

## Accediendo al pasado: uso de especímenes de colección como fuentes de información genética para el género *Bombus* (Hymenoptera: Apidae)

Ingrid A. Lotta-Arévalo<sup>1\*</sup>, Mario Vargas-Ramírez<sup>2\*</sup>, Guiomar Nates-Parra<sup>3</sup>, Nubia E. Matta<sup>1</sup> & Rodulfo Ospina Torres<sup>3</sup>

1. Grupo de Investigación Caracterización Genética e Inmunología, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia; ialotaa@unal.edu.co, nemattac@unal.edu.co
2. Grupo de Biodiversidad y Conservación Genética, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia; maavargasra@unal.edu.co
3. Laboratorio de Investigaciones en Abejas-LABUN, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia; mgnatesp@unal.edu.co, rospinat@unal.edu.co

\* Correspondencia

Recibido 27-X-2019. Corregido 16-IX-2019. Aceptado 19-II-2020.

**ABSTRACT. Accessing the past: use of collection specimens as sources of genetic information for the genus *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) in Colombia. Introduction:** The use of museum specimens as a source of genetic information to develop studies that resolve taxonomic, ecological, demographic, and evolutionary questions at various temporal and geographic scales, has recently become relevant. However, genetic material obtained from specimens deposited in biological collections is not used frequently due to the natural deterioration of the DNA preserved in these specimens. Getting quality genetic material is demanding in terms of time and money. **Objective:** By using museum material, to identify a mini-barcode sequence that can be used in the taxonomic determination and provides information that allows the estimation of phylogenetic relationships of species of the genus *Bombus*. **Methods:** the DNA extraction protocol for museum samples was standardized using the mesothoracic right leg and / or a sample of thoracic muscle of 96 specimens deposited in the LABUN collection between 7 and 38 years ago. Different combinations of oligonucleotides allowed to amplify fragments from 152 to 407 base pairs (bp) of the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I (COI). Using as a template a group of 31 sequences amplified from recently collected specimens, the fragments obtained from the museum specimens were assembled and analyzed in a phylogenetic framework. Additionally, a haplotype network analysis was performed in order to evaluate in detail the relationships between the resulting mitochondrial haplotypes. **Results:** The greatest success of DNA extraction was achieved from limb samples deposited since the year 1982 on. Meanwhile, successful amplification of fragments longer than 300 base pairs (bp) was achieved mostly in samples deposited on dates after 1999, which indicates greater integrity of the genetic material recovered from individuals of 19 years of collection and onwards. Although all the fragments evaluated can be used as mini-barcode, only with one primer pair, it was possible to obtain a topology similar to that observed with the complete fragment. A large genetic variation was detected, particularly within the *Bombus atratus* and *B. funebris* species, in which a clear phylogeographic structure was revealed. **Conclusions:** New barcode sequences were obtained through DNA extraction and amplification protocol from museum samples. Furthermore, new information on intraspecific genetic variability was generated, detecting the presence of unique mitochondrial haplotypes that could constitute management units subject of conservation. Such information is of vital importance to formulate conservation strategies for these pollinators in Colombia.

**Key words:** *Bombus*, Neotropic, Cytochrome Oxidase I, mini barcode, biological collections.

Lotta-Arévalo, I.A., Vargas-Ramírez, M., Nates-Parra, G., Matta, N.E., & Ospina Torres, R. (2020). Accediendo al pasado: uso de especímenes de colección como fuentes de información genética para el género *Bombus* (Hymenoptera: Apidae). *Revista de Biología Tropical*, 68(2), 394-414.

La correcta determinación de las poblaciones e individuos bajo la categoría taxonómica de especie es fundamental en la resolución de preguntas sobre la historia evolutiva, ecología, diversidad funcional, e impactos antrópicos sobre la distribución y diversidad de los organismos (Roy, Girman, Taylor, & Wayne, 1994; Cameron, Hines, & Williams, 2007; Hines, 2008; Condamine & Hines, 2015). Sin embargo, es de resaltar que una de las grandes limitantes para los estudios que conducen a responder las preguntas arriba mencionadas, son las cortas escalas temporales a las cuales se puede generar información empleando material recolectado de manera reciente, así como la baja cobertura a nivel geográfica de los estudios (Wandeler, Hoeck, & Keller, 2007). Es así como las colecciones biológicas revisten gran importancia como fuente de información histórica, geográfica y ecológica de los organismos, muchos de ellos especímenes raros o capturados en áreas de difícil acceso, o incluso que por cambios antrópicos, desaparecieron (Gilbert, Moore, Melchior, & Worobey, 2007; Wandeler et al., 2007). Las colecciones no solo constituyen un repositorio de datos morfológicos de los especímenes allí preservados, sino también de la información genética en cada uno de ellos (Mitchell, 2015). A través de la integración de la información morfológica y molecular que proveen las colecciones biológicas es posible la resolución de complejos de especies (Hausmann et al., 2009), detectar la aparición de rasgos genéticos y/o morfológicos que confieren ventajas evolutivas (ej. resistencia a insecticidas) y determinar diversidad y distribución histórica de poblaciones, y de este modo evaluar el efecto de variables como el cambio climático o la actividad antrópica sobre dichas especies (Wandeler et al., 2007).

No obstante lo anterior, el potencial de las colecciones biológicas como proveedoras de información genética de los individuos allí preservados ha sido subutilizada debido a la dificultad en la extracción de material genético de calidad de los especímenes (Mitchell, 2015; Sproul & Maddison, 2017). A partir de la toma de una muestra de un espécimen, o la muerte

del mismo, inicia un proceso de degradación del ADN, que dificulta su uso apropiado en estudios genéticos (Zimmermann et al., 2008). Investigaciones empleando muestras depositadas en colecciones biológicas han tenido resultados variables en cuanto al éxito en la amplificación de marcadores moleculares a partir de estos tejidos (Hausmann et al., 2009; Hebert, et al., 2013; Mitchell, 2015), que se ve influenciado por el tamaño de la muestra almacenada, el medio de preservación empleado, la edad del tejido o los métodos empleados para la eliminación de plagas al interior de la colección (Ackery, Testa, Ready, Doyle, & Pinniger, 2004; Bisanti, Ganassi, & Mandrioli, 2009; Hebert et al., 2013). Particularmente en el caso de los insectos montados en alfileres entomológicos, en seco sin ningún medio adicional de preservación, el ADN se deteriora en un lapso de pocos años siendo adecuado para estudios moleculares por un periodo de entre 10 a 15 años posterior al depósito del espécimen en la colección (Hernández-Triana et al., 2014), periodo a partir del cual el éxito de amplificación se reduce drásticamente (Zimmermann et al., 2008). De este modo y teniendo en cuenta las limitaciones del uso de muestras de colección en la obtención de información genética, recientes estudios proponen la implementación de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) (Sproul & Maddison, 2017), como la piro-secuenciación (Shokralla et al., 2011), así como diferentes modificaciones de los protocolos de PCR (Mitchell, 2015). Esto último, ha permitido la obtención de fragmentos cortos de ADN conocidos como mini-barcodes, que pueden ser ensamblados para la obtención de secuencias del código de barras completas (p. ej. Strutzenberger, Brehm, & Fiedler, 2012; Françoise & Arias, 2013; Hebert et al., 2013), o empleadas de manera independiente en la determinación molecular de especímenes con alta degradación del material genético (ver Hajibabaei et al., 2006, Hernández-Triana et al., 2014).

En la actualidad, los polinizadores se encuentran en estado de amenaza a nivel mundial debido a la intensificación de la

agricultura, el uso de pesticidas, el cambio climático, la destrucción de hábitat y la introducción de especies y patógenos exóticos (Potts et al., 2010). Particularmente para las abejas del género *Bombus*, en la actualidad se registra la pérdida de biodiversidad más grande en su historia evolutiva (Condamine & Hines, 2015). Este género cuenta con cerca de 265 especies reconocidas, que ocupan una gran diversidad de hábitats, desde praderas alpinas en el viejo mundo, hasta bosques tropicales (Williams & Jepsen, 2017).

En Colombia se registran nueve especies del género, que ocupan todos pisos altitudinales desde el nivel del mar hasta los 4800 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (Nates, 2004), sin embargo, existe una distribución diferencial de estas especies: Las de cara corta (*B. funebris*, *B. hortulanus*, *B. robustus*, *B. rubicundus*, y *B. melaleucus*) con excepción de *B. melaleucus*, son las más comunes en ecosistemas montañosos (a partir de los 2 100 m.s.n.m) y las especies de cara larga (*B. atratus*, *B. pullatus*, *B. excellens* y *B. transversalis*) presentes exclusivamente en tierras bajas (*B. transversalis*) o con un amplio rango altitudinal, aunque más frecuentes hacia la tierras bajas (*B. atratus*, *B. pullatus*, *B. excellens*) (Liévano, Ospina, & Nates, 1991). Las especies de cara corta residentes en alta montaña, así como *B. atratus* se constituyen como especies modelo para el estudio de la biología de estos organismos dada su abundancia y amplia distribución, mientras que *B. melaleucus*, y *B. excellens* son muy poco frecuentes (Osorno & Osorno, 1938; Pinilla-Gallego, Ospina, & Cure, 2017). A nivel de conservación, hasta el momento no existe un estimativo de la fluctuación de las poblaciones de estas especies. Sin embargo, a partir de registros realizados en el marco de los diferentes inventarios regionales se observa la desaparición de especies de abejorros de lugares donde estaban previamente reportados (Osorno & Osorno, 1938; Pinilla-Gallego et al., 2017), así como la contracción de las áreas de distribución. Una de las grandes dificultades para el desarrollo de estudios encaminados a determinar el estado de las poblaciones de

abejorros, así como de otras especies silvestres de abejas en Colombia es el desconocimiento de la diversidad (Pinilla-Gallego et al., 2017), para el caso particular de *Bombus* la diversidad intra-específica. Estudios realizados en Europa (ej. Lecocq et al., 2015; Lecocq et al., 2016a), en Asia (ej. Williams et al., 2012) y en algunos países de Sur América (ej. Françoso, Zuntini, Carnaval, & Arias, 2016), resaltan la importancia del conocimiento de la diversidad genética de las especies de *Bombus* en la determinación de las áreas reales de distribución, el estado de las poblaciones (Françoso, Zuntini, & Arias, 2019) y consecuentemente, en la formulación de políticas de manejo y protección de estas especies. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar y obtener una secuencia mini-barcode para uso en determinación taxonómica y estimación de relaciones filogenéticas de especies del género *Bombus*, usando muestras de tejido (musculo y/o extremidad derecha del mesotórax) de ejemplares depositados en la colección biológica Laboratorio de Investigaciones en Abejas de la Universidad Nacional de Colombia (LABUN) a partir de año 1980, en el marco de un proyecto de caracterización genética de abejorros en su distribución natural al interior de Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Especímenes analizados:** En el presente estudio se obtuvo información genética de dos grupos de muestras del género *Bombus*; el primer grupo se compone de especímenes de las especies *B. atratus*, *B. funebris*, *B. hortulanus*, *B. robustus* y *B. rubicundus* montados en alfiler entomológico previo sacrificio en cámara letal con Cianuro de Potasio, y preservados en seco en LABUN (en adelante muestras de museo), en un periodo de entre 7 a 38 años de antigüedad, recolectadas en las tres cordilleras de Colombia así como en los llanos Orientales (Tabla 1). El segundo grupo consiste en 31 muestras de las especies arriba mencionadas, recientemente recolectadas y de las que se obtuvieron secuencias del marcador COI. Los

