleares con sitios polimórficos, por tener alelos distintos en individuos heterocigotos. Para evaluar la diversidad genética de la especie, se calcularon para cada marcador, la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y la diversidad haplotípica (Hd).

Para evaluar si se cuenta con una buena representación de haplotipos para cada marcador, se crearon curvas de acumulación de haplotipos con paquetes de R (R core team, 2020). Se utilizaron las paqueterías “*seqinr*” (Charif y Lobry, 2007), “*adegenet*” (Jombart, 2008; Jombart y Ahmed, 2011) y “*spider*” (Brown et al, 2012). Se utilizó un método “*random*” con 1,000 permutaciones para la obtención de las curvas con sus intervalos de confianza.

Para comprender y visualizar las relaciones entre genotipos individuales a nivel de población, se utilizó el software popArt (Qt versión 4.8.5; Leight y Bryant, 2015), el cual crea redes de haplotipos a partir de secuencias nucleotídicas alineadas y sin sitios heterocigotos (esto se realizó con el programa DnaSP). Este software proporciona una implementación integral de métodos de redes de haplotipos, herramientas de visualización filogeográfica y pruebas estadísticas estándar. Se utilizó el algoritmo “*Median Joining*” sin parámetro épsilon (propuesto por Bandelt y colaboradores, 1999) el cual construye redes a partir de datos de población.

Para determinar el número de poblaciones de *Myrmecocystus* sp. BCA-2 presentes en el área de estudio, se utilizó el programa computacional *Structure* (Pritchard, 2000), el cual tiene como algoritmo las iteraciones de cadenas Markovianas de Monte Carlo (MCMC). El programa implementa un modelo basado en un método de “clusters” para inferir la estructura de la población usando datos genotípicos provenientes de marcadores moleculares. Para estimar la K adecuada (número de poblaciones) el programa reconoce la frecuencia alélica de cada individuo y calcula la probabilidad de que un individuo pertenezca a cada K. Se utilizó un *burn-in period* de cien mil con un millón de pasos en la cadena de Monte Carlo, con el modelo ancestral *Admixture model* (LOCPRIOR) y frecuencias alélicas correlacionadas. En este

mismo programa se inició el trabajo con un agrupamiento de  $K$  entre 1 y 8 (repeticiones con cada set de  $K$ ) con 10 iteraciones, de esta manera se obtuvo el mejor Delta  $K$  (mayor probabilidad de  $K$ ) que explica la estructura de la población de *M. sp. BCA-2*. En el archivo de entrada para Structure se juntaron todos los marcadores codificados como genotipos. El software omite a los individuos con datos faltantes al momento de hacer los análisis, este principio es apropiado cuando la probabilidad de tener locis faltantes es independiente del alelo del individuo, además, el número de datos faltantes no afecta el análisis de asignación de  $K$  a menos que sean demasiados los individuos sin datos (Pritchard et al, 2010). Una vez que se establecieron el número de poblaciones, se utilizó el software DnaSP para obtener los valores del índice de fijación ( $F_{ST}$ ) de cada marcador (global) y entre las poblaciones ( $F_{ST}$  pareados), con el fin de medir la estructuración genética de las poblaciones (Weir y Cockerham, 1984).

#### 2.3.4 Tiempos de divergencia

Para determinar los tiempos de divergencia, y el tamaño efectivo de la población actual e histórico, así como las tasas de migración entre las poblaciones especificadas, se utilizó el software IMA3 (Hey et al, 2018). Dicho programa, además de utilizar datos de secuencia alélica por fases y un algoritmo de MCMC (Metropolis acoplada a una cadena Markov, basado en el Método Monte Carlo) con modelos de mutación (Hey y Nielsen, 2004), también permite estimar la topología del árbol filogenético para las poblaciones o especies muestreadas. IMA3 proporciona la estimación de la probabilidad posterior de la topología filogenética de la población mediante el uso de un nuevo tipo de aumento de datos llamado "genealogía oculta" (Hey, et al. 2018). La primer corrida se realizó utilizando los siguientes parámetros: -j0 (genealogía oculta), -L (duración de la corrida) = 1,000,000, -b (duración de la grabación) = 1,000, -m (valor previo de migración) = 1, -q (máximo para parámetros de tamaño de población) = 10, -t (tiempo máximo de la división de la población) = 1.5 y -hn (número de cadenas)= 20. Los resultados. Arrojados fueron utilizados para la segunda corrida, la cual se realizó con los parámetros: -j 12, -L 100,000, -b 10,000, -m 0.5, -q 4, -t 2, -hn 40 y -ha 0.993, utilizando la topología de árbol con la probabilidad posterior estimada más alta.

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Trabajo de campo e identificación

Se colectaron e identificaron con claves dicotómicas (Fisher y Cover, 2007) un total de 314 hormigas pertenecientes al género *Myrmecocystus* en 6 de las 7 dunas costeras muestreadas, el único sitio sin presencia de esta hormiga fueron las dunas costeras de Ensenada, ubicadas en la lengüeta arenosa del Estero de Punta Banda. Del total de hormigas capturadas, se utilizaron 79 para delimitar a la especie *M.* sp. BCA-2, establecer sus límites geográficos y estudiar su genealogía. Las dunas costeras de Punta Abrejos registraron un mayor número de individuos colectados, mientras que Bahía Magdalena fue el sitio con menor cantidad de individuos colectados.

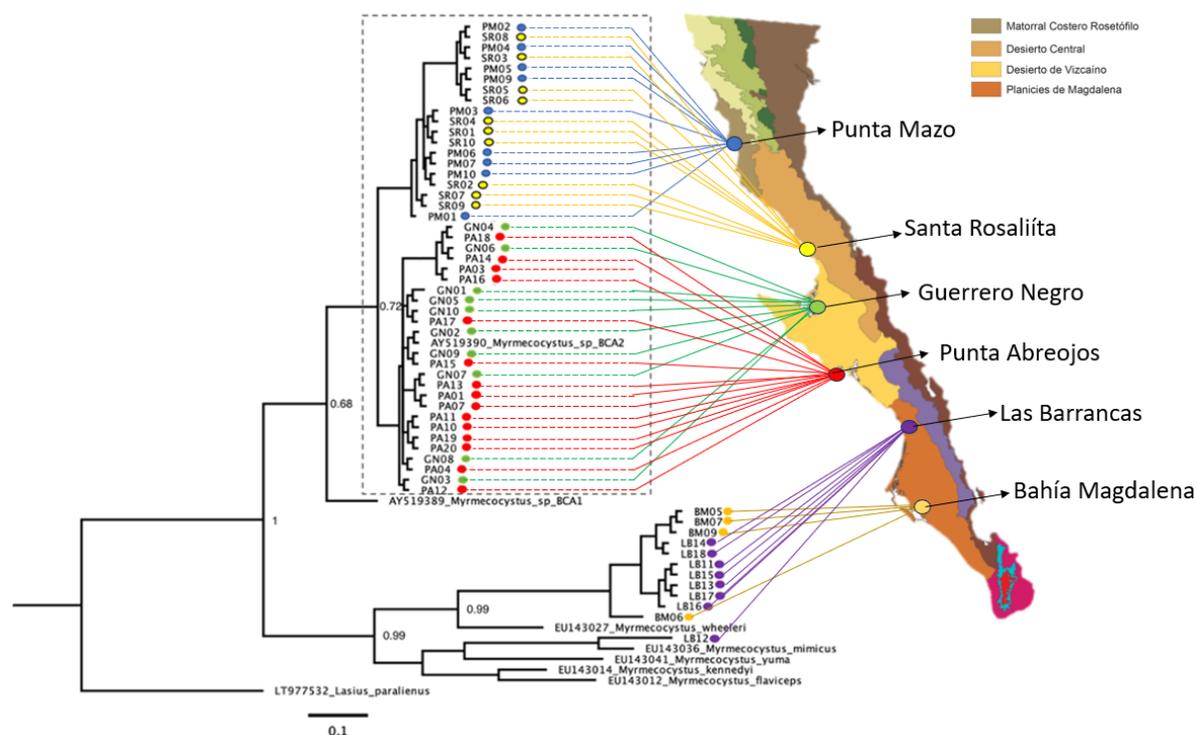
De acuerdo con las claves dicotómicas propuestas por Snelling (1976, 1982) las hormigas del género *Myrmecocystus* capturadas en todas las dunas costeras pertenecerían a una sola especie por sus características morfológicas prácticamente iguales. Sin embargo, 1) No se define bien a que especie pertenece debido a que en un punto las claves guían a una especie llamada *Myrmecocystus intonsus*, en este caso, las características morfológicas no concuerdan en su totalidad con las características morfológicas de las hormigas capturadas en las dunas costeras en este estudio; 2) Las características morfológicas (color principalmente) de *Myrmecocystus yuma* y *Myrmecocystus creightoni* se asemejan más a esta hormiga, pero *Myrmecocystus* sp. BCA-2 es significativamente más pequeña.

Con las secuencias del gen COI se identificó molecularmente a las hormigas *Myrmecocystus* de 4 de las 6 dunas muestreadas, las cuales, de acuerdo con la base de datos que ofrece NCBI BLAST, presentan entre un 98 y un 100% de identidad en sus secuencias (con una cobertura entre el 91 y el 100% y un valor E de 0.0) a una especie aún sin describir llamada temporalmente como *Myrmecocystus* BCA-2 por Kronauer y colaboradores en 2004 quienes mencionan que la encontraron cerca de Guerrero Negro (en su texto mencionan B.C.N.). *Myrmecocystus wheeleri* es la especie descrita con mayor identidad (92.94%) en las secuencias del gen COI con las hormigas de las cuatro dunas norteñas. Considerando un umbral de identidad comúnmente aceptado del 3-4% para hormigas (Wang y Yamane, 2017), el porcentaje de identidad de las secuencias que muestra BLAST es demasiado baja para considerarla la misma especie. Las secuencias del COI de los individuos de las dunas costeras de Las Barrancas y de Bahía Magdalena tuvieron un 97.04% de semejanza con una especie de identidad dudosa (*Myrmecocystus* cf. *mendax*) y un 95.44%

con *M. kathjuli*, lo cual también es considerado demasiado bajo para ser de la misma especie. A partir del apartado 3.2 se mostrarán los resultados de acuerdo con cada objetivo planteado.

### 3.2 Límites geográficos de la hormiga *Myrmecocystus* sp. BCA.2

Para la determinación de los límites geográficos de la hormiga *Myrmecocystus* sp. BCA-2, de las 79 PCR que se realizaron del gen COI, se utilizaron 41 secuencias (debido a la calidad de los cromatogramas) y se agregaron 7 taxones pertenecientes al género *Myrmecocystus* con segmentos de 439 pares de bases y con los modelos de evolución de máxima verosimilitud más apropiados, por posición de cada codón, obtenidos con el programa PartitionFinder; Posición 1: **TRNEF+I**, posición 2: **F81** y posición 3: **HKY+G** para la reconstrucción filogenética mediante la creación de un árbol con ayuda del software MrBayes (Figura 2 ).



**Figura 2.** Reconstrucción filogenética Bayesiana de individuos colectados en dunas costeras de la PBC del género *Myrmecocystus* a partir del análisis del gen mitocondrial COI. Los colores indican 1) Las hormigas que fueron colectadas en este estudio y 2) Los sitios donde fueron colectados los cuales tienen las abreviaciones: PM= Punta Mazo (azul), SR= Santa Rosaliíta (amarillo), GN= Guerrero Negro (verde), PA= Punta Abreojos (rojo), LB= Las Barrancas (naranja), BM= Bahía Magdalena (morado). Las áreas encerradas con líneas punteadas representan el grupo de individuos (en el árbol) que pertenecen a dicha área geográfica (mapa). Los números en los nodos indican la probabilidad posterior. Árbol enraizado con la hormiga *Lasius paraliensis* Seifert, 1992.

En la topología del árbol basado en el gen COI, el cual comúnmente se ha usado para la delimitación de

especies, las hormigas del género *Myrmecocystus* que se encuentran distribuidas en las cuatro dunas costeras norteñas, desde Punta Mazo (Latitud: 30.424333°, Longitud: -116.012529°) hasta Punta Abrejos (Latitud: 26.719174°, Longitud: -113.559251°), forman un clado con la hormiga *Myrmecocystus* sp. BCA-2 del estudio de Kronauer et al. (2004). En cambio, las hormigas de las dos localidades más sureñas forman un clado con *M. wheeleri*, filogenéticamente separado de *M.* sp. BCA-2, a pesar de estar geográficamente relativamente cercanas.