TABLA 1

Secuencias obtenidas en el estudio. Se provee el número identificador de colección LABUN, la localidad de muestreo, la fecha de recolecta y el código GenBank de las secuencias obtenidas

TABLE 1

Sequences obtained in the study. The LABUN collection identification number, the sampling localities, the collection date and the GenBank code of the sequences obtained are provided

Especie	N° de Colección	Localidad	Cord.	Fecha	Tamaño amplificado	Positivos a partir de pata	Positivos a partir de musculo	N° GenBank
<i>Bombus atratus</i>	13*	Cauca. Inza Vda Tierras Blancas, 2 200 msnm	Central	1982	406 pb	-	ATRA8 <sup>3,4</sup>	MK544970
<i>Bombus hortulanus</i>	29*	Cauca. Inza Vda Tierras Blancas, 2 200 msnm	Central	1982	161 pb	-	X <sup>8</sup>	
<i>Bombus rubicundus</i>	81	Cundinamarca. Páramo San Cayetano, 3 650-3 690 msnm	Oriental	1983	108 pb	RUB19 <sup>8</sup>		MK544971
<i>Bombus atratus</i>	690*	Cundinamarca. Cabrera. Vía Peñas blancas, 1 950 msnm	Oriental	1983	98pb	-	ATRA <sup>8</sup>	MK544972
<i>Bombus hortulanus</i>	1 045	Cundinamarca. Subachoque, 2 600 msnm	Oriental	1985	364pb	ROB5 <sup>5,8</sup>		MK544973
<i>Bombus atratus</i>	1 111*	Cundinamarca. Subachoque, 2 600 msnm	Oriental	1985	369pb	X <sup>5</sup>		
<i>Bombus atratus</i>	1 112*	Cundinamarca. Subachoque, 2 600 msnm	Oriental	1985	137pb		ATRA2 <sup>8</sup>	MK544974
<i>Bombus funebris</i>	1 179	Cundinamarca. Páramo de Chizacá Laguna Negra, 3 780msnm	Oriental	1985	354 pb			
<i>Bombus hortulanus</i>	2 039*	Magdalena. Vía San Lorenzo, 1 900-2 000 msnm	Oriental	1987	357 pb		HOR2 <sup>5</sup>	MK544975
<i>Bombus hortulanus</i>	15 805*	Risaralda. PNN Tatamá, 3 579 msnm.	Occidental	1993	339pb		X <sup>5</sup>	
<i>Bombus hortulanus</i>	15 810*	Risaralda. PNN Tatamá, 3 579 msnm.	Occidental	1993	365pb	HOR2 <sup>5</sup>		MK544977
<i>Bombus funebris</i>	15 823	Cundinamarca. PNN Chingaza, 2 900-3 100 msnm	Oriental	2001	374pb	FUN1 <sup>5</sup>		MK544978
<i>Bombus funebris</i>	15 824	Cundinamarca. PNN Chingaza, 2 900-3 100 msnm	Oriental	2001	225pb	FUN8 <sup>5</sup>		MK544979
<i>Bombus funebris</i>	15 826	Cundinamarca. PNN Chingaza, 2 900-3 100 msnm	Oriental	2001	407pb	FUN7 <sup>7</sup>		MK544980
<i>Bombus rubicundus</i>	15 837	Cundinamarca. PNN Chingaza, 2 900-3 100 msnm	Oriental	2001	407pb	RUB110 <sup>7</sup>		MK544981
<i>Bombus rubicundus</i>	15 838	Cundinamarca. PNN Chingaza, 2 900-3 100 msnm	Oriental	2001	407pb	RUB19 <sup>7</sup>		MK544982
<i>Bombus rubicundus</i>	15 839	Cundinamarca. PNN Chingaza, 2 900-3 100 msnm	Oriental	2001	407pb	RUB11 <sup>7</sup>		MK544983
<i>Bombus robustus</i>	18094	Santander. Floridablanca. Casianoalto, 1 700 msnm	Oriental	2004	407pb	ROB4 <sup>7</sup>		MK544984
<i>Bombus hortulanus</i>	18 095*	Santander. Floridablanca. Casianoalto, 1 700 msnm	Oriental	2004	407pb	HOR2 <sup>7</sup>		MK544985
<i>Bombus hortulanus</i>	18 096*	Santander. Floridablanca. Casianoalto, 1 700 msnm	Oriental	2004	407pb	HOR2 <sup>7</sup>		MK544986
<i>Bombus robustus</i>	21 227	Nariño. Pasto, 2 617 msnm	Occidental	1999	406pb	ROB2 <sup>7</sup>		MK544987
<i>Bombus hortulanus</i>	26 473*	Antioquia. Envisgado. Loma del escobero, 2 459 msnm	Central	2010	407pb	HOR2 <sup>7</sup>		MK544988
<i>Bombus hortulanus</i>	26 474*	Antioquia. Envisgado. Loma del escobero, 2 459 msnm	Central	2010	407pb	HOR2 <sup>7</sup>		MK544989
<i>Bombus hortulanus</i>	26 476*	Antioquia. Envisgado. Loma del escobero, 2 459 msnm	Central	2010	407pb	HOR2 <sup>7</sup>		MK544990
<i>Bombus atratus</i>	26 499*	Antioquia. Carmen de Viboral, 2 110 msnm	Central	2009	485pb	ATRA1 <sup>4</sup>	ATRA1 <sup>3</sup>	MK544991
<i>Bombus atratus</i>	26 502*	Antioquia. Carmen de Viboral, 2 110 msnm	Central	2009	658pb	ATRA1 <sup>6,7</sup>		MK544992

TABLE 1 (Continuación) / TABLE 1 (Continued)

Especie	N° de Colección	Localidad	Cord.	Fecha	Tamaño amplificado	Positivos a partir de patia	Positivos a partir de músculo	N° GenBank
<i>Bombus atratus</i>	26 503*	Antioquia. Carmen de Viboral, 2 110 msnm	Central	2009	407pb	ATRA7 <sup>1</sup>		MK544993
<i>Bombus robustus</i>	27 930	Cundinamarca. PNN Chingaza, 2 900-3 100 msnm	Oriental	2016	658pb		ROB1 <sup>1,2</sup>	MK531257
<i>Bombus robustus</i>	27 931	Páramo El Duende. Valle del Cauca, 2 682 msnm	Occidental	2016	658 pb		ROB2 <sup>1,2</sup>	MK531278
<i>Bombus hortulanus</i>	27 932	Páramo El Duende. Valle del Cauca, 2 682 msnm	Occidental	2016	658 pb		HOR1 <sup>1,2</sup>	MK531297
<i>Bombus funebris</i>	28 110	Cundinamarca. Choachi. Mata Redonda, 3 400 msnm	Oriental	2016	658 pb		FUN1 <sup>1,2</sup>	MK531298
<i>Bombus funebris</i>	28 111	Cundinamarca. Choachi. Mata Redonda, 3 400 msnm	Oriental	2016	658 pb		FUN2 <sup>1,2</sup>	MK531299
<i>Bombus funebris</i>	28 112	Cundinamarca. Choachi. Mata Redonda, 3 400 msnm	Oriental	2016	658 pb		FUN3 <sup>1,2</sup>	MK531279
<i>Bombus hortulanus</i>	28 126	Cundinamarca. PNN Chingaza, 2 900-3 100 msnm	Oriental	2016	658 pb		HOR2 <sup>1,2</sup>	MK531282
<i>Bombus hortulanus</i>	28 142	Cundinamarca. Simijaca, 2 567 msnm	Oriental	2015	658 pb		HOR3 <sup>1,2</sup>	MK516126
<i>Bombus robustus</i>	28 143	Cundinamarca. PNN Chingaza, 2 900-3 100 msnm	Oriental	2016	658 pb		ROB3 <sup>1,2</sup>	MK516134
<i>Bombus robustus</i>	28 153	Cundinamarca. Salto de Tequendama, 2 260 msnm.	Oriental	2017	658 pb		ROB4 <sup>1,2</sup>	MK516132
<i>Bombus robustus</i>	28 154	Cundinamarca. Fômeque. La Laja, 3 200 msnm	Oriental	2017	658 pb		ROB5 <sup>1,2</sup>	MK516133
<i>Bombus robustus</i>	28 156	Cundinamarca. Fômeque. La Laja, 3 200 msnm	Oriental	2017	658 pb		ROB6 <sup>1,2</sup>	MK516166
<i>Bombus rubicundus</i>	28 165	Risaralda. PNN Tatamá, 3 579 msnm.	Occidental	2017	658 pb		RUB1 <sup>1,2</sup>	MK516167
<i>Bombus rubicundus</i>	28 166	Risaralda. PNN Tatamá, 3 579 msnm	Occidental	2017	658 pb		RUB2 <sup>1,2</sup>	MK516168
<i>Bombus rubicundus</i>	28 167	Risaralda. PNN Tatamá, 3 579 msnm	Occidental	2017	658 pb		RUB3 <sup>1,2</sup>	MK516170
<i>Bombus rubicundus</i>	28 169	Risaralda. PNN Tatamá, 3 579 msnm	Occidental	2017	658 pb		RUB4 <sup>1,2</sup>	MK516138
<i>Bombus robustus</i>	28 177	Risaralda. PNN Tatamá, 3 579 msnm.	Occidental	2017	658 pb		ROB7 <sup>1,2</sup>	MK516174
<i>Bombus rubicundus</i>	28 183	Risaralda. PNN Tatamá, 3 579 msnm.	Occidental	2017	658 pb		RUB5 <sup>1,2</sup>	MH221875
<i>Bombus atratus</i>	28 191	Risaralda. Planes de San Rafael, 2 096 msnm	Occidental	2017	658 pb		ATRA2 <sup>1,2</sup>	MH221876
<i>Bombus atratus</i>	28 194	Risaralda. Planes de San Rafael, 2 096 msnm	Occidental	2017	659 pb		ATRA3 <sup>1,2</sup>	MK531294
<i>Bombus rubicundus</i>	28 339	Risaralda. PNN Los Nevados. EL Jordán, 3 300 msnm	Central	2017	660 pb		RUB16 <sup>1,2</sup>	MK531296
<i>Bombus rubicundus</i>	28 340	Risaralda. PNN Los Nevados. EL Jordán, 3 300 msnm	Central	2017	661 pb		RUB17 <sup>1,2</sup>	MK531296
<i>Bombus rubicundus</i>	28 342	Risaralda. PNN Los Nevados. EL Jordán, 3 300 msnm	Central	2017	663 pb		RUB18 <sup>1,2</sup>	MK531285
<i>Bombus hortulanus</i>	28 343	Risaralda. PNN Los Nevados. Agua bonita, 3 200 msnm	Central	2017	664 pb		HOR3 <sup>1,2</sup>	MK531305
<i>Bombus robustus</i>	28 348	Risaralda. PNN Los Nevados. El Jordán, 3 300 msnm	Central	2017	665 pb		ROB8 <sup>1,2</sup>	MK531306
<i>Bombus funebris</i>	28 363	Risaralda. PNN Los Nevados. El Jordán, 3 300 msnm	Central	2017	666 pb		FUN4 <sup>1,2</sup>	MK531308
<i>Bombus funebris</i>	28 364	Risaralda. PNN Los Nevados. El Jordán, 3 300 msnm	Central	2017	667 pb		FUN5 <sup>1,2</sup>	MH221874
<i>Bombus funebris</i>	28 366	Risaralda. PNN Los Nevados. El Jordán, 3 300 msnm	Central	2017	668 pb		FUN6 <sup>1,2</sup>	MH221872
<i>Bombus atratus</i>	MON1	Cundinamarca. Mondoñedo, 2 540 msnm	Oriental	2015	669 pb		ATRA6 <sup>1,2</sup>	MH221873
<i>Bombus atratus</i>	BV3	Cundinamarca. Simijaca, 2 567 msnm	Oriental	2015	670 pb		ATRA4 <sup>1,2</sup>	
<i>Bombus atratus</i>	BV5	Cundinamarca. Simijaca, 2 567 msnm	Oriental	2015	671 pb		ATRA5 <sup>1,2</sup>	