### 3.3 Análisis genético-poblacionales y filogeográficos

Con el fin de determinar el número de poblaciones de *Myrmecocystus* sp. BCA-2, medir su estructura poblacional actual e histórica y estimar las edades de divergencia de las poblaciones, se realizaron análisis genético-poblacionales y filogeográficos utilizando los datos del gen COI y agregándole cinco marcadores nucleares, únicamente para los individuos de las cuatro dunas norteñas. En la Tabla 3 se muestra el número de secuencias utilizadas por cada marcador y cada sitio de donde provenían los individuos secuenciados.

**Tabla 3.** Información del tamaño y número de secuencias de ADN de *Myrmecocystus* sp. usados para inferencia filogeográfica y análisis genético-poblacionales.

Marcador molecular / Cebador ( <i>primer</i> )	Tamaño del marcador (pares de bases)	Guerrero Negro	Punta Abrejos	Punta Mazo	Santa Rosaliita	Total de individuos por marcador
COI	439	10	12	9	10	<b>41</b>
Ant.1	337	8	7	7	8	<b>30</b>
Ant.202	327	9	6	7	9	<b>31</b>
Ant.389	473	9	9	10	10	<b>38</b>
Ant.1076	566	8	10	10	10	<b>38</b>
Ant.1281	357	7	10	9	7	<b>33</b>

El marcador con mayor número de sitios nucleotídicos fue Ant.1076 con 566 pares de bases, mientras que el de menor número de sitios nucleotídicos fue Ant.202 con 327 pares de bases. El marcador mitocondrial COI fue el que registró un mayor número de secuencias útiles para los análisis genéticos con 41 individuos, mientras que el marcador nuclear Ant.1 fue el que menos secuencias de este tipo registró con 30 individuos.

El número de haplotipos recuperados con las 10,000 iteraciones (y 1,000 generaciones de *burn-in*) de los genes nucleares (con sitios polimórficos) y del gen COI en el programa DnaSP, así como la diversidad de nucleótidos, se muestran en la Tabla 4.

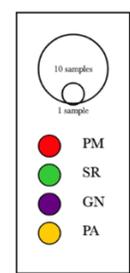
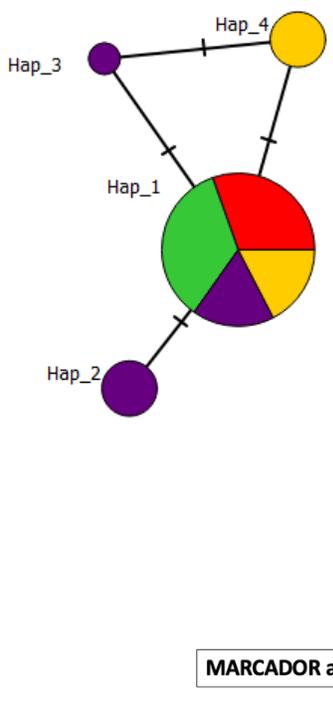
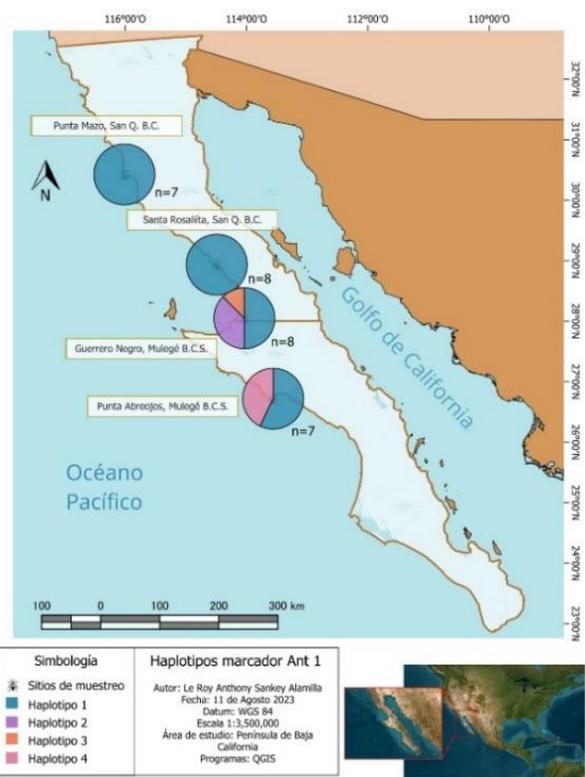
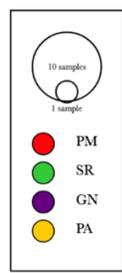
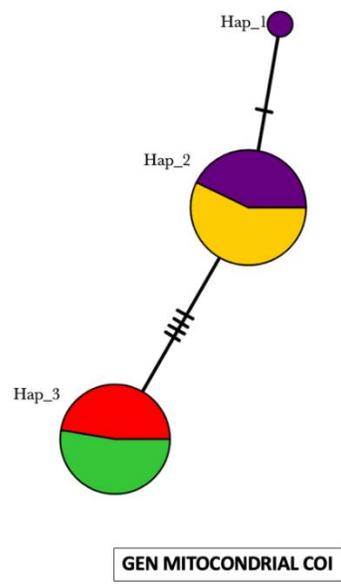
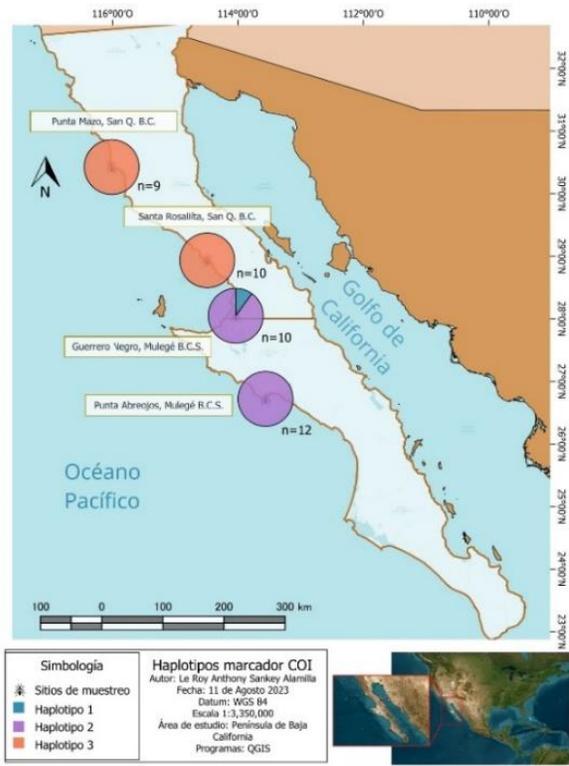
El marcador EPIC Ant.1076 fue el más grande con 566 pares de bases (pb), mientras que Ant.202 fue el más pequeño con 327 pb. El marcador EPIC que registró un menor número de secuencias fue Ant.1 con 31 individuos secuenciados.

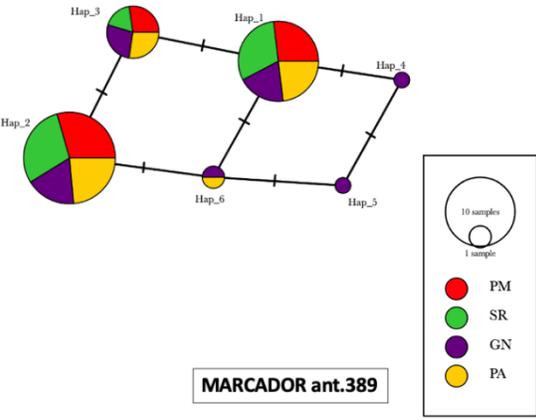
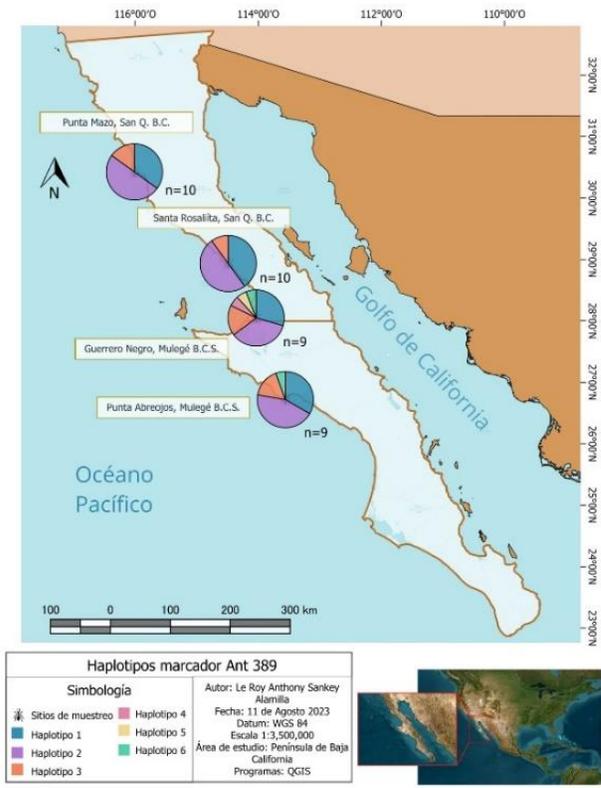
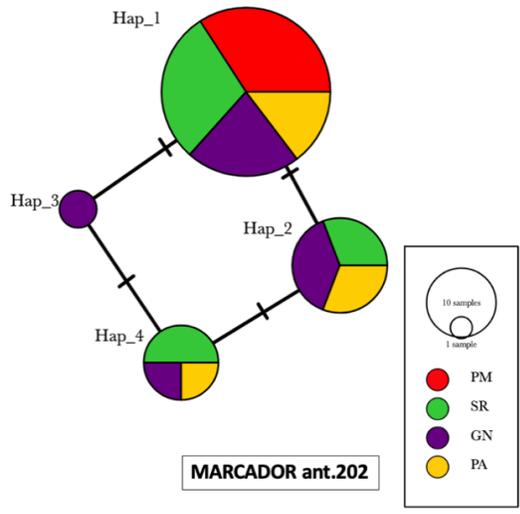
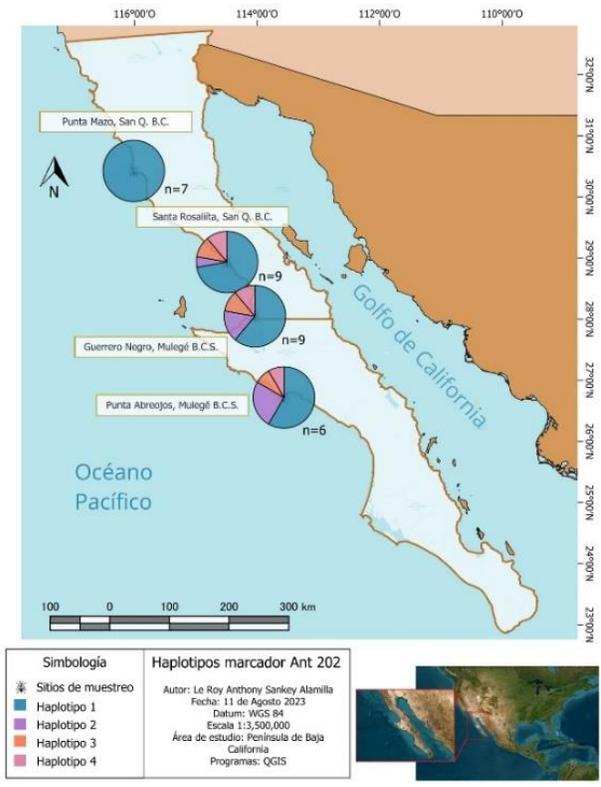
**Tabla 4.** Análisis de polimorfismos en 5 marcadores nucleares y en el gen COI mitocondrial, número de sitios variables (S), haplotipos por cada marcador molecular (H), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), diversidad haplotípica (Hd) y el índice de fijación global ( $F_{ST}$ ) de los marcadores moleculares utilizados en *M. sp. BCA-2* obtenidas en DnaSP.