ejemplares provienen de la Cordillera Oriental (Departamento de Cundinamarca), Cordillera Central (departamento de Risaralda) y la cordillera occidental (departamentos de Risaralda y Valle del Cauca). Las características de los ecosistemas y ubicaciones geográficas de las localidades de muestreo se muestran en el Apéndice Digital 1

Se indica el tipo de muestra (extremidad derecha del mesotórax o tejido), a partir de la cual se realizó la amplificación: \*: Muestras de las que se realizó extracción de ADN a partir de extremidad y músculo. N/A: no aplica. – no amplifica. Los superíndices en cada uno de los haplotipos indican la combinación de primers con las que se obtuvo una amplificación: 1: BarbeeF/ MtD9, 2: LCO1490 / HC02198, 3: BarbeeF/2248R, 4: 2166F/2386R, 5:2338F/MtD9, 6: LCO1490/MLepR3, 7: MLepF1/HC02198, 8: MLepF1/MLepR3. Por cada individuo se establece el nombre del haplotipo obtenido.

The type of sample (the right limb of the mesothorax or tissue), from which the amplification was performed is indicated: \*: Samples from which DNA was extracted from the limb and muscle. N / A: Not apply. - : no amplification was obtained. The name of the haplotype obtained is established for each individual. The superscripts in each of the haplotypes indicate the combination of primers with which an amplification was obtained: 1: BarbeeF / MtD9, 2: LCO1490 / HC02198, 3: BarbeeF / 2248R, 4: 2166F / 2386R, 5: 2338F / MtD9, 6: LCO1490 / MLepR3, 7: MLepF1 / HC02198, 8: MLepF1 / MLepR3.

#### **Extracción de ADN, amplificación de Citocromo Oxidasa I (COI) y secuenciación:**

Para cada uno de los especímenes de museo a los que previamente se le realizó la determinación morfológica, se removió la extremidad derecha del mesotórax cortándola por debajo de la coxa usando tijeras para micro disección. Para la toma de muestras entre especímenes las tijeras se esterilizaron por medio de calor y alcohol absoluto. Posteriormente, 45 especímenes de las especies *Bombus atratus* (27),

y *B. hortulanus* (18) fueron puestos en cámara húmeda durante 24 horas, para luego realizar la extracción de una muestra de musculo torácico. Las extremidades extraídas se seccionaron en tres partes para permitir la penetración eficiente del buffer de extracción y la proteína K mientras que las muestras de tejido muscular se procesaron sin maceración para evitar el daño mecánico del material genético (Mitchell, 2015).

En cuanto a los especímenes recientemente recolectados, tras la determinación morfológica realizada siguiendo los caracteres propuestos por Liévano, Ospina y Nates (1994), se obtuvieron muestras de músculo torácico para los análisis moleculares. Los implementos como pinzas, agujas y tijeras de micro disección empleadas en la toma de muestras se esterilizaron entre individuos, primero siendo flameados y luego sumergidos en etanol absoluto para evitar la contaminación con ADN ajeno a la muestra. Todas las extracciones de ADN se realizaron empleado el kit DNeasy Blood & Tissue (Quiagen). Tanto las muestras frescas como las muestras de museo se incubaron durante 12 horas a 56 °C, sin embargo, a las muestras de museo no se les aplicó agitación. Adicionalmente, solo las muestras de musculo provenientes de especímenes frescos se trituraron manualmente con maceradores desechables.

Posteriormente, en el LABUN y en el laboratorio del Grupo de estudio Relación Parásito Hospedero (GERPH), se llevó a cabo la estandarización de las reacciones en cadena de la polimerasa (en adelante, PCR por sus siglas en inglés) para la obtención de fragmentos de COI a partir de la combinación de diferentes primers sugeridos por Folmer et al., (1994), Hajibabaei et al., (2006), Françoso & Arias (2013) y Hernández-Triana et al., (2014) (Tabla 2).

De este modo, con las combinaciones de los primers de Folmer et al. (1994), Hajibabaei et al. (2006) y Hernández-Triana et al. (2014) MLEPFI/ HCO2198 y LCO1490/ MLEPR3 se obtuvieron dos fragmentos de cerca de 400 pb (pares de bases), mientras que con la combinación MLEPFI/ MLEPR3 se obtuvo un fragmento de 152

TABLA 2 / TABLE 2

Primers y combinaciones empleadas en este estudio / Primers and combinations used in this study

Combinación de primers	Secuencia	Autor	Posición en fragmento amplificado de <i>Bombus</i>	Tamaño del fragmento (pb)
BarbeeF/MtD9	BarbeeF: 5'-CAA CAAATC ATA AAA ATA TTG G-3'	(Françoso & Arias, 2013),	1-658	658
BarbeeF/2248R	2248R: 5'-CAA AAT CTA ATA TTA TTT ATT CG-3'	(Simon et al., 1994)	1-231	231
	2338F: 5'-CAT ATT TAT ATC ATT CAT CTC C-3'			
2166F/2386R	2166F: 5'-GGA GGA TTT GGT AAT TTT TTA ATT CC-3'		204-380	176
	2386R: 5'-GAA AAA ATT GTA AAA TCA AC-3'			
2338F/MtD9	MtD9: 5'-CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA AC TC-3'		375-658	283
LCO1490/HCO2198	LCO1490:5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTGG-3'	(Folmer et al., 1994)	1-658	658
MLepF1/HCO2198	HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'		252-658	407
MLepR3/LCO1490	MLepF1: 5'-GCT TTC CCA CGA ATA AAT AAT A-3'	(Hajjibabaei et al., 2006)	1-404	404
MLepF1/MLepR3	MLepR3: 5'-GCT AAR TGWARD GAA AAA ATW GC-3'	(Hernández-Iriana et al., 2014)	252-404	152

Se indica la posición del fragmento amplificado en la secuencia código de barras para el género *Bombus*. pb: pares de bases. The position of the amplified fragment in the barcode sequence for the genus *Bombus* is indicated. bp: base pair.

pb. Adicionalmente, con las combinaciones de los primers de BarbeeF/2248R se obtuvo un fragmento de 231 pb, de la combinación 2166F/2386R se obtuvo el fragmento de 176 bp y de la combinación 2338F/MtD9 un fragmento de 283 bp (Simon et al., 1994; Françoso & Arias, 2013). Adicionalmente con las combinaciones BarbeeF/ MtD9 (Simon et al., 1994; Françoso & Arias, 2013) y LCO1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994), se obtuvieron las secuencias de código de barras de 658 pb para los especímenes recientemente recolectados (Tabla 2). Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 % y se purificaron usando el protocolo de precipitación diferencial con Acetato de Amonio (Bensch et al., 2000). Finalmente, estos productos se secuenciaron en ambos sentidos usando un equipo 3730 xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

**Ensamblaje de datos, análisis filogenéticos y divergencia genética:** Los fragmentos amplificados se editaron y ensamblaron con MEGA v7.0 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016) y alineados con las secuencias obtenidas a partir de las muestras de tejido de los especímenes recientemente recolectados empleando ClustalW (Thompson, Gibson, & Higgins, 2003).

Una vez obtenidas las secuencias se construyeron siete alineamientos de acuerdo con los tamaños de los fragmentos obtenidos con las diferentes combinaciones de primers analizadas, a partir de los cuales se realizaron las reconstrucciones filogenéticas empleando inferencia bayesiana en el programa Mr. Bayes v3.2 (Ronquist et al., 2012). Así, con el objeto de determinar la consistencia de la información obtenida a partir de especímenes de museo, con respecto a las secuencias obtenidas a partir de ejemplares recientes, se construyó un alineamiento de un fragmento final de 658 pb, que incluyó las secuencias provenientes de los ejemplares recientemente recolectados y los fragmentos de diferentes longitudes ensamblados a partir de mini-barcodes obtenidos a partir de especímenes de museo (Apéndice Digital 2). El modelo de sustitución sugerido

por Jmodeltest (Darriba, Taboada, Doallo, & Posada, 2012) fue GTR+I +G. Dos análisis independientes se llevaron a cabo empleando seis cadenas de MCMC, 5 millones de generaciones, y realizando muestreos cada 100 generaciones. La convergencia del análisis se determinó por el valor de la diferencia entre las desviaciones estándar medias menor de 0.01. Después de descartar el 25 % de los árboles, las topologías se obtuvieron sobre un total de 75 000 árboles sobre los que se generó un consenso de 50 %. Las filogenias obtenidas se editaron en el programa FigTree v1.3.1 (Rambaut & Drummond, 2010).

Adicionalmente se calcularon las distancias genéticas intra e inter-específicas empleando el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P), implementado en el software MEGA v7.0 (Kumar et al., 2016). Finalmente, con el fin de evaluar con un mayor detalle las relaciones genéticas entre los diferentes haplotipos del COI de los especímenes analizados, se calcularon redes de haplotipos para cada uno de los fragmentos por medio del software TCS (Clement, Posada, & Crandall, 2000).