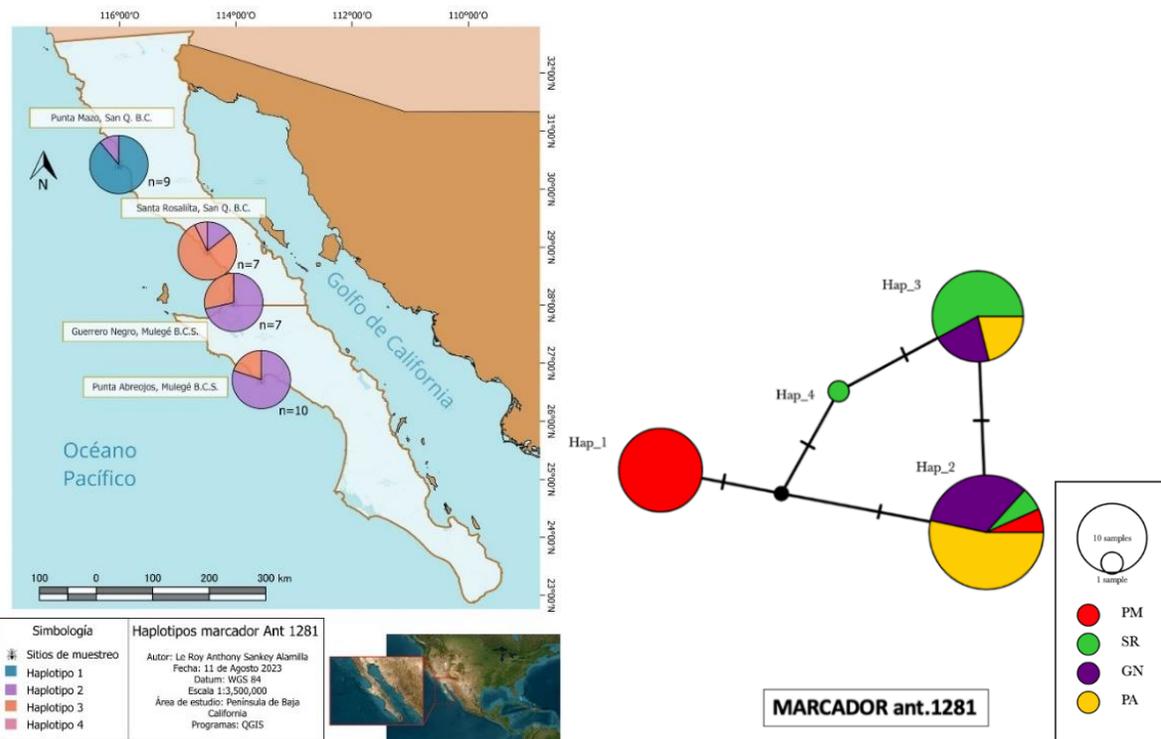
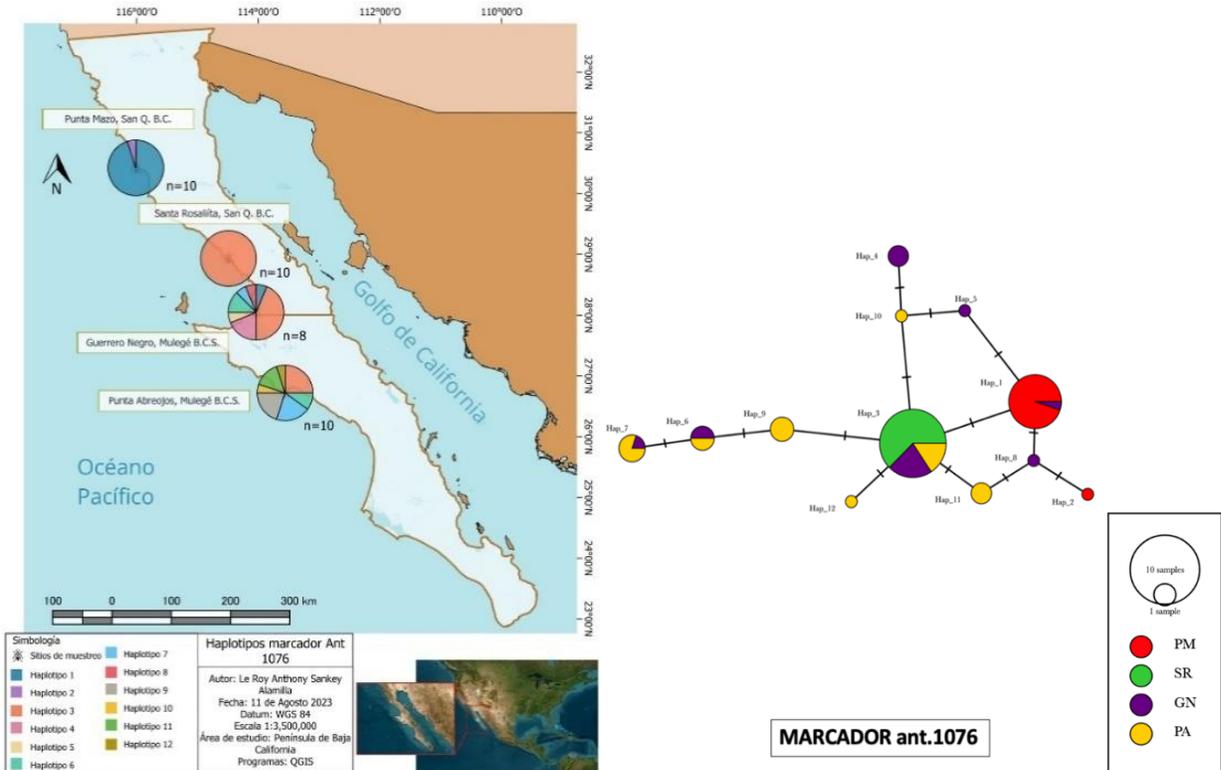
<b>Marcador molecular</b>	<b>Total</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>Hd</b>	<b><math>F_{ST}</math></b>
COI	41	5	3	0.00476	0.5354	0
Ant.1	30	5	4	0.00055	0.3977	0.23746
Ant.202	31	5	4	0.00098	0.4547	0.03306
Ant.389	38	3	6	0.00220	0.6575	-0.04652
Ant.1076	38	7	12	0.00248	0.7495	0.40563
Ant.1281	33	3	4	0.00333	0.6615	0.71749

El marcador con un mayor número de sitios variables fue Ant.1076 con 7, de los que resultaron 12 haplotipos, mientras que los marcadores con menos sitios variables fueron Ant.1 y Ant.202 con 2 sitios respectivamente, de los que resultaron 4 haplotipos de cada uno.

El gen COI fue el que resultó con una mayor diversidad nucleotídica sobre todos los demás con un valor de 0.00476; De los marcadores nucleares, Ant.1281 fue el marcador con mayor diversidad nucleotídica. El marcador nuclear Ant.1 fue el que obtuvo el valor más bajo de diversidad nucleotídica con 0.00074. En cuanto a la diversidad haplotípica, el marcador Ant.1076 resultó ser el más diverso con un valor de 0.7495 y Ant.1 el menos diverso con un valor de 0.1833. El marcador con el índice de fijación ( $F_{ST}$ ) global más alto fue Ant.1281 con un valor de 0.71749 mientras que el más bajo fue Ant.389 con un valor de -0.04652. Todas las curvas de acumulación presentaron una asíntota, esto quiere decir que el tamaño de muestra es bueno para la cantidad de haplotipos que se encontraron (Anexo 3). En la figura 3 se muestran tanto las redes de haplotipos como la distribución de estos.

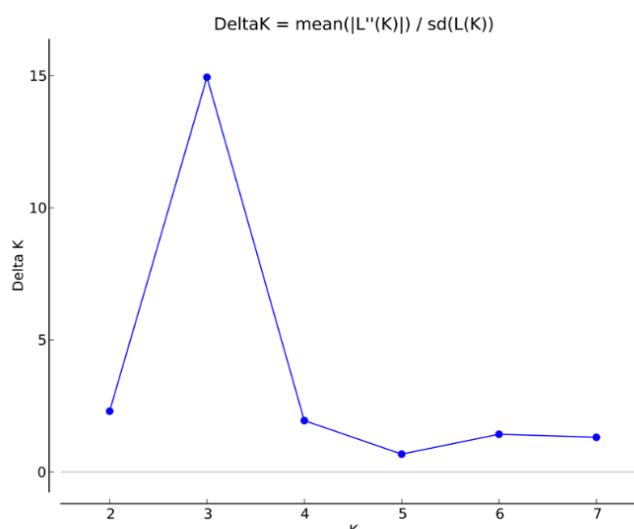




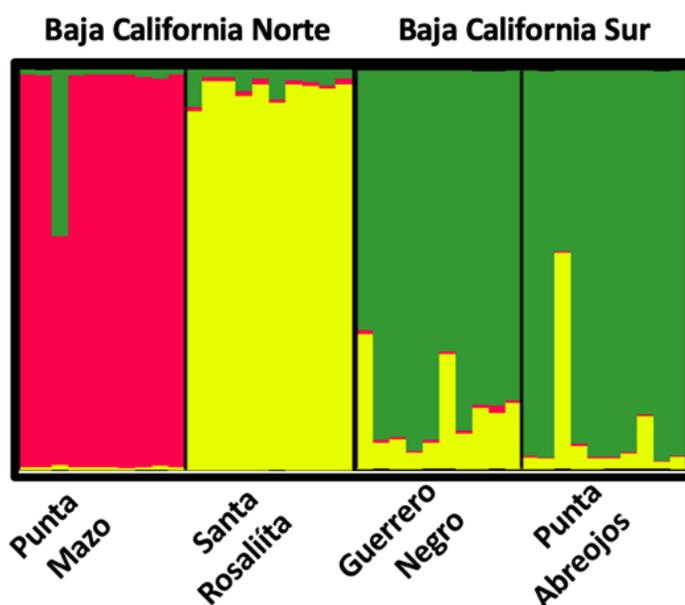


**Figura 3.** Mapas de la distribución de los diferentes haplotipos con sus respectivas redes. Los colores en las gráficas de pastel del mapa representan la porción de un haplotipo en cada duna costera, mientras que, en las redes, los colores representan a la porción de individuos que posee cierto haplotipo. Las líneas que conectan a los haplotipos (redes) cuentan con otras líneas pequeñas y perpendiculares, las cuales indican los pasos mutacionales entre un haplotipo y el otro. El tamaño de los círculos representa la cantidad de individuos por sitio y por haplotipo.

En la red de haplotipos basada en el gen COI se puede ver cuatro pasos mutacionales entre el haplotipo 1 y el haplotipo 2 y solo uno entre el haplotipo 1 y el haplotipo 2. Los tres haplotipos se dividen geográficamente, dividiendo las dos dunas más norteñas de las dos sureñas. Para el marcador Ant.1, de los 4 haplotipos, uno está presente en todas las localidades, siendo este el único haplotipo encontrado en Punta Mazo y Santa Rosalita, mientras que las localidades de Guerrero Negro y Punta Abrejos tienen 2 y 1 haplotipos únicos, respectivamente. De manera parecida, en la red de los 4 haplotipos del marcador Ant.202 hay un haplotipo compartido entre las cuatro localidades, dos haplotipos compartidos entre Santa Rosalita, Punta Abrejos y Guerrero Negro y un haplotipo único para Guerrero Negro.



**Figura 4.** Delta K. Gráfico del análisis de aproximación del número de poblaciones inferidas por las iteraciones en Structure.



**Figura 5.** Gráfico de barras. Las líneas verticales (individuos) representan con colores la probabilidad en la que cada individuo pertenece a cada K inferida por Structure (K=3).

En la red de 6 haplotipos del marcador Ant.389, se observa que Guerrero Negro fue la única localidad con todos los haplotipos (dos de ellos únicos para Guerrero Negro), mientras que Punta Mazo y Santa Rosalíita son las localidades con menos haplotipos (tres). El marcador Ant.1076 tuvo un mayor número de haplotipos (12 total). Para este marcador, cada localidad, menos la de Santa Rosalíita, tuvo uno, o más haplotipos únicos.

Ningún haplotipo se encontró en las cuatro localidades y se puede notar una estructura geográfica generalizada de norte a sur. Parecido a los marcadores anteriores, las localidades de Guerrero Negro y Punta Abreojos tuvieron el mayor número de haplotipos. Por último, en la red de 4 haplotipos para el marcador Ant.1281, se observa un haplotipo compartido en las cuatro localidades y un haplotipo único para Punta Mazo, y otro para Santa Rosalíita. Contrario a los demás marcadores, para éste, la localidad con el mayor número de haplotipos fue Santa Rosalíita con tres haplotipos, mientras que las demás localidades hay dos haplotipos en cada una.

De acuerdo con la inferencia realizada en el programa Structure de los datos de secuencias nucleares y mitocondriales, la muestra total se divide en 3 clusters (K) o poblaciones, agrupando a las dunas costeras de Guerrero Negro y Punta Abreojos en una sola población, mientras que las de Punta Mazo y Punta Abreojos representan, cada una, poblaciones diferentes. Para los análisis posteriores, se continuó trabajando con 4 poblaciones, esto debido a que se tiene la intención de conocer el flujo génico entre las dunas costeras y de esta manera, dilucidar si eventualmente las hormigas de Guerrero Negro y las de Punta Abreojos son una sola población, de ser así, los análisis deben mostrar que actualmente existe flujo génico entre ellas.

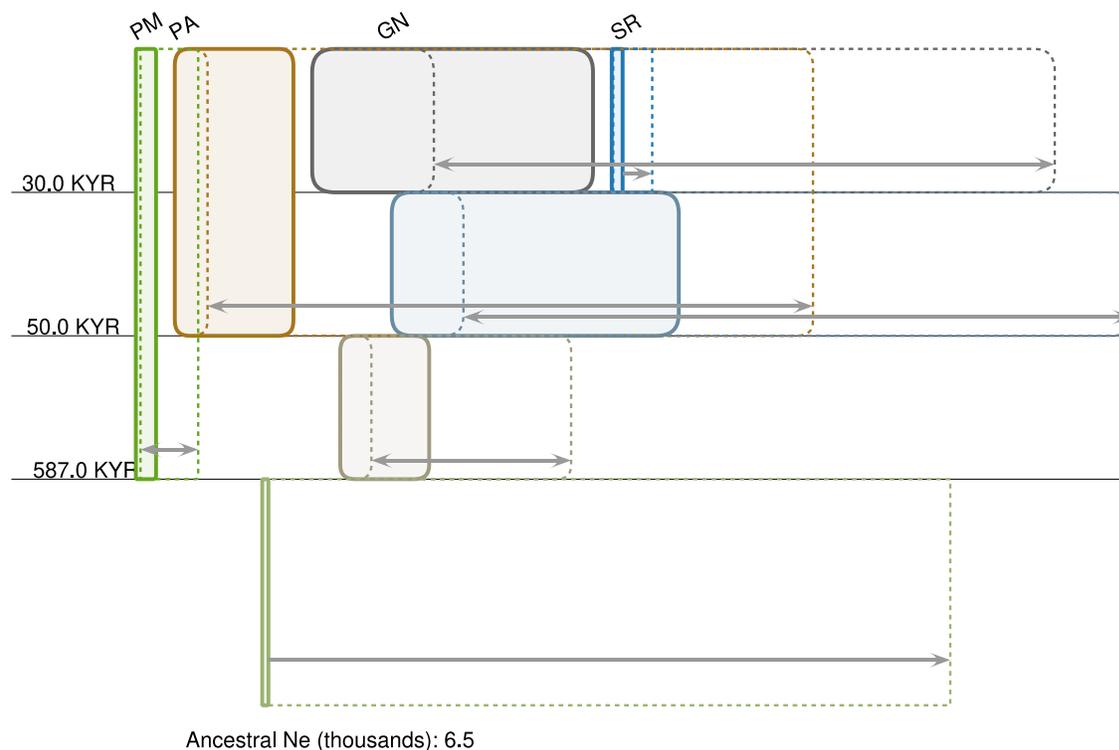
**Tabla 5.** Distancia entre sitios y Valores de  $F_{ST}$  pareados entre los distintos sitios de estudio y para cada marcador molecular.

Sitio A	Sitio B	Distancia (km)	$F_{ST}$					
			Ant.389	Ant.1076	Ant.1281	Ant.1	Ant.202	COI
Punta Mazo	Santa Rosalíita	215	-0.04992	0.90909	0.84010	0	0.16718	0
Punta Mazo	Guerrero Negro	320	-0.03555	0.41352	0.79213	0.18095	0.19048	0
Punta Mazo	Punta Abreojos	474	-0.05411	0.59576	0.80909	0.38462	0.15152	0
Guerrero Negro	Santa Rosalíita	109	-0.04228	0.14074	0.41603	0.18095	-0.0512	0
Punta Abreojos	Santa Rosalíita	263	-0.05559	0.34105	0.52690	0.38462	-0.04819	0
Guerrero Negro	Punta Abreojos	161	-0.04395	0.08772	-0.04516	.21568	-0.06394	0

Los valores más altos de  $F_{ST}$  son entre los sitios de Punta Mazo y Santa Rosalíta, es decir, las dunas norteñas. Los valores más bajos reportados fueron entre los sitios de Guerrero Negro y Punta Abrejos, las dunas sureñas. Las poblaciones norteñas parecen estar genéticamente más diferenciadas entre sí que las poblaciones sureñas (Tabla 5).

### 3.4 Edades de divergencia entre las poblaciones de *Myrmecocystus* sp. BCA-2

Utilizando el modelo de aislamiento con migración ejecutado en el programa IMA3, se calcularon los tiempos de divergencia, el tamaño efectivo de la población y si es que existe migración entre los sitios de estudio a partir de las secuencias nucleares y del gen mitocondrial COI.



**Figura 6.** Una representación de un modelo estimado de aislamiento con migración generado por IMA3 y el programa IMfig (Hey et al., 2018). La genealogía se representa como una serie de cuadros organizados jerárquicamente, con cuadros de poblaciones ancestrales colocados entre los descendientes correspondientes, y el ancho de los cuadros proporcional al  $N_e$  (tamaño efectivo de la población). Los intervalos de confianza del 95% para cada valor de  $N_e$  se muestran como líneas discontinuas a la derecha del lado izquierdo del cuadro de población correspondiente. Las flechas grises a los intervalos  $N_e$  del 95% también se muestran extendiéndose a la izquierda y derecha del límite derecho de cada cuadro de población. Los tiempos de división, colocados a intervalos equidistantes (no proporcionales al tiempo) en miles de años (KYR), se representan como líneas horizontales sólidas, con valores de texto a la izquierda. Las flechas negras se mostrarían sólo para las tasas de migración estimadas que son estadísticamente significativas (Nielsen y Wakeley, 2001) en o por encima del nivel de 0,05 (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos de las estimaciones de la densidad de la probabilidad posterior conjunta de los parámetros. La longitud horizontal de los sucesos está a escala para su mejor visualización.

Con base en el análisis de aislamiento con migración, las edades de divergencia entre las poblaciones se estimaron en unos 587 mil años para la población de Punta Mazo, unos 50 mil años para la población de Punta Abreojos, y unos 30 mil años para las poblaciones de Santa Rosalíta y Guerrero Negro. Además, no se detectó flujo génico estadísticamente significativo entre las poblaciones. De acuerdo con el grosor de las barras el cual indica el tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ), Guerrero Negro es la población más grande, seguida por Punta Abreojos, mientras que las más pequeñas son Santa Rosalíta y Punta Mazo.

En cuanto a la divergencia de cada población, la población de Punta Mazo surgió a partir de una población ancestral que dio lugar a otra población ancestral de mayor tamaño, de esta población de mayor tamaño surgieron dos poblaciones, la de Punta Abreojos (la más sureña) y otra población ancestral de gran tamaño (la más grande en este análisis). De esta última gran población, surgieron las poblaciones de Guerrero Negro y Santa Rosalíta respectivamente.

## Capítulo 4.      Discusión

---

En la hipótesis original de este trabajo, se declara que se esperaba que la estructura genética de las hormigas *Myrmecocystus* sp. BCA-2 se encuentre relacionada con su distribución discontinua en las dunas costeras del Pacífico Bajacaliforniano, sugiriendo que cada duna costera albergaría una sola población y que existe también un reducido flujo genético entre poblaciones. Dicha hipótesis está en parte apoyada por algunos de los análisis, como el de Structure, en donde se puede notar la asignación de individuos a un mínimo de tres poblaciones bien definidas, o la de IMA3, en donde no se detectó flujo genético significativo (es decir, flujo genético reducido, o nulo) entre las dunas. Sin embargo, los valores de  $F_{ST}$  pareados basados en cada marcador molecular por separado en la mayoría de los casos son de cero o negativos, lo cual indicaría una ausencia de estructura entre las dunas. Estas discrepancias entre medidas y métodos pueden deberse a la baja resolución de cada marcador (los pocos sitios polimórficos).

En la segunda parte de la hipótesis, se afirma que se espera que la divergencia de cada población se encuentre relacionada con la formación cada duna costera respectiva. En parte es difícil sustentar esta hipótesis dado que sólo se conoce la edad estimada de las dunas de Guerrero Negro. Aun así, las edades de divergencia de las poblaciones fueron estimadas entre 587 y 30 mil años, lo cual no coincide con la edad de las dunas costeras, esto se discutirá más a detalle en la sección 4.2.

### 4.1 Identificación taxonómica y límites geográficos

De las 7 dunas costeras donde se colectaron hormigas, Ensenada fue el único sitio en no contar con presencia de *Myrmecocystus*. Tal vez la ausencia de esta hormiga en Ensenada se debe a un hábitat degradado lo cual concordaría con lo afirmado por Boulton y Ward (2002) quienes comprobaron que *Myrmecocystus* tiene más especies endémicas en ecosistemas prístinos. De acuerdo con lo observado en campo y a lo reportado por Jiménez y colaboradores (2015), las dunas costeras de esta localidad se enfrentan a problemas antropogénicos, como especies invasoras, contaminación, compactación de la duna, entre otras, lo que disminuye la probabilidad de que esta hormiga pueda habitar este sitio en particular. A pesar de estas consideraciones, lo más probable es que su límite de distribución más norteño sea Punta Mazo, dado que tampoco se ha reportado en dunas costeras conservadas más al norte de Ensenada. Morfológicamente, los individuos de *Myrmecocystus* que habitan las dunas costeras del Pacífico bajacaliforniano son muy similares y el hecho de que, con claves dicotómicas no se pudieron separar,

sugiere que se trata de la misma especie. Sin embargo, al observar el árbol de COI, se puede apreciar que las poblaciones de *Myrmecocystus* que habitan las cuatro dunas más norteñas (de Punta Mazo hasta Punta Abrejos) pertenecen a un mismo grupo monofilético, mientras que las poblaciones más sureñas (Las Barrancas y Bahía Magdalena) pertenecen a otro clado. Al pertenecer a dos clados separados, pero sin caracteres morfológicos discernibles, se consideran especies crípticas. La presencia de especies crípticas en el género *Myrmecocystus* ha sido reportada por Snelling (1976) y recientemente por van Elst y colaboradores (2021). Las secuencias del gen COI funcionaron como código de barras para identificar molecularmente a las hormigas capturadas en las dunas costeras y también dilucidaron las relaciones de parentesco entre otras hormigas del género *Myrmecocystus*.

La topología de la reconstrucción filogenética del gen COI concuerda con Kronauer y colaboradores (2004) en el sentido de emparentar a *M. sp. BCA-1* con *M. sp. BCA-2* como especies hermanas, sin embargo, en el mismo estudio también muestran que estas dos especies forman un grupo monofilético con *M. wheeleri*, situación que no fue observada en el presente estudio. En cambio, *M. wheeleri* forma un grupo monofilético con las poblaciones de Bahía Magdalena y Las Barrancas (a excepción de un individuo, el cual es taxón hermano de *Myrmecocystus mimicus*). Estas diferencias en las relaciones filogenéticas pueden deberse a que Kronauer y colaboradores (2004) utilizaron algunas especies con ciertos problemas taxonómicos como *M. flaviceps* y *M. mimicus*, las cuales aparecen relacionadas con más de una especie. Lo anterior apoya lo mencionado por van Elst y colaboradores (2021) quienes afirman que las últimas revisiones realizadas del género carecen de confianza debido al bajo número de especies encontradas, por lo que muy probablemente estarían excluyendo a algunas especies de sus filogenias, como en este caso las encontradas en Las Barrancas y Bahía Magdalena.

Además de los parentescos, con los resultados obtenidos del árbol filogenético del gen COI, se puede confirmar el endemismo de *M. sp. BCA-2* para la península de Baja California, lo que concuerda con lo mencionado por Johnson y Ward (2002), quienes afirmaron que es una especie endémica para la península. Sin embargo, Johnson y Ward (2002) mencionaron que esta hormiga estaría restringida sólo a Baja California Norte cuando la registraron por primera vez, sin embargo, en este estudio se logra comprobar que su distribución llega hasta Punta Abrejos, en Baja California Sur. Además, la distribución de *M. sp. BCA-2* se encuentra en 3 ecorregiones (propuestas por González, 2010), Matorral Costero Rosetófilo en su distribución más norteña en Punta Mazo, Desierto Central en Santa Rosalía y Desierto del Vizcaíno en Guerrero Negro y en su distribución más sureña en Punta Abrejos.