Con el objeto de determinar cuál de los fragmentos amplificados puede ser empleado en la reconstrucción de la relaciones filogenéticas de las especies analizadas, así como puede ser usado de manera eficiente como mini-barcode, se construyeron los restantes seis alineamientos, de acuerdo con los fragmentos amplificados por las diferentes combinaciones de primers arriba mencionadas, incluyendo un número fijo de 31 taxones correspondientes a fragmentos obtenidos de especímenes recientemente recolectados, y de 1 a 23 secuencias amplificadas a partir de material de museo. Es así como en el segundo alineamiento en el que se incluyeron secuencias de 231 pb obtenidas con los primers Barbeef/2248R, se incluyeron tres secuencias de la especie *B. atratus* amplificadas de ejemplares de museo. Para el tercer alineamiento, que abarca desde la posición 220 hasta la posición 446 del fragmento de 658 pb, amplificada con la combinación 2166F/2386R, se emplearon seis secuencias de *B. atratus*, una secuencia de *B. funebris*, cinco

secuencias de *B. hortulanus*, dos secuencias de *B. robustus* y cuatro secuencias de *B. rubicundus*. En el cuarto alineamiento, en el que se analizaron las secuencias amplificadas con la combinación 2338F/MtD9, se incluyeron 18 secuencias provenientes de museo: dos de *B. atratus*, tres correspondientes a *B. funebris*, dos secuencias de *B. hortulanus*, ocho de *B. robustus* y tres de *B. rubicundus*. En el quinto alineamiento que incluye secuencias de 293 pb obtenidas con los primers LCO1490/MLEPR3, se emplearon el mismo número de secuencias como fue establecido para la construcción del segundo alineamiento.

En el sexto alineamiento se incluyeron 17 secuencias de museo amplificadas con la combinación MLEPFI/ HCO2198, dos de *B. atratus*, dos de *B. funebris*, ocho de *B. hortulanus*, dos de *B. robustus* y 3 de *B. rubicundus*, mientras que, para el séptimo, en el que se usó la combinación MLEPF1/MLEPR3 se emplearon cinco secuencias de *B. atratus*, cinco de *B. funebris*, 8 de *B. hortulanus*, dos de *B. robustus* y cuatro de *B. rubicundus* (Apéndice Digital 2).

Para los análisis filogenéticos realizados con los seis alineamientos construidos a partir de los fragmentos de 407, 331, 231, 176 y 152 pb., se realizaron dos corridas independientes en las que se emplearon seis cadenas de MCMC, con  $3 \times 10^6$  generaciones, sobre las que se realizó un muestreo cada 100 generaciones. La diferencia entre las desviaciones estándar medias fue menor de 0.01. De este modo, posterior a la eliminación del 25 % de los árboles, las topologías se calcularon sobre 45 000 árboles, a los que se aplicó un consenso de 50 %.

## RESULTADOS

**Calidad de ADN obtenido y éxito de amplificación:** De un total de 96 muestras de museo analizadas, se extrajo ADN que se logró amplificar en 34 (35.4 %). De estas muestras se obtuvo un producto de amplificación secuenciable de 27 (28.1 %), dentro de las que predominaron las secuencias de entre 300 a 407 pb (Fig. 1A), amplificadas hacia el extremo 3' del fragmento de 658 pb usando las combinaciones



de primers MLEPFI/ HCO2198 y 2338F/MtD9 (Fig. 1B). Aunque en general las mayores concentraciones e integridades se obtuvieron en las extracciones realizadas a partir de la extremidad derecha del mesotórax, de las muestras obtenidas a partir de especímenes de entre 33 y 38 años de edad de almacenamiento al momento de la extracción, se observó un mayor éxito de amplificación con músculo torácico (6.06 vs. 4.54 % obtenido de extremidades). Sin embargo, en las muestras comprendidas en dicho lapso de tiempo, el éxito de amplificación fue bajo (7.6 %, cinco de 66 muestras), mientras que las muestras recolectadas y almacenadas a partir de 1987, presentaron una mayor eficiencia en la extracción de ADN a partir de extremidad, así como una mayor proporción de muestras con ADN amplificable (63.3 % de 30 muestras); obteniéndose un mayor éxito de amplificación en muestras depositadas a partir del 2001 (Fig. 1C).

**Relaciones filogenéticas y divergencia genética:** Al comparar las secuencias obtenidas de especímenes de museo, con secuencias de la misma especie amplificadas a partir de material recolectado recientemente, se observaron varias sustituciones en las secuencias de museo. Dichas sustituciones derivaron en un incremento en el valor de la distancia genética intraespecie (Tabla 3), que para el caso

de *B. atratus*, alcanza un valor superior al 3.7 % reportado por Júnior, Santos y Silveira (2015), para la diferenciación de especies con un fragmento similar (471 pb). Sin embargo, en ningún caso las distancias genéticas intraespecíficas superaron las interespecíficas en las especies analizadas (Tabla 3 vs. Tabla 4). Adicionalmente se observó que la presencia de polimorfismos o posiciones ambiguas, así como la amplificación de fragmentos cortos de baja calidad incrementa en muestras con una edad superior a los 30 años (p. e. especímenes 29, 1179 y 1111) (Tabla 1, Apéndice Digital 2).

En la figura 2 se presentan las relaciones filogenéticas y relaciones entre haplotipos de las especies *B. atratus*, *B. funebris*, *B. hortulanus*, *B. robustus* y *B. rubicundus* obtenidas a partir del alineamiento 1, que incluyó 31 secuencias de 658 pb obtenidas a partir de material recientemente recolectado, y 23 secuencias ensambladas a partir de mini-barcodes de longitudes entre los 98 y los 658 pb. Se observa que todos los haplotipos generados a partir de especímenes de museo agrupan correctamente con las especies morfológicas a las que corresponden, formando grupos monofiléticos.

Por otro lado, dos grupos con buen soporte nodal, uno conformado por las especies *B. funebris*, *B. hortulanus*, *B. robustus* y *B. rubicundus* y otro conformado por los especímenes *B. atratus* evidencian la separación entre

TABLE 3  
Distancias genéticas intraespecíficas (Dist.) expresadas en porcentaje y desviación standard (SD) calculadas sobre muestras recientemente recolectadas, así como muestras recientemente recolectadas y ejemplares de museo, usando un fragmento de 658 pb del gen COI

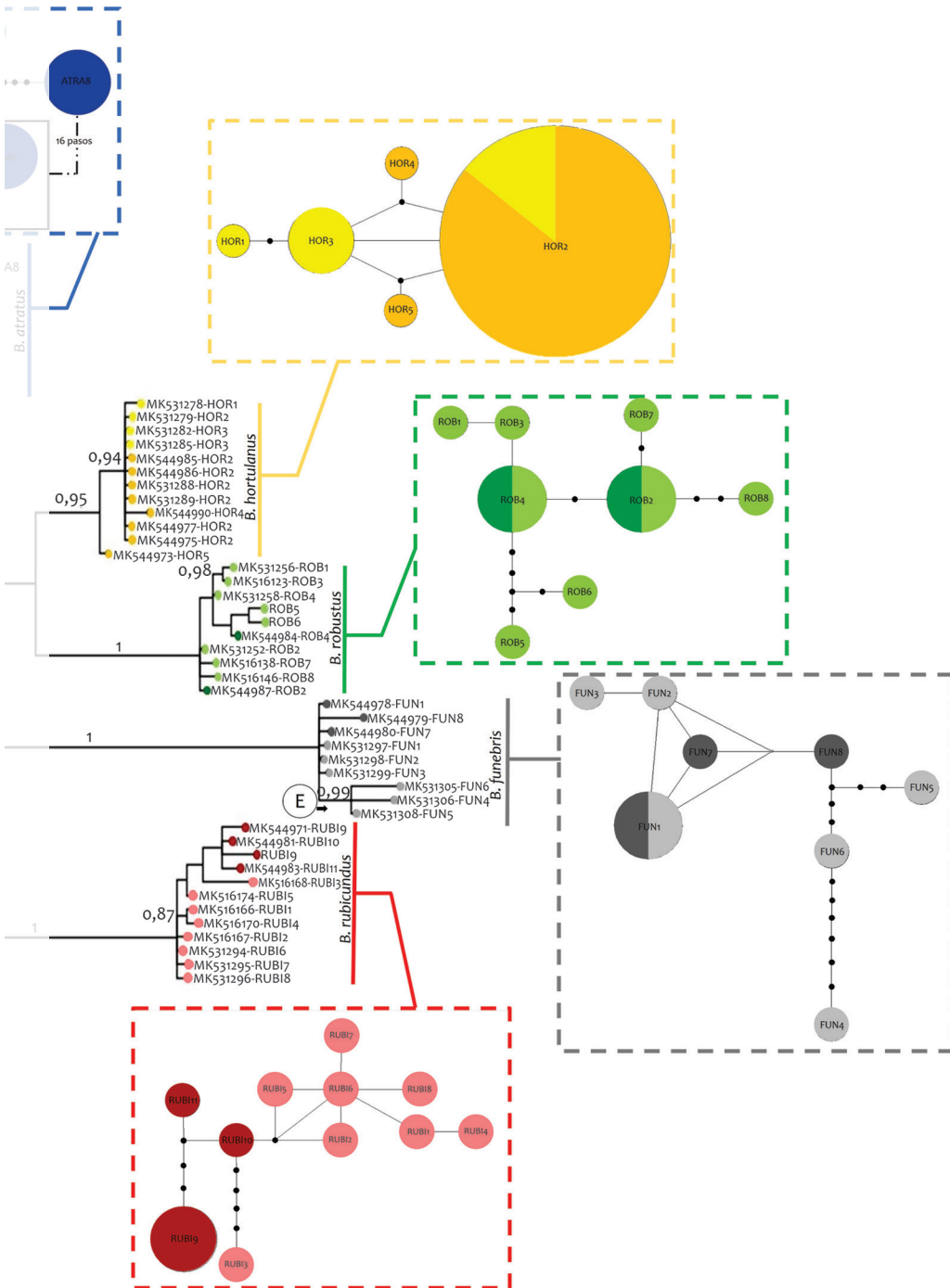
TABLE 3  
Intraspecific genetic distances (Dist.) expressed in percentage and standard deviation (SD) calculated on newly collected samples, as well as recently collected samples plus museum specimens, using a 658 bp fragment of the COI gene

Especie	Recolecta reciente		Museo + recolecta reciente	
	Dist	SD	Dist	SD
<i>B. atratus</i>	0.5205	0.0018	4.059	0.006742965
<i>B. funebris</i>	1.2091	0.0028	1.133	0.002644156
<i>B. hortulanus</i>	0.2288	0.0013	0.248	0.00098899
<i>B. robustus</i>	0.7599	0.0019	0.632	0.001889028
<i>B. rubicundus</i>	0.5906	0.0014	0.813	0.002471686

Dist: Distancia, SD: desviación standard.