## 4.2 Genética de poblaciones y filogeografía

En el presente estudio se utilizaron por primera vez los marcadores EPIC en análisis genético-poblacional de hormigas, por lo que resulta imposible una comparación con resultados de otros estudios. Oliveira y colaboradores (2017) utilizaron el marcador EPIC Ant.1281 para realizar una inferencia filogenética y compararla con otra inferencia de los mismos individuos utilizando el gen mitocondrial COI. Lo que encontraron fue que ambas inferencias concordaban con la topología de grupos monofiléticos, esto demuestra la eficacia de estos marcadores genéticos en análisis de delimitación de especies, sin embargo, falta evidencia de su resolución para análisis genético-poblacionales. El análisis genético de poblaciones de hormigas basados en los marcadores nucleares EPIC debe realizarse con suma cautela, esto debido a que en el presente trabajo se probaron 15 marcadores EPIC en las hormigas *Myrmecocystus* sp. BCA-2, de los cuales solo 5 registraron secuencias con polimorfismos entre individuos. En cuanto al marcador mitocondrial del gen COI, la gran mayoría de estudios en insectos utilizan la porción del gen obtenida con los cebadores LCO 1490 y HCO 2198 (Folmer et al, 1994) que secuencian casi la mitad del gen COI. Sin embargo, dichos cebadores no amplificaron ningún producto en nuestras hormigas, por lo cual se utilizaron un par de cebadores alternos, RON y NANCY (Simon et al, 1994), los cuales secuencian alrededor de una cuarta parte del total de este gen (439 pb). Por lo tanto, los resultados obtenidos aquí tampoco son directamente comparables con otros estudios, y la reducción en el número de pares de bases también redujo la resolución.

A pesar de que no se logró secuenciar la totalidad de hormigas *M.* sp. BCA-2 colectadas en este estudio para todos los marcadores (Tabla 3), el porcentaje de secuencias útiles es de 87.9%, lo que quiere decir que sólo faltó el 12.1% de secuencias. Además, las curvas de acumulación de los haplotipos llegaron a una asíntota para casi todos los marcadores, lo cual es evidencia de que se tiene un tamaño de muestra adecuado para realizar análisis genético-poblacionales con el número de secuencias obtenidas y el número de genes utilizados (Lande, 1981).

Los valores del índice de fijación ( $F_{ST}$ ) pareados entre sitios, resultaron muy variables entre marcadores. Basándose en los valores  $F_{ST}$  de Ant.389 y Ant.202 se podría sugerir que no hay una estructura genética bien definida. Sin embargo, los valores de  $F_{ST}$  de marcadores como Ant.1076 y Ant.1281 son altos, lo que indicaría que existe diferenciación genética entre la mayoría de las poblaciones, a excepción de Guerrero Negro con Punta Abreojos. Lo anterior se podría deber a que cada región intrónica tiene su propia tasa de variación y, por lo tanto, cada intrón varía a un ritmo diferente, por lo que algunos tienen la capacidad de acumular muchas mutaciones en el mismo tiempo que otros apenas mutan (Gilbert, 1987; Lessa, 1992;

Chorev y Carmel, 2012). La nula estructura genética del gen COI (valores  $F_{ST}$  de 0) podría deberse a la baja diversidad haplotípica presente en la especie *M. sp. BCA-2* por el tamaño relativamente corto (en pares de bases) del marcador, que la diferenciación es indetectable por el estadístico  $F_{ST}$ .

Los resultados obtenidos de los análisis genéticos de poblaciones basados en un solo marcador molecular (Tabla 4 y 5, Figura 3) deben tomarse con cierta cautela. Como se observa, no existe una congruencia entre los diferentes marcadores, es decir que cada marcador molecular cuenta con su propia información y son de tamaños muy diferentes. Además, debido al tipo de reproducción de las hormigas (Hölldobler y Wilson, 1990), la información obtenida por genes nucleares y mitocondriales por separado puede estar sesgada por la dispersión diferencial entre las hembras y los machos (Goodisman y Ross 1998; Liautard y Keller 2001; Ross, 2001; Doums et al, 2002), dependiendo de la capacidad de dispersión de cada uno, por lo que en este caso se tendrían que corroborar los resultados con más análisis. A pesar de lo anterior, algunos marcadores presentan ciertas características concordantes, como lo es la detección de haplotipos únicos en las poblaciones o los pocos pasos mutacionales entre los distintos haplotipos.

En contraste, con los análisis basados en el conjunto de marcadores tanto nucleares como mitocondriales (Figuras 4, 5 y 6) se obtuvieron resultados más robustos y confiables (Kawakami et al, 2007). En este sentido, dichos análisis permitieron dilucidar información importante, como los es la cantidad de poblaciones de *M. sp. BCA-2* utilizando métodos Bayesianos (Pritchard et al, 2000), el tamaño efectivo de cada población y el flujo génico significativo entre poblaciones bajo un modelo de aislamiento con migración (Hey et al, 2018).

El hecho de que en el análisis de clusters realizado en Structure se haya encontrado un DeltaK de 3 y no de 4, como se esperaba originalmente en la hipótesis, indica que las dunas costeras de Guerrero Negro y Punta Abreojos contienen a la misma población o que el flujo génico entre ellas es considerablemente alto, sin embargo, en los resultados del análisis de Aislamiento con Migración del software IMA3 (Hey et al, 2018) no se observa flujo génico estadísticamente significativo o por encima de 0.05 (Nielsen y Wakeley, 2001) entre ninguna localidad, lo que estaría sugiriendo que el flujo génico entre las dunas costeras de Guerrero Negro y Punta Abreojos es demasiado bajo como para ser detectado con estos métodos pero suficiente para ser considerado como una sola población. Además, Guerrero Negro y Punta Abreojos son los sitios con las poblaciones más grandes, lo cual contribuye a mantener poblaciones más homogéneas y reduce la posibilidad de cambios en frecuencias alélicas por procesos como la deriva génica (Futuyma, 1998).

### 4.3 Edades de divergencia

De acuerdo con las edades de divergencia obtenidas mediante el modelo de aislamiento con migración corrido en IMA3 (Hey et al, 2018), la población de Punta Mazo surgió a finales del interglaciar Günz-Mindel, ocurrido aproximadamente entre 600 y 580 mil años (KA) (Kukla, 1978, 2005). Los interglaciares traen consigo periodos cálidos que producen un aumento en el nivel del mar dependiendo de la cantidad de hielo que se haya acumulado durante la glaciación pasada, diversos estudios en diferentes puntos del mundo apuntan que en el interglaciar Münz-Mindel, las transgresiones marinas pudieron haber ocurrido hasta los 65 m.s.n.m (Kukla, 1978, 2005, Malpica et al, 1978). En Baja California, se tiene evidencia de que existió una serie de transgresiones en el periodo Cuaternario. Ortlieb (1978) realizó un estudio en la región de Baja California central (península de Vizcaíno) en donde detectó la presencia de depósitos de arenisca datados en el cuaternario, algunos a varios kilómetros de distancia de la costa y a alturas de hasta 30 m.s.n.m, sin embargo, también reporta que hay suficiente evidencia para afirmar que la península de Vizcaíno ha estado levantándose desde hace aproximadamente 100 KA.

Las edades de las poblaciones de *Myrmecocystus* sp. BCA2 se estimaron entre 587 y 30 KA, mientras que no se conoce bien las edades de las dunas costeras que habitan, salvo la de Guerrero Negro que ha sido estimada en 1,800 años por Inman y colaboradores (1966), con depósitos de paleodunas datadas al pleistoceno tardío, hace  $99.8 \pm 9.4$  miles de años (Peterson et al, 2017). La edad estimada de la población de *M. sp. BCA-2* en esa duna es de 30 mil años, por lo que el primer evento de colonización se dio cuando probablemente existía la paleoduna. Diversos estudios que analizan los sedimentos y las terrazas marinas de la línea costera de Baja California (Walker y Thompson, 1968, Rockwell et al, 1989; Muhs et al, 1992) comprueban que durante todo el pleistoceno (comienza hace 2.59 millones de años y termina hace 11,700 años) han ocurrido regresiones y transgresiones marinas, encontrando en algunos casos sedimento de alguna paleoduna costera ubicada a más de 30 m por encima del nivel actual del mar. Los estudios realizados en el Golfo de California y la costa del Pacífico muestran evidencia congruente que indican que el nivel medio del mar ha ido cambiando a lo largo de la historia de *M. sp. BCA-2*. Gracias a la evidencia de los cambios geológicos en la línea de costa en la península de Baja California, se sabe de la existencia de paleodunas costeras, lo que da sustento al posible escenario en donde las poblaciones de hormigas *M. sp. BCA-2* fueron cambiado su distribución a lo largo de su historia evolutiva, respondiendo a las distintas características que han tomado las dunas costeras a lo largo del tiempo.

Referente a la divergencia de la primera población de *M. sp. BCA-2* en Punta Mazo, es necesario considerar que en insectos sociales existen dos estrategias diferentes de establecer una nueva colonia (Cronin et al,

2013); La primera es mediante un vuelo nupcial en donde hembras y machos de diferentes hormigueros se aparean en un mismo evento masivo, que da como resultado una alta mezcla genética en la población (Ross y Shoemaker, 1997) y una dispersión a larga distancia. La segunda estrategia consiste en la dispersión terrestre por parte de una hembra que parte caminando acompañada de una fuerza obrera para establecer una nueva colonia, se ha reportado que esta estrategia trae consigo un aislamiento genético por distancia dentro de cada población, incrementando así la diferenciación genética entre poblaciones (Liautard y Keller, 2001; Clémencet et al, 2005, Eyer et al, 2017).

#### **4.4 Consideraciones finales**

La presencia de especies crípticas es un indicador para considerar otros métodos de identificación igual de accesibles que los basados en caracteres morfológicos, como por ejemplo la morfometría geométrica, la cual detecta cambios mínimos en los caracteres morfológicos de las especies (Galan, 2016, Csósz et al, 2021).

Cuando se estudien especies nuevas, es pertinente realizarle pruebas a un número reducido de individuos para evaluar la eficiencia de los marcadores moleculares a utilizar en las inferencias filogenéticas, esto debido a que los marcadores fueron probados en especies ya descritas, es decir, con sus características bien conocidas, lo que no se tiene con las especies nuevas o sin describir.

Los marcadores moleculares EPIC (Lessa, 1992; Stöher et al, 2013) son adecuados para dilucidar la estructura genética poblacional, sobre todo en aquellos análisis que involucren más de un solo marcador, como los realizados en el presente estudio en los softwares Structure e IMA3. Si se utilizan individualmente, los resultados obtenidos se deben tomar con mucha cautela debido a su gran variabilidad en tanto a la información que contienen.

#### **4.5 Perspectivas a futuro**

Retomando lo que ya se mencionó anteriormente por van Elst y colaboradores (2021), las revisiones del género *Myrmecocystus*, además de incluir más marcadores moleculares, también deben incluir ejemplares provenientes de más ecosistemas poco estudiados como lo son las dunas costeras (Jiménez et al, 2015). En general, las revisiones de taxones basadas en ecorregiones (por ejemplo) estarían sesgadas debido a la

presencia de hábitats únicos y, por sus características de tamaño reducido, no contemplados en la regionalización de algún lugar (como la realizada por González et al, 2010).

Como lo menciona MacArthur y Wilson (1963) “En biogeografía, una isla es todo hábitat propicio para cualquier especie rodeado de un entorno que no lo es”, desde este sentido, las dunas costeras representan un modelo de “isla biogeográfica” para especies adaptadas a estos hábitats y que les sea difícil sobrevivir en otro tipo de ecosistemas. Como estos hábitats hay muchos, desde charcos hasta altas cimas de montañas, donde pueden habitar especies endémicas y que podrían pasar desapercibidas por el simple hecho de estar embebidas dentro de un ecosistema mayor que se contemplaría como un área total de estudio, como puede ser el caso de una ecorregión. Si se les diera importancia a estos microhábitats (que podrían verse como islas biogeográficas) en estudios de biodiversidad (por ejemplo) se tendría un estimado más acertado sobre la realidad del ecosistema.

Al observar que visitando 7 dunas costeras de la península de Baja California y analizando la genética poblacional de una sola especie de hormiga, se tiene una primera evidencia de haber encontrado dos especies nuevas (sin describir) y una más sin registrar (*M. sp. BCA-2* que ya había sido registrada), la principal perspectiva que emana del presente estudio debería estar encaminada al estudio de la mirmecofauna en dunas costeras, por ejemplo, realizar una filogenia de todas las hormigas que habitan este tipo de ecosistemas en la península de Baja California (incluyendo las de la costa del Golfo de California) y, con ayuda del código de barras (COI), identificar todas aquellas especies que aún no han sido descubiertas ni registradas en el *Barcode of Life* (BOL).