**Fig. 1.** Number of samples from which it was possible to extract DNA and make amplifications with different primers using the material obtained in museum samples with different ages, from 1980 to 2010. A. Length of fragments and number of samples with successful amplification for each fragment, B. number of samples amplified using each of the oligonucleotide combinations proposed in the study (Table 1). C. number of samples from which DNA was extracted from thoracic muscle or middle limb of the mesothorax.

TABLA 4

Distancias genéticas interespecíficas (Dist.) expresadas en porcentaje y desviación standard (SD) calculadas sobre muestras recientemente recolectadas, así como muestras recientemente recolectadas y ejemplares de museo, usando un fragmento de 658 pb del gen COI

TABLE 4

Interspecific genetic distances (Dist.) expressed in percentage and standard deviation (SD) calculated on newly collected samples as well as recently collected samples and museum specimens, using a 658 bp fragment of the COI gene

Especies	Recolecta reciente		Museo + recolecta reciente	
	Dist	SD	Dist	SD
<i>B. atratus</i> vs. <i>B. robustus</i>	16.36	0.02	19.23	0.02
<i>B. funebris</i> vs. <i>B. rubicundus</i>	19.17	0.02	19.36	0.02
<i>B. funebris</i> vs. <i>B. atratus</i>	15.99	0.02	17.89	0.02
<i>B. funebris</i> vs. <i>B. robustus</i>	15.20	0.02	15.67	0.02
<i>B. hortulanus</i> vs. <i>B. funebris</i>	13.83	0.02	15.24	0.02
<i>B. hortulanus</i> vs. <i>B. rubicundus</i>	15.26	0.02	16.00	0.02
<i>B. hortulanus</i> vs. <i>B. atratus</i>	15.03	0.02	19.29	0.02
<i>B. hortulanus</i> vs. <i>B. robustus</i>	6.11	0.01	6.05	0.01
<i>B. rubicundus</i> vs. <i>B. atratus</i>	15.84	0.02	19.15	0.02
<i>B. rubicundus</i> vs. <i>B. robustus</i>	15.68	0.02	16.26	0.02

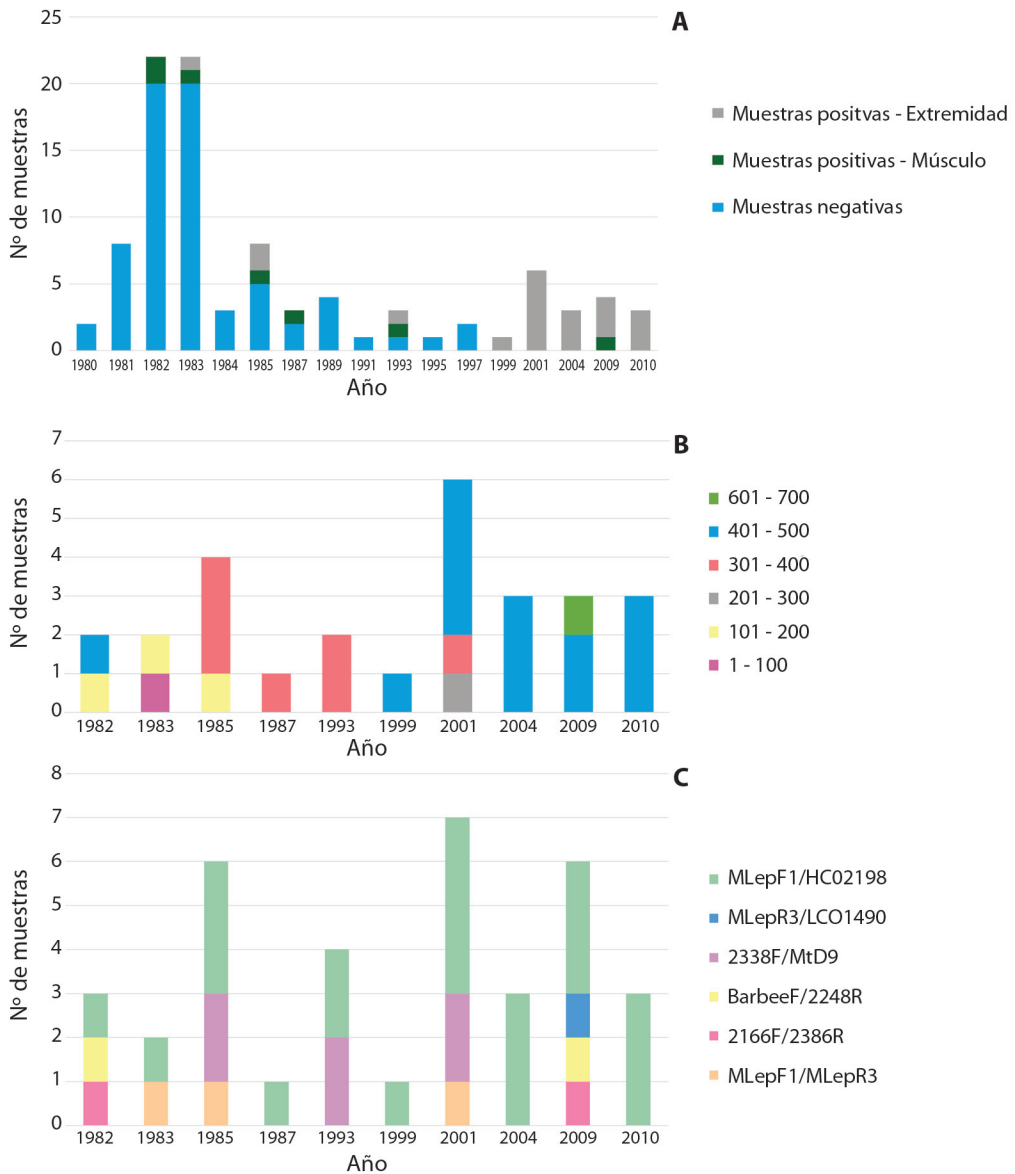
Dist: Distancia, SD: desviación standard.

Dist: Distance, SD: standard deviation.

especies de cara corta y cara larga definida por en la longitud del área malar, previamente establecida por Williams, Cameron, Hines, Cederberg y Rasmont (2008) (Fig. 2A, Fig. 2B). Al interior del clado de la especie *B. atratus* se observan dos subclados bien diferenciados, uno compuesto por los haplotipos ATRA1 y ATRA7 (Fig. 2C) provenientes de muestras de museo, y el otro compuesto por los haplotipos ATRA 2, 3, 4, 5, 6 y 8 (Fig. 2D). En el clado D, los haplotipos 3, 4, 5 y 6 corresponden a secuencias de especímenes recientemente recolectados (frescos); mientras que los haplotipos ATRA2 y ATRA8, incluyen secuencias provenientes de especímenes de museo (Tabla 1). Esta diferenciación se ve reflejada en la red de haplotipos en la que el grupo conformado por los haplotipos ATRA1 y ATRA7 aislados de especímenes recolectados en el departamento de Antioquia, se encuentra separado por 16 pasos mutacionales del grupo conformado por los haplotipos restantes recolectados en otras localidades. Un caso similar se observa con la especie *B. funebris*, en la que, a pesar de la baja resolución de la filogenia, se evidencia que de

la politomía que compone este grupo se deriva un subclado (E), conformado por los haplotipos FUN4, FUN5 y FUN6, correspondientes a especímenes recolectados en el departamento de Risaralda, en el PNN Los Nevados (Tabla 1). La red de haplotipos indica que entre los haplotipos arriba mencionados y los haplotipos FUN1, 2, 3, 7 y 8 pertenecientes a individuos recolectados en el PNN Chingaza, hay cuatro pasos mutacionales de distancia.

Con respecto a los análisis realizados con fragmentos de diferentes tamaños amplificados a partir de las combinaciones de primers detalladas en la Tabla 2, se observó que al igual que en la reconstrucción filogenética realizada con el fragmento completo de 658 pb, todas las especies fueron reconstruidas como grupos monofiléticos, los cuales se encuentran separados de acuerdo con la característica morfológica en la longitud del área malar (cara larga o cara corta) (Apéndice Digital 3A, Apéndice Digital 3B). De este modo, aunque la topología general de todos los análisis es similar, solo en cuatro de los seis análisis, obtenidos con fragmentos correspondientes a los primers



**Fig. 2.** Relaciones filogenéticas del gen COI y redes de haplotipos de las especies *Bombus atratus*, *B. funebris*, *B. hortulanus*, *B. robustus* y *B. rubicundus* construidas a partir de un alineamiento de 658 pb. Los tonos claros indican secuencias provenientes de material recientemente recolectado, mientras que los tonos oscuros denotan secuencias obtenidas a partir de especímenes de museo. Sobre las ramas se presenta el soporte de cada clado (probabilidades posteriores), soportes inferiores a 0.80 no incluidos.

**Fig. 2.** Phylogenetic relationships of the COI gene and haplotype networks of the species *Bombus atratus*, *B. funebris*, *B. hortulanus*, *B. robustus* and *B. rubicundus* constructed from an alignment of 658 bp. Light tones indicate sequences from recently collected material, while dark tones denote sequences obtained from museum specimens. Above the branches, the support of each clade is presented (posterior probabilities), support values less than 0.80 not included.

MLepF1/HCO2198, 2166F/2386R, 2338F/MtD9, MLepF1/MLepR3 (Apéndice Digital 3B, Apéndice Digital 3C, Apéndice Digital 3E y Apéndice Digital 3F) se reconstruyen los dos grupos observados para *B. atratus* y *B. funebris* en la topología obtenida con el fragmento completo de 658 pb. En el análisis realizado con los primers MLepR3/LCO1490 los haplotipos pertenecientes a la especie *B. atratus* se presentan como una politomía, mientras que la topología obtenida de secuencias amplificadas con los oligonucleótidos BarbeeF/2248R (Apéndice Digital 3A), el haplotipo MK544991 (ATRA1) se presenta separado del clado al interior del cual el haplotipo MK544992 (ATRA1) se encuentra incluido. A diferencia de lo anteriormente expuesto, las secuencias ATRA1 se presentan como grupo hermano del haplotipo ATRA7, formando los tres un clado separado de los demás haplotipos en la topología obtenida con el fragmento de COI completo (Fig. 2A). Adicionalmente es de resaltar que para el caso de *B. funebris*, los haplotipos son agrupados de acuerdo con el lugar en el que el espécimen fue recolectado. Por otro lado, empleando los oligonucleótidos MLepF1/MLepR3 (Apéndice Digital 3F), las especies *B. hortulanus* y *B. robustus* se presentan como parte de una politomía en la que a partir del nodo diverge un haplotipo de *B. hortulanus*, y dos clados, uno en el que se agrupan los haplotipos de *B. robustus*, y otro en el que se agrupan las secuencias restantes de *B. hortulanus*. Aunque los soportes nodales obtenidos en las diferentes topologías obtenidas son buenos, ninguno de los análisis realizados a partir de los diferentes mini-barcodes evaluados refleja la topología obtenida con el fragmento de 658 pb. No obstante lo anterior, la topología más cercana fue la obtenida con los primers MLepF1/HCO2198.

## DISCUSIÓN

La combinación de información complementaria proveniente de diferentes disciplinas ha dado origen a lo que se denomina taxonomía integrativa (Dayrat, 2005), en respuesta a la necesidad de caracterizar a una

escala más detallada la biodiversidad. Además de contribuir en la delimitación de especies, la taxonomía integrativa permite diseñar planes de conservación, así como políticas de uso sustentable de las especies (Lecocq et al., 2016a; Lecocq, Rasmont, Harpke, & Schweiger, 2016b), a partir del uso del conocimiento multidimensional de las especies.

Para el caso particular de *Bombus*, dada la habilidad de estas especies para la polinización de cultivos estos insectos han sido objeto de translocación con fines comerciales (Lecocq et al., 2016b); lo que ha generado un gran impacto sobre la fauna nativa de abejorros en diferentes países (Morales, 2007; Kanbe, Okada, Yoneda, Goka, & Tsuchida, 2008; Kraus et al., 2011; Morales, Arbetman, Cameron, & Aizen, 2013). Recientes estudios han puesto de manifiesto la existencia de una gran diversidad genética subyacente a las especies nominales de este género (ej. Williams et al., 2012; Françoso et al., 2019; Martinet et al., 2019). Sin embargo, para las especies de *Bombus* distribuidas en Colombia, hasta el momento la información disponible en bases de datos públicas como GenBank y BOLD es casi inexistente, por lo que una de las grandes contribuciones de este estudio es la generación de información genética del marcador mitocondrial COI por primera vez para las especies *B. atratus*, *B. hortulanus*, y *B. rubicundus*, y los primeros registros de este marcador para Colombia de las especies *B. funebris*, y *B. robustus*. Además, este es el primer estudio en Colombia, en el que se realiza la caracterización genética de especies de abejas nativas empleando especímenes preservados en una colección biológica en el que la mayoría de especímenes superan los 10 años de antigüedad; lo que según el criterio propuesto por Hernández-Triana et al. (2014), las hace poco adecuadas para estudios genéticos dada la degradación del material genético.

Por otro lado, a pesar del bajo número de individuos analizado, a partir del análisis de las secuencias obtenidas, se determinó gran diversidad genética intraespecífica al menos para dos de las cinco especies analizadas (Fig. 2, Tabla 3), lo que puede indicar la presencia de

diferentes unidades de manejo (Moritz, 1994) bajo el nivel taxonómico de especie.

**Calidad de ADN obtenido y éxito de amplificación:** En el caso particular de este estudio, de 96 especímenes escogidos, se obtuvo ADN de cerca del 35 % de los individuos de los que se obtuvieron 23 secuencias que pudieron ser empleadas en los análisis de reconstrucción filogenética y de redes de haplotipos, generando hipótesis congruentes con la información obtenida de material recientemente recolectado. Se evaluaron 39 individuos recolectados y preservados entre 1980 y 1985 (de 30 a 31 años de edad al momento de la extracción), de los cuales se pudieron generar secuencias de 300 a 406 pb a partir del ensamblaje de diferentes fragmentos. En general el éxito de amplificación en muestras previas a 1985 fue bajo (7.6 %), lo que coincide con diferentes estudios en los que se concluye que uno de los factores que más influye en el éxito de amplificación de ejemplares de museo es el tiempo transcurrido a partir del depósito del espécimen en dichos acervos; así, la probabilidad de obtener material genético es inversamente proporcional a dicho tiempo (Hajibabaei et al., 2006; Gilbert et al., 2007; Hernández-Triana et al., 2014; Mitchell, 2015). No obstante, de los 57 individuos restantes, recolectados desde 1987 hasta el 2010, se obtuvo ADN y productos amplificables que pueden ser empleados como mini-barcode para todas las muestras, lo cual muestra cómo las colecciones biológicas constituyen un pilar importante para la taxonomía integrativa siendo repositorio de información de caracteres morfológicos, distribución previa y actual de especies e información genética que se encuentra contenida en cada uno de los especímenes preservados (Wandeler et al., 2007).

Nuestros resultados indican un mayor éxito y amplificación en muestras de extremidad derecha del mesotórax, en comparación con las muestras de músculo torácico procesadas (Fig. 1C). Adicionalmente, se observó una mayor integridad del ADN obtenido a partir de extremidad, lo que fue evidenciado en la obtención de fragmentos de entre 300 y 500

pb. Dicha integridad fue menor en muestras provenientes de individuos recolectados previo a 1983 (Fig. 1A). Reportes previos han indicado la reducción en el éxito en la extracción de ADN y subsecuente amplificación en especímenes montados en alfiler en la medida en la que la edad del espécimen (entendida como el tiempo que ha permanecido en la colección biológica tras su recolecta) aumenta; sin embargo, el tiempo en la de la viabilidad de estos especímenes es variable (Watts, Thompson, Allen, & Kemp, 2007; Strange, Knoblett, & Griswold, 2009).

Por otro lado, es de resaltar que los oligonucleótidos con los que se reportó un mayor número de amplificaciones, aunque no siempre se obtenía la totalidad del fragmento, fueron los primers MLepF1/HCO2198 (Fig. 1B). Dichos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 407 pb de bases en el sector más variable de la secuencia hacia el extremo 3', por lo que resultan de gran potencial en la identificación molecular de nuevas especies (Júnior et al., 2015).

**Relaciones filogenéticas y divergencia genética:** la totalidad de los especímenes estudiados fue agrupada correctamente de acuerdo con la especie morfológica que les había sido asignada. No obstante, a partir de la incorporación de la información genética suministradas por los individuos de museo procesados, se pudo observar un incremento en la distancia genética inter-específica, particularmente con respecto a las especies *B. atratus* y *B. funebris* (Tabla 3). Esto se debe a la presencia de sustituciones nucleotídicas diferenciales a lo largo de las secuencias. En estudios recientes se ha reportado la incorporación de errónea de nucleótidos en cerca del 17 al 21 % de las secuencias amplificadas a partir de material de museo (Stiller et al., 2006; Sefc, Payne, & Sorenson, 2007; Wandeler et al., 2007), en el que las transiciones representan cerca del 60 % mientras que el nivel de transversiones es menor (Stiller et al., 2006). No obstante, para el caso particular de este estudio, pensamos que las sustituciones no son un artefacto de la antigüedad de las muestras, ya que estas fueron

similares entre grupos de individuos, lo que se vio reflejado en la formación de dos subclados en las especies *B. atratus* y *B. funebris* (Fig. 2). Los linajes fueron agrupados en dichos subclados de acuerdo al lugar de proveniencia de las muestras. De este modo, para el caso de *B. funebris*, el clado compuesto por los haplotipos FUN4, FUN5 y FUN6 corresponde a individuos recolectados en la cordillera central colombiana mientras que las secuencias restantes corresponden a individuos recolectados en la cordillera oriental. Esto indica la presencia de al menos dos poblaciones que pueden constituirse en Unidades Significativas Evolutivas según Moritz (1994). El aislamiento entre estas poblaciones puede deberse al rango de distribución altitudinal restringido de la especie (2 850-4 750 m.s.n.m., Lievano et al., 1991), que posiblemente limitó su desplazamiento hacia las tierras bajas durante los cambios ambientales ocurridos en el Pleistoceno, y que causó aislamiento reproductivo de las poblaciones provenientes de dos cordilleras diferentes. En contraste, las poblaciones de la especie *B. atratus*, no son frecuentes en los pisos montanos altos, lo que eventualmente limita el contacto entre las poblaciones provenientes de los dos lados de la cordillera. Así al interior de esta especie también se pudo determinar la presencia de linajes mitocondriales únicos, como es el caso del grupo compuesto por los haplotipos ATRA1 y ATRA7 recolectados en el departamento de Antioquia, que pueden ser considerados como unidades evolutivas significativas (ESU), con prioridad de conservación (Moritz, 1994). Nuestros resultados coinciden con estudios previos realizados en Brasil con la especie *B. pauloensis* (sinónimo taxonómico de *B. atratus*), en los que se determinó la presencia de diferentes grupos genéticos al interior de esta especie, que pueden ser consideradas como unidades de manejo, para las cuales se ha previsto que presenten diferentes comportamientos bajo un escenario de cambio climático (Françoso et al., 2019).

### **Sugerencias para el protocolo de extracción de DNA de insectos depositados en colecciones biológicas (museos):**

Se determinó que el almacenamiento de los especímenes una vez sacrificados influye en gran medida en la preservación del material genético contenido en ellos. De este modo, se registró que los individuos almacenados en ambientes húmedos son más proclives al daño del ADN por la actividad de las endonucleasas, que se mantienen activas durante largo tiempo después de la muerte del espécimen (Dessauer, Cole, & Hafner, 1990). Por tal motivo, se recomienda secar los especímenes para inactivar las endonucleasas y así inhibir la degradación (Doyle & Dickson, 1987), pero esta desecación también tiene desventajas a la hora de emplear el material genético del espécimen, pues tras la desecación, el ADN en los tejidos blandos pasa por un proceso de oxidación, que particularmente en el caso de las pirimidinas causa la fragmentación del anillo, lo que ha sido evidenciado en perfiles cromatográficos de ADN realizados en muestras secas de tejido almacenadas durante largos periodos de tiempo (Pääbo, 1989). Esto podría explicar por qué la extracción de ADN fue más exitosa de extremidades, pues para cortar la extremidad de los especímenes, estos no tuvieron que ser sometidos a cámara húmeda, mientras que para la extracción de músculo fue necesario humedecerlos, lo que pudo dañar aún más el ADN. De este modo se puede inferir también que próximas extracciones de tejido de estos individuos pueden presentar resultados aún menos eficientes.

Una alternativa a la desecación puede ser preservar la muestra embebida en fluidos diferentes a la formalina o Carnoy, ya que estas sustancias son conocidas por causar daño en el ADN (Dillon, Austin, & Bartowsky, 1996; Wandeler et al., 2007). Particularmente en insectos se usa el almacenamiento en alcohol, de hecho, Dillon et al., (1996) extrajeron ADN de buena calidad de muestras almacenadas



a 24 meses a 4 °C en etanol 70 %. Del mismo modo obtuvieron ADN en calidades y cantidades similares a las muestras frescas cuando los individuos fueron almacenados en alcohol absoluto. Así pues, se recomienda para posteriores iniciativas de aprovechamiento del material de la colección biológica, que una vez sean recolectadas las muestras, una parte del tejido o un individuo completo pueda ser almacenado en etanol absoluto, y que el medio sea reemplazado periódicamente para evitar el daño del ADN dentro de la muestra. Adicionalmente, aunque en este estudio no se evaluó el impacto de las sustancias empleadas en el proceso de eutanasia de los especímenes; Dillon et al. (1996), indican que el sacrificio practicado con Etil Acetato causa daños en el ADN que impiden la amplificación en especímenes recientes, mientras que Dean y Ballard (2001) lograron la extracción de ADN a partir de especímenes recientemente sacrificados de *Drosophila simulans*. Adicionalmente, estos autores concluyen que, aunque el método de sacrificio afecta la extracción de ADN, no afecta la amplificación.