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Las hormigas *Myrmecocystus* que habitan las dunas costeras del Pacífico bajacaliforniano forman dos clados independientes a las demás hormigas de este género utilizadas en este estudio, por lo tanto, se concluye que las dos especies, ambas sin describir, son endémicas de esta región (una entre las latitudes 30.424333° y 28.933796°, y la otra entre las latitudes 28.048205° y 26.719174).

Los marcadores EPIC en conjunto con el gen COI fueron útiles para determinar que existen tres poblaciones genéticamente distinguibles de *M. sp. BCA-2* que habitan las dunas costeras del Pacífico bajacaliforniano desde Punta Mazo hasta Punta Abrejos, las cuales están conformadas por: Población de Punta Mazo, Población de Santa Rosalíta y Población de Guerrero Negro con Punta Abrejos.

A pesar de que para ciertos marcadores hay haplotipos compartidos entre localidades, el flujo genético de las poblaciones entre dunas costeras es muy bajo (o tal vez nulo), por lo que, con las condiciones actuales, estas poblaciones están genéticamente aisladas una de la otra.

Los tiempos de divergencia y los eventos demográficos son sustentan que esta especie colonizó las dunas costeras del Pacífico bajacaliforniano a raíz de los procesos de glaciaciones e interglaciaciones del Cuaternario.

Los resultados de este trabajo representan una evidencia más de que el aislamiento geográfico de las dunas costeras promueve la divergencia entre poblaciones con el potencial de favorecer la especiación, por ejemplo, de hormigas, ofreciendo nuevos nichos, condiciones climáticas variables en distancias relativamente cortas y respuestas rápidas y sensibles de la biota ante los cambios ambientales.

## Literatura citada

- Ant Diversity. (s.f.) AntWeb. Version 8.97. California Academy of Science, Recuperado el día 3 de noviembre de 2023 en <https://www.antweb.org>.
- Avise, J. C. (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 312(1154), 325-342. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0011>.
- Avise, J. C. (1994). Molecular Markers, Natural History, and Evolution. *Chapman and Hall*. <https://doi.org/10.2307/3809697>.
- Avise, J. C. (2000). Phylogeography, the history and formation of species. *Harvard University Press*. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1nzfgj7>.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Niegel, J. E., Reeb, C. A, & Saunders, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489-522. <https://www.jstor.org/stable/2097141>.
- Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13(4), 729-744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x>.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16(1):37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>.
- Bolton, B. (1994). Identification Guide to the Ant Genera of the World. Harvard University Press. <https://www.hup.harvard.edu/catalog.php?isbn=9780674442801>.
- Bolton, B., Alpert, G., Ward, P. S., & Nasrecki, P. (2006). Bolton's Catalogue of ants of the world. Harvard University Press, CD-ROM. <https://scholar.harvard.edu/michaelfisher/publications/boltons-catalogue-ants-world>.
- Bonte, D., Dekoninck, W., Provoost, S., Cosijns, E., & Hoffmann, M. (2003). Microgeographical distribution of ants (Hymenoptera: Formicidae) in coastal dune grassland and their relation to the soil structure and vegetation. *Animal Biology* 54(4), 367-377. [https://brill.com/view/journals/ab/53/4/article-p367\\_5.xml?rskey=T2P7zT&result=1](https://brill.com/view/journals/ab/53/4/article-p367_5.xml?rskey=T2P7zT&result=1).
- Boulton, A. M., & Ward, P. S. (2002). Ants. En Case, T. J., Cody, M. L., & Ezcurra, E. (Eds.), *A new island biogeography of the Sea of Cortés* (pp. 112-128). Oxford University Press. <https://global.oup.com/academic/product/a-new-island-biogeography-of-the-sea-of-corts-9780195133462?cc=mx&lang=en&>.
- Brown, S. D. J., Collins, R. A., Boyer, S., Lefort, M., Malumbres-Olarte, J., Vink, C. J. & Cruickshank, R. H. (2012). "SPIDER: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding." *Molecular Ecology Resources*, 12, 562-565. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03108.x>.

- Cardoso, D. C., Cristiano, M. P., Heinze, J., & Tavares, M. G. (2014). A nuclear DNA based phylogeny of endemic sand dune ants of the genus *Mycetophylax* (Emery, 1913): how morphology is reflected in molecular data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 378-382. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.012>.
- Cardoso, D. C., Cristiano, M. P., Tavares, M. G., Schubart, C. D., & Heinze, J. (2015). Phylogeography of the sand dune ant *Mycetophylax simplex* along the Brazilian Atlantic Forest coast: remarkably low mtDNA diversity and shallow population structure. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), 1-13. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12862-015-0383-4>.
- Cardoso, S., Palencia, L., de Pancorbo, M. M., Quintana, J. C. L., & Lizasu, A. G. (2011). Análisis de ADN mitocondrial en los restos humanos de la cueva de Santimamiñe (Kortezubi, Bizkaia). *Kobie*, 1: 383-392. [https://www.bizkaia.eus/fitxategiak/04/ondarea/Kobie/PDF/7/Kobie\\_BAI\\_01\\_web-17.pdf?hash=f01f8d7feb024b6e93dd76d816e18367](https://www.bizkaia.eus/fitxategiak/04/ondarea/Kobie/PDF/7/Kobie_BAI_01_web-17.pdf?hash=f01f8d7feb024b6e93dd76d816e18367).
- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., Haddad, C. F., Rodrigues, M. T., & Moritz, C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, 323(5915), 785-789. [10.1126/science.1166955](https://doi.org/10.1126/science.1166955).
- Charif, D., & Lobry, J. (2007). "SeqinR 1.0-2: a contributed package to the R project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis." In Bastolla U, Porto M, Roman H, Vendruscolo M (eds.), *Structural approaches to sequence evolution: Molecules, networks, populations, series Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*, (pp. 207-232). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-35306-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-35306-5_10).
- Chen, X., Adams, B., Bergeron, C., & Insect Conserv, J. (2015). Ant community structure and response to disturbances on coastal dunes of Gulf of Mexico, *Journal of Insect Conservation*, 19, 1. <https://doi.org/10.1007/s10841-014-9722-9>.
- Chen, Y., & Zhou, S. (2017) Phylogenetic relationships based on DNA barcoding among 16 species of the ant genus *Formica* (Hymenoptera: Formicidae) from China. *Journal of Insect Science*, 17: 117. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex092>.
- Clémencet, J., Viginier, B., & Doums, C. (2005). Hierarchical analysis of population genetic structure in the monogynous ant *Cataglyphis cursor* using microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*, 14(12), 3735-3744. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02706.x>.
- Cronin, A. L., Molet, M., Doums, C., Monnin, T., & Peeters, C. (2013). Recurrent evolution of dependent colony foundation across eusocial insects. *Annual Review of Entomology*, 58, 37-55. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153643>.
- Csősz, S., Seifert, B., Mikó, I., Boudinot, B. E., Borowiec, M. L., Fisher, B. L., Prebus, M., Puniamoorthy, J., Rakotonirina, J. C., Rasoamanana, N., Schultz, R., Trietsch C., Ulmer, J. M., & Elek, Z. (2021). Insect morphometry is reproducible under average investigation standards. *Ecology and evolution*, 11(1), 547-559. <https://doi.org/10.1002/ece3.7075>.
- Cuautle, M., Rico-Gray, V., & Diaz-Castelazo, C. (2005). Effects of ant behavior and presence of extrafloral nectaries on seed dispersal of the Neotropical myrmecochore *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 86(1),67–77. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00525.x>.

- Doums, C., Cabrera, H., & Peeters, C. (2002). Population genetic structure and male-biased dispersal in the queenless ant *Diacamma cyaneiventre*. *Molecular Ecology*, 11(11), 2251-2264. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01619.x>.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- Eyer, P. A., Seltzer, R., Reiner-Brodetzki, T., & Hefetz, A. (2017). An integrative approach to untangling species delimitation in the *Cataglyphis bicolor* desert ant complex in Israel. *Molecular phylogenetics and evolution*, 115, 128-139. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.07.024>.
- Fisher, B. L., & Cover, S. P. (2007). *Ants of North America: a guide to the genera*. University of California Press. <https://www.ucpress.edu/book/9780520254220/ants-of-north-america>.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5):294–299. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7881515/>.
- Futuyma, D. J. (1998). *Evolutionary biology* (3<sup>rd</sup> ed). Sinauer Associates, Inc. & Publishers, Massachusetts. <http://pi.lib.uchicago.edu/1001/cat/bib/2847468>.
- Galan, A. L. (2016). Morfometría geométrica: el estudio de la forma y su aplicación en biología. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 19(55), 53-59. [https://www.utm.mx/edi\\_anteriores/temas55/index.html](https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas55/index.html).
- Garrido-Pérez, E. I. (2020). La Biogeografía de Islas: herramienta científica y tecnológica de lo microscópico a lo universal. *Investigación y Pensamiento Crítico*. 8(1), 84. <https://doi.org/10.37387/ipc.v8i1.128>.
- Guenard, B., Weiser, M. D., Gomez, K., Narula, N., & Economo, E. P. (2017). The Global Ant Biodiversity Informatics (GABI) database: synthesizing data on the geographic distribution of ant species (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News/Osterreichische Gesellschaft für Entomofaunistik*, 24, 83-89. <https://oist.repo.nii.ac.jp/records/196>.
- Gilbert, W. (1987). The exon theory of genes. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (52), 901-905. [10.1101/SQB.1987.052.01.098](https://doi.org/10.1101/SQB.1987.052.01.098).
- González-Abraham, C. E., Garcillán, P. P., & Ezcurra, E. (2010). Ecorregiones de la península de Baja California: Una síntesis. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (87), 69-82. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0366-21282010000200006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-21282010000200006&lng=es&tlng=es).
- Goodisman, M. A. D., & Ross, K. G. (1998). A test of queen recruitment models using nuclear and mitochondrial markers in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Evolution*, 52, 1416–1422. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb02023.x>.
- Gradstein, F., & Ogg, J. (2004). Geologic time scale 2004—why, how, and where next!. *Lethaia*, 37(2), 175-181. <https://doi.org/10.1080/00241160410006483>.
- Graur, D., & Li, W. H. (2000). *Fundamentals of Molecular Evolution* (2<sup>nd</sup> ed). Massachusetts, Sunderland, 481 p. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.0728d.x>.
- Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 290-302. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.959891>.

- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270, S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>.
- Hedrick, P. W. (2009). *Genetics of populations*. Jones & Bartlett Publishers. <https://www.jblearning.com/catalog/productdetails/9780763757373>.
- Hey, J., & Nielsen, R. (2004). Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167, 747–760. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.024182>.
- Hey, J., Chung, Y., Sethuraman, A., Lachance, J., Tishkoff, S., Sousa, V. C., & Wang, Y. (2018). Phylogeny estimation by integration over isolation with migration models. *Molecular biology and evolution*, 35(11), 2805-2818. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy162>.
- Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). *The ants*. Harvard University Press. <https://www.hup.harvard.edu/catalog.php?isbn=9780674040755>.
- Inman, D. L., Ewing, G. C., & Corliss, J. B. (1966). Coastal sand dunes of Guerrero Negro, Baja California, Mexico. *Geological Society of America Bulletin*, 77(8), 787-802. [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(1966\)77\[787:CSDOGN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(1966)77[787:CSDOGN]2.0.CO;2).
- Jiménez-Osorio, O., Espejel, I., y Martínez, M. L. (2015). La investigación científica sobre dunas costeras de México: origen, evolución y retos. *Revista mexicana de biodiversidad*, 86(2), 486-507. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.04.022>.
- Johnson, R. A., & Ward, P. S. (2002). Biogeography and endemism of ants (Hymenoptera: Formicidae) in Baja California, Mexico: a first overview. *Journal of Biogeography*, 29(8), 1009-1026. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2002.00746.x>.
- Jombart, T. (2008). “Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers.” *Bioinformatics*, 24, 1403-1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>.
- Jombart, T., & Ahmed, I. (2011). Adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070-3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>.
- Katoh, K., Asimenos, G. & Toh, H. (2009). Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. In *Bioinformatics for DNA sequence analysis*. Humana Press, 39-64. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-59745-251-9.pdf>.
- Kawakami, K., Dovidio, J., & Van Kamp, S. (2007). The impact of naïve theories related to strategies to reduce biases and correction processes on the application of stereotypes. *Group Processes and Inter-Group Relations*, 10, 141–158. <https://doi.org/10.1177/1368430207074725>.
- Kronauer, D. J. C., Hölldobler, B., & Gadau, J. (2004). Phylogenetics of the new world honey ants (genus *Myrmecocystus*) estimated from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(1), 416-421. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.03.011>.
- Kukla, G. (1978). The classical European glacial stages: correlation with deep-sea sediments. *Transactions of the Nebraska Academy of Sciences and Affiliated Societies*, 334(6) <https://digitalcommons.unl.edu/tnas/334/>.