En cuanto a la amplificación, además de la incorporación errónea de nucleótidos en las secuencias al momento de la amplificación (Stiller et al., 2006; Sefc et al., 2007; Wandeler et al., 2007), también se ha registrado la formación de productos quiméricos a través de un fenómeno denominado “jumping PCR” en las amplificaciones realizadas con material proveniente de colecciones biológicas (Pääbo, Irwin, & Wilson, 1990; DeSalle, Barcia, & Wray, 1993). Estos productos pueden derivarse de contaminación cruzada con ADN exógeno (Joly, Stevens, & van Vuuren, 2007; Wandeler et al., 2007) o a polimorfismos, o si por el contrario está relacionada con la formación de productos quiméricos, es altamente recomendable seguir las recomendaciones de los protocolos de trabajo sugeridas por Wandeler (et al., 2007), con el objeto de evitar la contaminación cruzada. Dichas modificaciones consisten en realizar la preparación de las reacciones en espacios que fueron previamente esterilizados (ej., con luz U.V.), así como emplear reactivos

y consumibles exclusivamente para trabajo con ADN, y evitar el procesamiento de grandes cantidades de muestra. Adicionalmente, se recomienda realizar varias amplificaciones independientes, hacer uso de enzimas de alta fidelidad o técnicas como la clonación con el fin de detectar y evitar la incorporación de nucleótidos de manera errónea, y/o productos quiméricos en las secuencias empleadas para inferencia filogenética y otros estudios.

En Colombia los estudios orientados hacia la caracterización genética de las especies de *Bombus* son escasos, no existe un indicador directo del grado de conservación de los abejorros en el país o el impacto que el incremento de la urbanización, uso de pesticidas, o la fragmentación de hábitat entre otras prácticas ha causado sobre este género (Ospina & Nates, 2016). Es en este punto en el que la colección biológica del Laboratorio de Investigaciones en abejas de la Universidad Nacional de Colombia-LABUN, así como las diferentes colecciones entomológicas en el país revisten gran importancia como reservorio de información sobre la distribución histórica de las especies allí catalogadas. Para el caso particular de este estudio muestras de museo sirvieron como fuente de información genética de cada una de las poblaciones estudiadas. De este modo, en el presente estudio además de generar un protocolo de extracción y amplificación de secuencias código de barras a partir de especímenes depositados en la colección hace más de 30 años, se determinó en una pequeña muestra la presencia de haplotipos únicos al interior de dos especies nativas *B. atratus*, *B. funebris*, los cuales pueden constituirse en unidades evolutivas significativas diferentes sujetos de conservación (Moritz, 1994) o incluso en subespecies (caso de *B. atratus*). Estudios usando marcadores moleculares en otros lugares del mundo han demostrado la existencia de un amplio espectro de variaciones genéticas al interior de las especies del género *Bombus*, que a su vez están asociadas con una distribución geográfica determinada y que posiblemente presentan adaptaciones propias para la explotación de los entornos en los que viven. (ej. Williams et al.,

2012; Françoise et al., 2019). Estudios como el presente resaltan la necesidad de explorar de una manera más profunda la diversidad en todos sus componentes (número de linajes evolutivos, diversidad genética y funcional (Pérez & García, 2001), pues a partir de la integración de esta información, se hace posible el planeamiento de medidas para la conservación de las poblaciones de estos polinizadores frente a escenarios de cambio climático, o iniciativas de explotación comercial y translocación de especies (Lecocq et al., 2016a; Françoise et al., 2019; Lotta-Arevalo, 2019, en prensa).

**Declaración de ética:** los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de ningún tipo; y que han cumplido con todos los requisitos y procedimientos éticos y legales pertinentes. Todas las fuentes de financiamiento se detallan plena y claramente en la sección de agradecimientos. El respectivo documento legal firmado se encuentra en los archivos de la revista.

## AGRADECIMIENTOS

A los estudiantes del Laboratorio de investigación en Abejas de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo en la fase de campo, especialmente a N. Florez y J. Gómez. Así mismo agradecemos al personal de la Unidad Administrativa especial de Parques Nacionales Naturales por otorgarnos el permiso de acceso a las áreas protegidas en las que se desarrollaron muestreos para el presente estudio. Este estudio fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencias, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS (contrato N°. FP44842-071-2016; proyecto N°. 110171451001), quienes no intervinieron en el diseño del estudio, recolección de datos, o preparación del presente manuscrito.

## RESUMEN

**Introducción:** Recientemente ha tomado relevancia el uso de especímenes de museo como fuente de

información genética para desarrollar estudios que resuelven preguntas taxonómicas, ecológicas, demográficas y evolutivas a diversas escalas temporales y geográficas. Sin embargo, material genético obtenido a partir de ejemplares depositados en colecciones biológicas es poco usado, debido al deterioro natural del ADN preservado en dichos ejemplares, de manera que la obtención de material genético de calidad es demandante en términos de tiempo y dinero. **Objetivo:** Usando material de museo, identificar una secuencia mini-barcode que pueda ser empleada en la determinación taxonómica, y que a su vez suministre información que permita la estimación de relaciones filogenéticas de especies del género *Bombus*. **Métodos:** se estandarizó el protocolo de extracción de ADN a partir de la extremidad mesotorácica derecha y/o una muestra de músculo torácico de 96 especímenes depositados en la colección LABUN entre 7 y 38 años atrás. Las diferentes combinaciones de oligonucleótidos evaluadas permitieron amplificar fragmentos de 152 a 407 pares de bases (pb) del gen mitocondrial Cytochrome Oxidase I (COI). Usando como plantilla un grupo de 31 secuencias amplificadas a partir de especímenes recolectados recientemente, los fragmentos obtenidos de los especímenes del museo fueron ensamblados y analizados en un marco filogenético. Además, se realizó un análisis de red de haplotipos para evaluar en detalle las relaciones entre los haplotipos mitocondriales resultantes. **Resultados:** Se determinó un mayor éxito de extracción de ADN a partir de muestras de extremidad depositadas a partir del año 1982. Entretanto, la amplificación exitosa de fragmentos de más de 300 pares de bases (pb) se logró principalmente en muestras depositadas en fechas posteriores a 1999, lo que indica una mayor integridad del material genético recuperado de individuos de 19 años de recolección en adelante. Aunque todos los fragmentos evaluados pueden ser empleados como mini-barcode, solo con uno se obtiene una topología similar a la observada con el fragmento completo. Se detectó una gran variación genética, particularmente al interior de las especies *Bombus atratus* y *B. funebris*, en las que se reveló una clara estructura filogeográfica. **Conclusiones:** Se obtuvieron nuevas secuencias de códigos de barras mediante extracción de ADN y protocolo de amplificación de muestras de museos. Además, se generó nueva información sobre la variabilidad genética intraespecífica, detectando la presencia de haplotipos mitocondriales únicos que podrían constituir Unidades Significativas Evolutivas sujetas a conservación. Dicha información es de vital importancia para formular estrategias de conservación para estos polinizadores en Colombia.

**Palabras clave:** *Bombus*, Neotrópico, citocromo oxidasa I, mini barcode, colecciones biológicas.

## REFERENCIAS

Ackery, P.R., Testa, J.M., Ready, P.D., Doyle, A.M., & Piniger, D.B. (2004). Effects of high temperature pest



- eradication on DNA in entomological collections. *Studies in Conservation*, 49(1), 35-40.
- Alcaldía Municipal de Mosquera Cundinamarca. (2000). *Plan de Ordenamiento Territorial Mosquera Cundinamarca 2000*. Recuperado de <http://www.mosquera-cundinamarca.gov.co>
- Ballesteros, H. (2005). *Plan de Manejo Parque Nacional Natural Tatamá Plan Básico de Manejo 2005-2009*. Recuperado de <https://www.storage.googleapis.com/pnn-web/uploads/2013/12/PNNTATAMA.pdf>
- Bensch, S., Stjernman, M., Hasselquist, D., Örjan, Ö., Hansson, B., Westerdaal, H., & Pinheiro, R.T. (2000). Host specificity in avian blood parasites: A study of Plasmodium and Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1452), 1583-1589. DOI:10.1098/rspb.2000.1181
- Bisanti, M., Ganassi, S., & Mandrioli, M. (2009). Comparative analysis of various fixative solutions on insect preservation for molecular studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 130(3), 290-296.
- Cameron, S., Hines, H., & Williams, P. (2007). A comprehensive phylogeny of the bumble bees (Bombus). *Biological Journal of the Linnean Society*, 91(1), 161-188.
- Cárdenas, L. (2016). *Comparación histológica foliar de Gaultheria anastomosans presente en Bosque de Niebla y Páramo del Parque Ecológico Matarredonda vía Bogotá-Choachí* (Tesis de Pregrado). Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K.A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657-1659.
- Condamine, F.L., & Hines, H.M. (2015). Historical species losses in bumblebee evolution. *Biology Letters*, 11(3), 20141049.
- Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca. (2006). *Elaboración de los estudios de diagnóstico prospectiva y formulación para la cuenca hidrográfica de los ríos Ubaté y Suárez (Departamento de Cundinamarca)*. Recuperado de <https://www.car.gov.co/uploads/files/5ac693c13ebab.pdf>
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772. DOI:10.1038/nmeth.2109
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85(3), 407-415.
- Dean, M.D., & Ballard, J.W.O. (2001). Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98(3), 279-283.
- DeSalle, R., Barcia, M., & Wray, C. (1993). PCR jumping in clones of 30-million-year-old DNA fragments from amber preserved termites (*Mastotermes electrodominicus*). *Experientia*, 49(10), 906-909.
- Dessauer, H., Cole, C., & Hafner, M. (1990). Collection and storage of tissues. In D. Hillis & C. Moritz (Eds.). *Molecular Systematics* (pp. 25-42). Sunderland, England: Sinauer Associates.
- Dillon, N., Austin, A., & Bartowsky, E. (1996). Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology*, 5(1), 21-24.
- Doyle, J.J., & Dickson, E.E. (1987). Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*, 36(4), 715-722.
- 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.
- Françoso, E., & Arias, M. (2013). Cytochrome c oxidase I primers for corbiculate bees: DNA barcode and mini-barcode. *Molecular Ecology Resources*, 13(5), 844-850.
- Françoso, E., Zuntini, A.R., Carnaval, A.C., & Arias, M.C. (2016). Comparative phylogeography in the Atlantic forest and Brazilian savannas: Pleistocene fluctuations and dispersal shape spatial patterns in two bumblebees. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1), 267.
- Françoso, E., Zuntini, A.R., & Arias, M.C. (2019). Combining phylogeography and future climate change for conservation of *Bombus morio* and *B. pauloensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Conservation*, 23(1), 63-73.
- Gilbert, M.T.P., Moore, W., Melchior, L., & Worobey, M. (2007). DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS One*, 2(3), e272.
- Gil-Ospina, R.F., Bedoya-Zuluaga, F.A., & Castaño-Villa, G.J. (2010). Tendencias poblacionales en algunas especies de aves acuáticas en la laguna del Otún entre 1998 y 2007. *Boletín Científico Centro de Museos Museo de Historia Natural*, 14(2), 92-98.
- Hajibabaei, M., Smith, M.A., Janzen, D.H., Rodriguez, J.J., Whitfield, J.B., & Hebert, P.D. (2006). A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 959-964.
- Hausmann, A., Hebert, P.D., Mitchell, A., Rougerie, R., Sommerer, M., Edwards, T., & Young, C.J. (2009). Revision of the Australian *Oenochroma vinaria*

- Guenée, 1858 species-complex (Lepidoptera: Geometridae, Oenochrominae): DNA barcoding reveals cryptic diversity and assesses status of type specimen without dissection. *Zootaxa*, 2239(1), 1-21.
- Hebert, P.D., Zakharov, E.V., Prosser, S.W., Sones, J.E., McKeown, J.T., Mantle, B., & La Salle, J. (2013). A DNA 'Barcode Blitz': Rapid digitization and sequencing of a natural history collection. *PLoS One*, 8(7), e68535.
- Hernández-Triana, L., Prosser, S., Rodríguez-Perez, M.A., Chaverri, L., Hebert, P., & Ryan, G.T. (2014). Recovery of DNA barcodes from blackfly museum specimens (Diptera: Simuliidae) using primer sets that target a variety of sequence lengths. *Molecular Ecology Resources*, 14(3), 508-518.
- Hines, H.M. (2008). Historical biogeography, divergence times, and diversification patterns of bumble bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Systematic Biology*, 57(1), 58-75.
- Joly, S., Stevens, M.I., & van Vuuren, B.J. (2007). Haplotype networks can be misleading in the presence of missing data. *Systematic Biology*, 56(5), 857-862.
- Júnior, J.E.S., Santos, F.R., & Silveira, F.A. (2015). Hitting an unintended target: Phylogeography of *Bombus brasiliensis* Lepeletier, 1836 and the first new Brazilian bumblebee species in a century (Hymenoptera: Apidae). *PLoS One*, 10(5), e0125847.
- Kanbe, Y., Okada, I., Yoneda, M., Goka, K., & Tsuchida, K. (2008). Interspecific mating of the introduced bumblebee *Bombus terrestris* and the native Japanese bumblebee *Bombus hypocrita sapporoensis* results in inviable hybrids. *Naturwissenschaften*, 95(10), 1003-1008.
- Kraus, F.B., Szentgyörgyi, H., Rožej, E., Rhode, M., Moroň, D., Woyciechowski, M., & Moritz, R.F. (2011). Greenhouse bumblebees (*Bombus terrestris*) spread their genes into the wild. *Conservation Genetics*, 12(1), 187-192.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lecocq, T., Brasero, N., De Meulemeester, T., Michez, D., Dellicour, S., Lhomme, P., ... Rasmont, P. (2015). An integrative taxonomic approach to assess the status of Corsican bumblebees: Implications for conservation. *Animal Conservation*, 18(3), 236-248.
- Lecocq, T., Coppée, A., Michez, D., Brasero, N., Rasplus, J.Y., Valterova, I., & Rasmont, P. (2016a). The alien's identity: Consequences of taxonomic status for the international bumblebee trade regulations. *Biological Conservation*, 195, 169-176.
- Lecocq, T., Rasmont, P., Harpke, A., & Schweiger, O. (2016b). Improving international trade regulation by considering intraspecific variation for invasion risk assessment of commercially traded species: The *Bombus terrestris* case. *Conservation Letters*, 9(4), 281-289.
- Lentijo, G., & Kattan, G. (2005). Estratificación vertical de las aves en una plantación monoespecífica y en bosque nativo en la cordillera central de Colombia. *Ornitología Colombiana*, 3, 51-61.
- Lievano, A., Ospina, R., & Nates, G. (1991). Distribución altitudinal del género *Bombus* en Colombia (Hymenoptera: Apidae). *Invertebrados*, 4, 541-550.
- Liévano, A., Ospina, R., & Nates, G. (1994). Contribución al conocimiento de la taxonomía del género *Bombus* en Colombia (Hymenoptera: Apidae). *Trianea*, 5(1), 221-233.
- Lotta-Arevalo, I.A., Vargas-Ramírez, M.A., Parra-Hinojosa, A., Nates-Parra, G., Matta, N.E., Gennari, ... Ospina-Torres, R. (2019). Genetic differentiation in a Neotropical species of *Bombus* (Hymenoptera: Apidae): Implications of translocations for pollinator conservation. En prensa.
- Martinet, B., Lecocq, T., Brasero, N., Gerard, M., Urbanová, K., Valterová, I., ... Rasmont, P. (2019). Integrative taxonomy of an arctic bumblebee species complex highlights a new cryptic species (Apidae: *Bombus*). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 187(3), 599-621.
- Mitchell, A. (2015). Collecting in collections: A PCR strategy and primer set for DNA barcoding of decades-old dried museum specimens. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1102-1111.
- Morales, C.L. (2007). Introducción de abejorros (*Bombus*) no nativos: Causas, consecuencias ecológicas y perspectivas. *Ecología Austral*, 17(1), 51-65.
- Morales, C.L., Arbetman, M.P., Cameron, S.A., & Aizen, M.A. (2013). Rapid ecological replacement of a native bumble bee by invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11(10), 529-534.
- Moritz, C. (1994). Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(10), 373-375.
- Nates, G. (2004). *Abejas corbiculadas de Colombia Hymenoptera: Apidae*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional De Colombia.
- Osorno, E., & Osorno, H. (1938). Notas biológicas sobre algunas especies de *Bombus* de los alrededores de Bogotá, Colombia, Sur América. *Revista Entomológica Rio de Janeiro*, 9, 31-39.
- Ospina, R., & Nates, G. (2016). La desaparición de las abejas. En G. Nates Parra (Ed.), *Iniciativa Colombiana de Polinizadores abejas ICPA* (1er edición, pp.

- 187-198). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Pääbo, S. (1989). Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(6), 1939-1943.
- Pääbo, S., Irwin, D.M., & Wilson, A.C. (1990). DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *Journal of Biological Chemistry*, 265(8), 4718-4721.
- Pérez, G., & García, L. (2001). Los parásitos en el contexto de la biodiversidad y la conservación. *Biodiversitas*, 34, 11-15.
- Pinilla-Gallego, M.S., Ospina, R., & Cure, J.R. (2017). Los abejorros de páramo. En G. Nates Parra (Ed.), *Iniciativa Colombiana de Polinizadores abejas ICPA* (1er edición, pp. 129-142). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Porras, L.V. (2011). Nuevos reportes de ubicación y calidad de agua en los humedales altoandinos del páramo del Duende, Chocó, Colombia. *Revista Bioetnia*, 8(2), 138.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W.E. (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345-353.
- Rambaut, A. & Drummond, A. (2010). FigTree (Version 1.3.1). Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, England. Retrieved from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., ... Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542.
- Roy, M., Girman, D., Taylor, A., & Wayne, R. (1994). The use of museum specimens to reconstruct the genetic variability and relationships of extinct populations. *Experientia*, 50(6), 551-557.
- Sefc, K.M., Payne, R.B., & Sorenson, M.D. (2007). Single base errors in PCR products from avian museum specimens and their effect on estimates of historical genetic diversity. *Conservation Genetics*, 8(4), 879-884.
- Shokralla, S., Zhou, X., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Landry, J.F., Jacobus, L.M., & Hajibabaei, M. (2011). Pyrosequencing for mini-barcoding of fresh and old museum specimens. *PLoS One*, 6(7), e21252.
- 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(6), 651-701.
- Sproul, J.S., & Maddison, D.R. (2017). Sequencing historical specimens: Successful preparation of small specimens with low amounts of degraded DNA. *Molecular Ecology Resources*, 17(6), 1183-1201.
- Stiller, M., Green, R.E., Ronan, M., Simons, J.F., Du, L., He, W., ... Pääbo, S. (2006). Patterns of nucleotide misincorporations during enzymatic amplification and direct large-scale sequencing of ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13578-13584.
- Strange, J.P., Knoblett, J., & Griswold, T. (2009). DNA amplification from pin-mounted bumble bees (*Bombus*) in a museum collection: Effects of fragment size and specimen age on successful PCR. *Apidologie*, 40(2), 134-139.
- Strutzenberger, P., Brehm, G., & Fiedler, K. (2012). DNA barcode sequencing from old type specimens as a tool in taxonomy: A case study in the diverse genus *Eois* (Lepidoptera: Geometridae). *PLoS One*, 7(11), e49710.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., & Higgins, D.G. (2003). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics*, 1, 2-3.
- Vargas, O., & Pedraza, P. (2004). *El Parque Nacional Natural Chingaza*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Vásquez, V.H.V., & Serrano, M.A. (2009). *Las áreas naturales protegidas de Colombia*. Bogotá, Colombia: Conservación Internacional Colombia.
- Wandeler, P., Hoec, P.E., & Keller, L.F. (2007). Back to the future: Museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(12), 634-642.
- Watts, P.C., Thompson, D.J., Allen, K.A., & Kemp, S.J. (2007). How useful is DNA extracted from the legs of archived insects for microsatellite-based population genetic analyses? *Journal of Insect Conservation*, 11(2), 195-198.
- Williams, P.H., An, J., Brown, M.J., Carolan, J.C., Goulson, D., Huang, J., & Ito, M. (2012). Cryptic bumblebee species: Consequences for conservation and the trade in greenhouse pollinators. *PLoS One*, 7(3), e32992.
- Williams, P.H., Cameron, S.A., Hines, H.M., Cederberg, B., & Rasmont, P. (2008). A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie*, 39(1), 46-74.
- Williams, P., & Jepsen, S. (2017). *IUCN BBSG–Bumblebee Specialist Group Report 2017*. London: Natural History Museum.
- Zimmermann, J., Hajibabaei, M., Blackburn, D.C., Hanken, J., Cantin, E., Posfai, J., & Evans, T.C. (2008). DNA damage in preserved specimens and tissue samples: A molecular assessment. *Frontiers in Zoology*, 5(1), 18.