- Kukla, G. (2005). Saalian supercycle, Mindel/Riss interglacial and Milankovitch's dating. *Quaternary Science Reviews*, 24(14-15), 1573-1583. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2004.08.023>.
- Lande, R. (1981). The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics*, 99(3-4), 541-553. <https://doi.org/10.1093/genetics/99.3-4.541>.
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2017). PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 34(3), 772-773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>.
- Larson, R. L., Menard, H. W., & Smith, S. M. (1968). Gulf of California: A result of ocean-floor spreading and transform faulting. *Science*, 161, 781-784. [10.1126/science.161.3843.781](https://doi.org/10.1126/science.161.3843.781).
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in ecology and evolution*, 6(9), 1110-1116. <https://popart.maths.otago.ac.nz/>.
- Lessa, E.P. (1992). Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 323-330. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040723>.
- Liautard, C., & Keller, L. (2001). Restricted effective queen dispersal at a microgeographic scale in polygynous populations of the ant *Formica exsecta*. *Evolution*, 55(12), 2484-2491. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00763.x>.
- MacArthur, R. H., & Wilson, E. O. (1963). The theory of island biogeography. Princeton. <https://press.princeton.edu/books/paperback/9780691088365/the-theory-of-island-biogeography>.
- Malpica-Cruz, V. M., Ortlieb, L., y Castro del Rio, A. (1978). Transgresiones cuaternarias en la costa de Sonora. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 2(1), 90-97. <http://satori.geociencias.unam.mx/index.php/rmcg/article/view/1473>.
- Martínez, M. L. (2009). Las playas y las dunas costeras: un hogar en movimiento. México: Fondo de Cultura Económica. <https://www.fondodeculturaeconomica.com/Ficha/9786071601513/F>.
- Martínez, M. L., & Psuty, N. P. (2004). Coastal dunes. Springer Verlag. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-540-74002-5>.
- Maun, M. A. (2009). The Biology of Coastal Sand Dunes. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198570356.001.0001>.
- Mehdiabadi, N. J., Mueller, U. G., Brady, S. G., Himler, A. G., & Schultz, T. R. (2012). Symbiont fidelity and the origin of species in fungus-growing ants. *Nature Communications*, 3(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/ncomms1844>.
- Moore, D. G., & Buffington, E. C. (1968) Transform faulting and growth of the Gulf of California since the late Pliocene. *Science*, 161, 1238-1241. [10.1126/science.161.3847.1238](https://doi.org/10.1126/science.161.3847.1238).
- Morrone, J. J. (2019). Regionalización biogeográfica y evolución biótica de México: encrucijada de la biodiversidad del Nuevo Mundo. *Revista mexicana de biodiversidad*, 90. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2980>.

- Morrone, J. J., Escalante, T., & Rodriguez-Tapia, G. (2017). Mexican biogeographic provinces: Map and shapefiles. *Zootaxa*, 4277(2), 277-279. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4277.2.8>.
- Muhs, D. R., Rockwell, T. K., & Kennedy, G. L. (1992). Late Quaternary uplift rates of marine terraces on the Pacific coast of North America, southern Oregon to Baja California Sur. *Quaternary International*, 15, 121-133. [https://doi.org/10.1016/1040-6182\(92\)90041-Y](https://doi.org/10.1016/1040-6182(92)90041-Y).
- Ng'endo, R. N., Osiemo, Z.B., Brandl, R., Kondo, T. (2013) DNA barcodes for species identification in the hyperdiverse ant genus *Pheidole* (Formicidae: Myrmicinae). *Journal of Insect Science*, 13: 1–13. [10.1673/031.013.2701](https://doi.org/10.1673/031.013.2701).
- Nielsen, R., & Wakeley, J. (2001). Distinguishing migration from isolation: a Markov chain Monte Carlo approach. *Genetics*, 158(2), 885-896. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.2.885>.
- Noss, R. F. (1990). Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation biology*, 4(4), 355-364. <https://www.jstor.org/stable/2385928>.
- Ojha, R., Jalali, S. K., Ali, T. M., Venkatesan, T., Prosser, S. W., & Kumar, N. K. (2014). DNA barcoding of Indian ant species based on cox1 gene. *CSIR-NIScPR*, 13(2), 165-171. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/29137>.
- Oliveira, A. A., Campos, A. E. C., & Harakava, R. (2017). Genetic diversity of urban *Camponotus Mayr* (Hymenoptera: Formicidae) ants revealed by capture of alates and DNA sequencing. *Neotropical Entomology*, 46, 499-506. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0489-z>.
- Ortlieb, L. (1978). Reconocimiento de las terrazas marinas Cuaternarias en la parte central de Baja California. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 2(2), 200-211. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2230352>.
- Palumbi, S. R. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: *Hillis, D.M., Moritz, C., & Mable, B.K. (eds.). Molecular Systematics (2<sup>nd</sup> ed.)*. Sunderland, 205–247.
- Pedroza, D., Cid, A., García, O., Silva-Casarín, R., Villatoro, M., Delgadillo, M. A., e Infante-Mata, D. (2013). Manejo de ecosistemas de dunas costeras, criterios ecológicos y estrategias. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, DF, México. <https://ciencias.ens.uabc.mx/documentos/libros/LibroDunasCosteras.pdf>.
- Penck, A., & Bruckner, E. (1909). Die Alpen im Eiszeitalter. *Tauchnitz*, 3, 1199. <https://www.jstor.org/stable/30057972>.
- Peterson, C. D., Murillo-Jiménez, J. M., Stock, E., Price, D. M., Hostetler, S. W., & Percy, D. (2017). Origins of late-Pleistocene coastal dune sheets, Magdalena and Guerrero Negro, from continental shelf low-stand supply (70–20 ka), under conditions of southeast littoral-and eolian-sand transport, in Baja California Sur, Mexico. *Aeolian Research*, 28, 13-28. <https://doi.org/10.1016/j.aeolia.2017.07.003>.
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS one*, 7(5), 37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>.

- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>.
- Team, R. C. (2020). R Core Team R: a language and environment for statistical computing. *Foundation for Statistical Computing*. <https://www.r-project.org/>.
- Rambaut, A. (2007). FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rockwell, T. K., Muhs, D. R., Kennedy, G. L., Hatch, M. E., Wilson, S. H., & Klinger, R. E. (1989). Uranium-series ages, faunal correlations and tectonic deformation of marine terraces within the Agua Blanca fault zone at Punta Banda, northern Baja California, Mexico. En: Abbott, P.L. (Ed.), *Geologic Studies in Baja California*. Pacific Section, Society of Economic Paleontologists and Mineralogists Book 63, (pp. 1–16). [https://archives.datapages.com/data/pac\\_sepm/080/080001/pdfs/1.htm](https://archives.datapages.com/data/pac_sepm/080/080001/pdfs/1.htm).
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Ross, K. G. (2001). Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology*, 10, 265–284. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01191.x>.
- Ross, K.G., & Shoemaker, D. D. (1997). Nuclear and mitochondrial genetic structure in two social forms of the fire ant *Solenopsis invicta*: insights into transitions to an alternate social organization. *Heredity*, 78(6), 590-602. <https://doi.org/10.1038/hdy.1997.98>.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.
- Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., & Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1805-1811. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1730>.
- Schmidt, C. (2013). Molecular phylogenetics of ponerine ants (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Zootaxa*, 3647(2), 201-250. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3647.2.1>.
- Sequencher version 5.4.6, DNA sequence analysis software. (2018). Ann Arbor, MI USA: Gene Codes Corporation. <https://www.genecodes.com/>.
- Serracanta Fernández, M. (2022). COI DNA barcoding in ants, keystones of the global Earth ecosystem. Universitat Autònoma de Barcelona [https://ddd.uab.cat/pub/tfg/2022/263034/SerracantaFernandez\\_TFG.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tfg/2022/263034/SerracantaFernandez_TFG.pdf).
- Shoemaker, D. D., Ahrens, M. E., & Ross, K. G. (2006). Molecular phylogeny of fire ants of the *Solenopsis saevissima* species-group based on mtDNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 38(1), 200-215. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.07.014>.

- Siddiqui, J. A., Chen, Z., Li, Q., Deng, J., Lin, X., & Huang, X. (2019). DNA barcoding of aphid-associated ants (Hymenoptera, Formicidae) in a subtropical area of southern China. *ZooKeys*, 879, 117. <https://doi.org/10.3897/zookeys.879.29705>.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction "primers". *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651- 701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>.
- Slade, R. W., Moritz, C., Heideman, A., & Hale, P. T. (1993). Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species. *Molecular Ecology*, 2, 359–373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00029.x>.
- Snelling, R. R. (1976). A revision of the honey ants, genus *Myrmecocystus* (Hymenoptera: Formicidae). *Natural History Museum of Los Angeles County Science Bulletin*. 24, 163". [https://archive.org/details/ants\\_02724/2724/mode/2up](https://archive.org/details/ants_02724/2724/mode/2up).
- Snelling, R. R. (1982). A revision of the honey ants, genus *Myrmecocystus*, first supplement (Hymenoptera: Formicidae). *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*, 81(2), 69-86. <http://antbase.org/ants/publications/publications/2728/2728.pdf>.
- Solomon, S. E., Bacci, Jr. M., Martins, Jr. J., Vinha, G. G., & Mueller, U. G. (2008). Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. *PloS one*, 3(7), e2738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002738>.
- Stephens, M., Smith, N. J., Donnelly, P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics* 68:978–989. DOI: 10.1086/319501.
- Stephens, M., & Donnelly, P. (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *The American Journal of Human Genetics*, 73(5). DOI:10.1086/379378.
- Stock, J. M., & Hodges, K. V. (1989). Pre-Pliocene extension around the Gulf of California and the transfer of Baja California to the Pacific plate. *Tectonics*, 8(1), 99-115. <https://doi.org/10.1029/TC008i001p00099>.
- Ströher, P. R., Li, C., & Pie. M. R. (2013). Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers as a tool for ant phylogeography. *Revista Brasileira de Entomologia*, 57, 427-430. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262013005000039>.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38:3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- van Elst, T., Eriksson, T. H., Gadau, J., Johnson, R. A., Rabeling, C., Taylor, J. E., & Borowiec, M. L. (2021). Comprehensive phylogeny of *Myrmecocystus* honey ants highlights cryptic diversity and infers evolution during aridification of the American Southwest. *Molecular phylogenetics and evolution*, 155, 107036". <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.107036>.
- Wang, W. Y., & Yamane, S. (2017). First record of a New World ant species (Hymenoptera: Formicidae), *Strumigenys eggersi* Emery, 1890 in the Old World. *BioInvasions Record*, 6(3). <https://doi.org/10.3391/bir.2017.6.3.03>.

- Walker, T. R., & Thompson, R. W. (1968). Late Quaternary geology of the San Felipe area, Baja California, Mexico. *The Journal of Geology*, 76(4), 479-485. <https://doi.org/10.1086/627346>.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1358-1370. <https://doi.org/10.2307/2408641>.

## Anexos

### Anexo 1 Tabla de cebadores

**Tabla 6.** Cebadores basados en Ströher (2013) probados en *Myrmecocystus* sp. BCA-2.

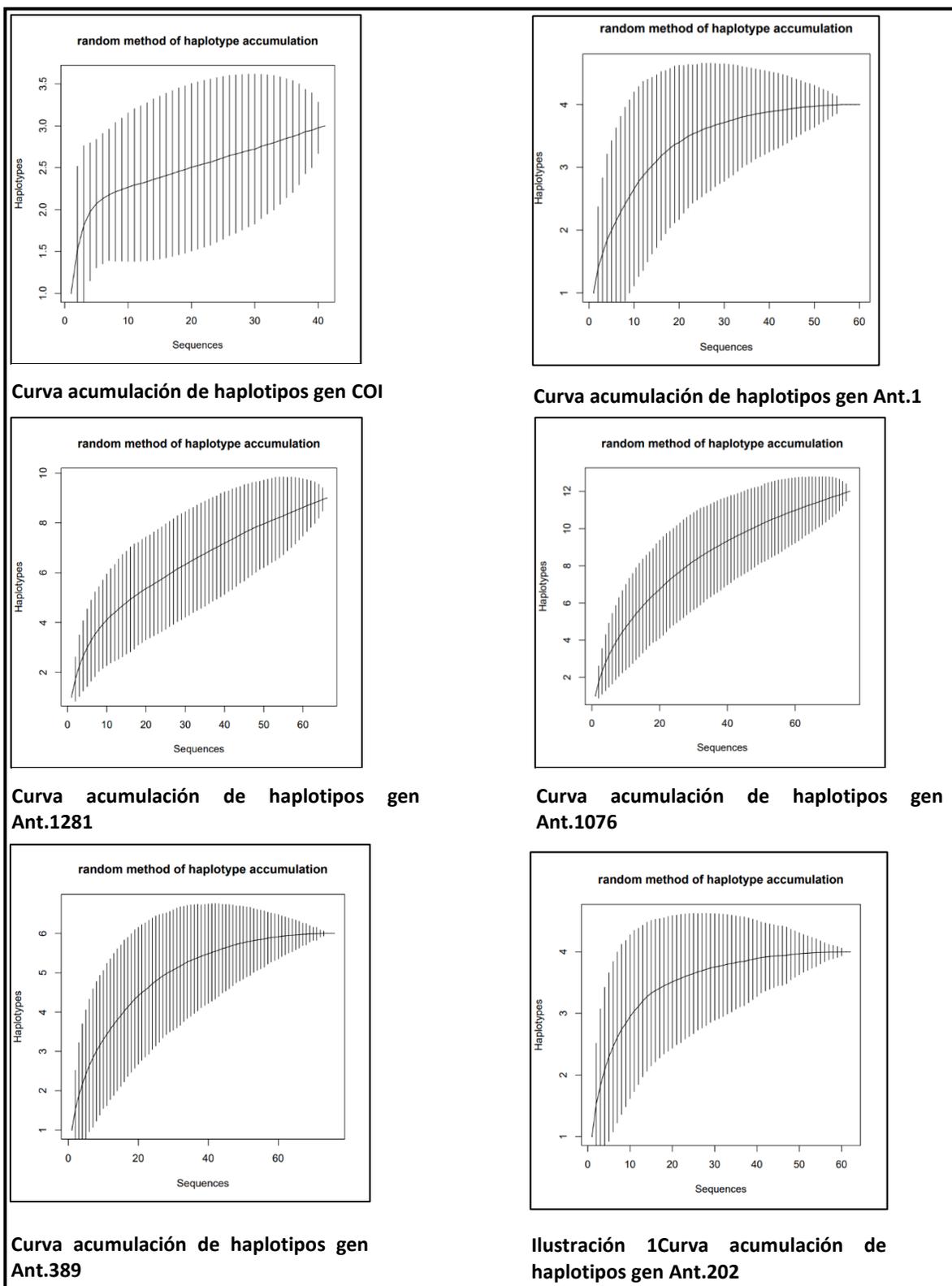
<b>Marcador</b>	<b>Calidad de producto de PCR</b>
<b>Ant.1</b>	Bien
<b>Ant.1076</b>	Bien
<b>Ant.1087</b>	Mal
<b>Ant.1225</b>	Mal
<b>Ant.1281</b>	Bien
<b>Ant.1401</b>	Mal
<b>Ant.1503</b>	Mal
<b>Ant.202</b>	Bien
<b>Ant.263</b>	Mal
<b>Ant.346</b>	Bien
<b>Ant.384</b>	Mal
<b>Ant.389</b>	Mal
<b>Ant.505</b>	Mal
<b>Ant.839</b>	Mal
<b>Ant.965</b>	Mal

## **Anexo 2. Proceso de elaboración del gel de agarosa para electroforesis**

El proceso consistió en:

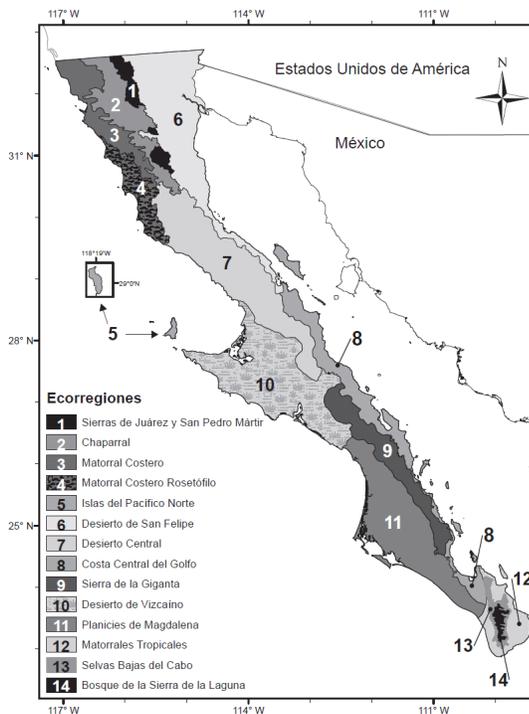
- 1) Mezclar los dos compuestos (TAE 1X y la agarosa) y posteriormente calentarlos utilizando un microondas hasta el punto de ebullición.
- 2) Una vez en este punto, con la ayuda de un guante resistente al calor, se agita suavemente el líquido obtenido y se vuelve a calentar. Se repite este proceso durante 30 segundos hasta que el líquido se vea totalmente lisado.
- 3) Se deja enfriar por 10 minutos antes de verterse en la cama previamente nivelada y con los formadores de pozos ya puestos.
- 4) Una vez enfriado y gelificado, se retiran los formadores de pozos y se pone el gel en la cámara de electroforesis con solución TAE 1X a ras del gel.

### Anexo 3. Curvas de acumulación de los haplotipos mitocondriales y nucleares.

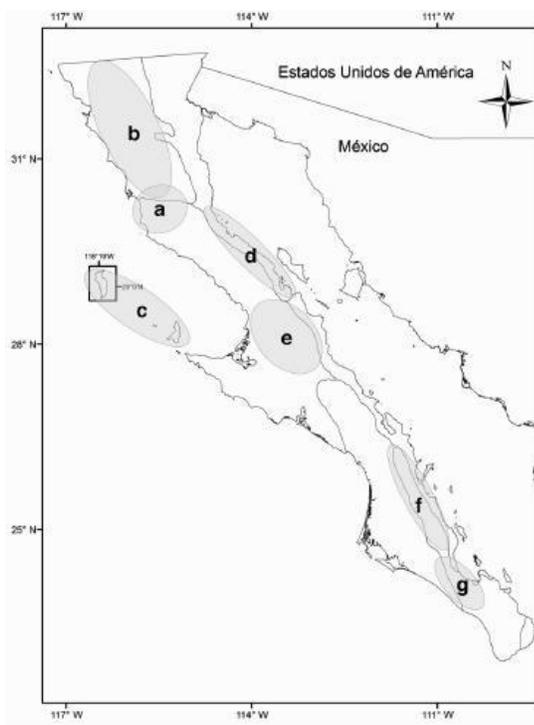


**Figura 7.** Curvas de acumulación de haplotipos calculadas con diferentes paqueterías de R y para cada marcador molecular.

## ANEXO 4. Ecorregiones de Baja California

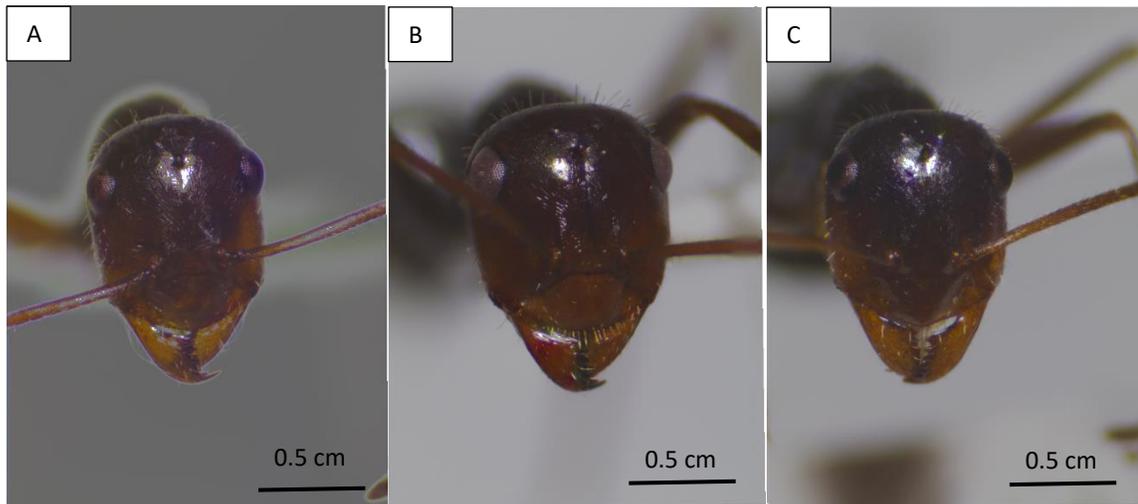


**Figura 8.** Propuesta sintética de las ecorregiones de Baja California, obtenido de González et al, (2010).



**Figura 9.** Principales zonas de discrepancia en las regionalizaciones biológicas de la península de Baja California: a) Transición región mediterránea a desértica, b) Sub-regionalización mediterránea, c) grandes islas del Pacífico Norte, d) Transición de los desiertos costeros del Golfo de California, e) Transición del centro peninsular, f) Singularidad de la Sierra de la Giganta y g) Transición región tropical desértica.

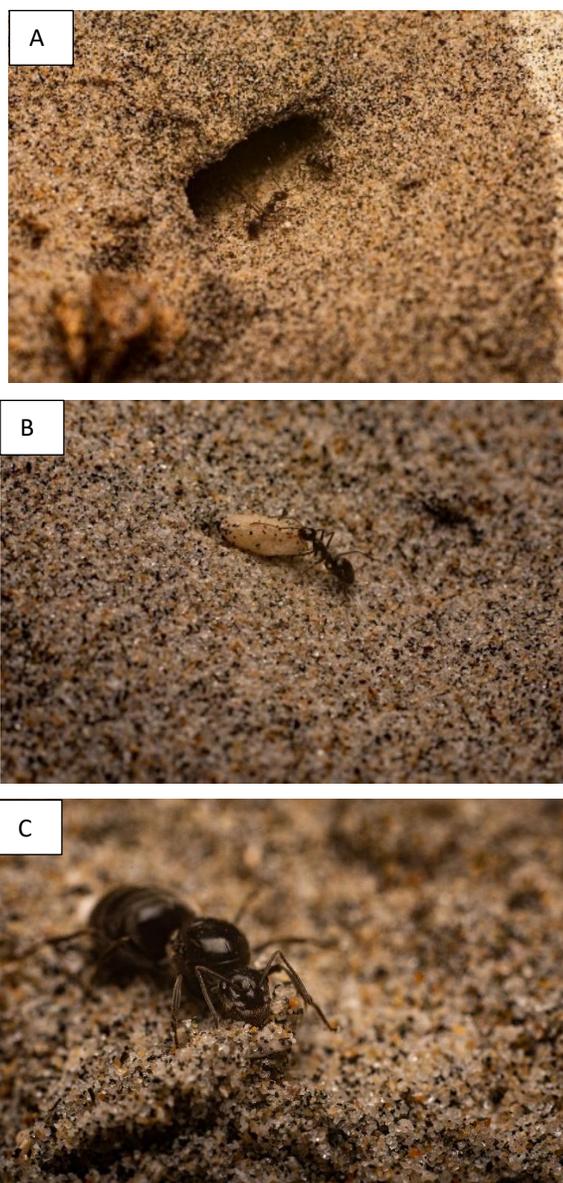
**ANEXO 5. Imágenes de las *Myrmecocystus* capturadas en las dunas costeras del Pacífico Bajacaliforniano.**



**Figura 10.** Imágenes de *Myrmecocystus* sp. BCA-2 tomadas con una cámara marca Nikon® modelo “SMZ 745T” montada en un microscopio estereoscópico y con el software INFINITY CAPTURE 6.3.2. A) *Myrmecocystus* capturada en Bahía Magdalena, emparentada con las capturadas en Las Barrancas a excepción de, B) Individuo 12 capturada en Las Barrancas, no se emparentó con las demás capturadas en ese sitio y en Bahía Magdalena, en contraste, al parecer es una especie hermana de *Myrmecocystus mimicus*. C) *Myrmecocystus* sp. BCA-2 capturada en Punta Mazo, Santa Rosalita, Guerrero Negro y Punta Abrejos.



**Figura 11.** Vista de perfil de la hormiga *Myrmecocystus* sp. BCA-2.



**Figura 12.** Fotografías de *Myrmecocystus* sp. BCA-2 tomadas en campo por el Biólogo Arturo Sandoval (UABC). A) Obreras fuera del hormiguero. B) Obrera cargando una larva. C) Reina sin alas capturada durante una excavación de nido.