

Caracterización genética de la hormiga *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) en Isla Gorgona, Colombia

Alejandra López Díaz & Raúl Ernesto Sedano Cruz*

Grupo de Ecología Animal. Departamento de Biología, Universidad del Valle, Calle 13 No 100-00, Edif. 320, Room 3120, Cali, Colombia; alejalopezdiaz9@gmail.com, raul.sedano@correounivalle.edu.co

* Correspondencia

Recibido 08-III-2019. Corregido 27-VI-2019. Aceptado 02-X-2019.

Abstract: Genetic characterization of *Atta cephalotes* ant (Hymenoptera: Formicidae) in Gorgona Island, Colombia. Introduction: The genetic variation between island and mainland populations of leaf-cutter ants have been poorly studied, despite its importance to understand their local dispersion, regional structure, and the distribution of one of the most abundant species in the neotropics. **Objective:** To analyze the genetic variation of an insular population of *Atta cephalotes* in a larger regional context in Central and South America. **Methods:** The Cytochrome Oxidase I gene of *A. cephalotes* was sequenced for the Gorgona Island and mainland populations in order to conduct an analysis of molecular variance, gene flow, and to calculate divergence time of haplogroups occurring in the island. An individual assignment test was conducted to estimate the spatial genetic connectivity and the distribution for this ant in the Eastern Tropical Pacific. **Results:** a total of 33 samples from the island and the Colombian mainland were compared to 389 Genbank accessions of *A. cephalotes* from Central and South America. This leaf-cutter ant in the Gorgona Island is closely related to the Colombian mainland, despite that the separation between the island and the mainland likely constitute a barrier to gene flow. It is likely that two of the most common haplogroups on the continent arrived on the island recently. Therefore, the anthropogenic influence in the process of colonization of the island by this leaf-cutting ant cannot be excluded. A map of connectivity shows that this population has geographic limits that largely overlap with a biogeographic region within the Eastern Tropical Pacific. This trans-andean population accumulates 23 % of the maternally inherited diversity of the *A. cephalotes*. **Conclusions:** This leaf-cutter ant in the Gorgona Island and the Colombian Pacific is closely related to the Central American population and the whole region harbor a significant segment of *A. cephalotes* genetic diversity in South America.

Key words: *Atta*, colonization, ant, insular population.

López Díaz, A. & Sedano Cruz, R. E. (2019). Caracterización genética de la hormiga *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) en Isla Gorgona, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 67(6), 1531-1542.

Una de las zonas con mayor riqueza de especies en el mundo es el Chocó biogeográfico, donde se encuentran ampliamente distribuidos los bosques húmedos tropicales que albergan una gran diversidad de mirmecofauna (Fowler et al., 1989). En esta región del Pacífico Oriental Tropical (POT *sensu lato*) (Robertson & Allen, 2015; Vega, Hernandez-Guerrero, & Cruz-Barraza, 2012) el conocimiento sobre

la distribución de la hormiga cortadora *Atta cephalotes*, así como la variación genética de la especie en el Pacífico colombiano y su relación con agrupaciones poblacionales propuestas en estudios previos es limitado. Se ha propuesto que *A. cephalotes* conforma dos grupos genéticamente estructurados en el Neotrópico, un grupo se encuentra distribuido en Centroamérica y el noroccidente de los Andes colombianos,

y un segundo grupo se extiende desde los Andes ecuatorianos hasta el sur de la Amazonía en Brasil (Solomon, Bacci, Martins, Goncalves Vinha, & Mueller, 2008); una hipótesis biogeográfica que aún debe ser examinada.

La hormiga cortadora *Atta cephalotes* es uno de los organismos herbívoros más exitoso del Neotrópico con una amplia distribución desde México hasta Argentina (Bacci et al., 2009; Solomon, 2007). Estudios previos sugieren que las hormigas cortadoras habitan islas del Caribe, las Antillas, así como islas del Pacífico Oriental (Haines, 1975; Solomon, 2007; Terborgh, Feeley, Silman, Nuñez, & Balukjian, 2006; Valdés-Rodríguez, Chacón De Ulloa, Armbrrecht, 2014). Sin embargo, la ocurrencia y dispersión de *A. cephalotes* en áreas insulares del Pacífico ha sido poco estudiada a pesar de ser un componente común de la mirmecofauna (Lincango & Morales, 2005; Solomon & Mikheyev, 2005; Solomon, 2007; Valdés-Rodríguez et al., 2014). Asimismo, aspectos del proceso de colonización y de variación genética de estas poblaciones insulares son prácticamente desconocidos.

La Isla Gorgona, una de las dos áreas insulares del Pacífico colombiano donde predomina la selva húmeda tropical (UAESPNN, 2018), presenta una alta riqueza de hormigas y *A. cephalotes* se destaca como una de las hormigas más comunes en la isla (Valdés-Rodríguez et al., 2014). Aunque existen diferentes estudios sobre ecología, diversidad y riqueza de hormigas (Arcusa, 2017; Vázquez-Moreno, Matienzo, Alfonso, Moreno, & Álvarez, 2009; Zabala, Arango, & Chacón de Ulloa, 2013), el conocimiento sobre la sistemática de las hormigas cortadoras, así como aspectos biológicos y ecológicos de varias especies es aún insuficiente (Fernández, 2003). Actualmente se desconoce el patrón de distribución espacial de la variación genética de *A. cephalotes* para Colombia, incluyendo la Isla Gorgona.

Este estudio tiene como objetivo realizar la caracterización del gen Citocromo Oxidasa I de *A. cephalotes* para examinar su variación en la Isla Gorgona en el marco del POT. Con este marcador se examinó si la diversidad genética

de *A. cephalotes* en la Isla Gorgona está cercanamente relacionada con la región oriental de la cordillera de los Andes (región *cis*-Andina), como supone la propuesta biogeográfica de Solomon et al. (2008). Para esto se implementó un análisis de varianza molecular, así como un análisis bayesiano de asignación de individuos en poblaciones, y utilizando un método basado en la teoría de circuitos se calculó un mapa de conectividad genética de *A. cephalotes* en el POT. Además, mediante un análisis de la coalescencia, se examina si la separación entre la Isla Gorgona y el margen continental del Pacífico oriental representa una barrera que podría haber facilitado la estructuración genética de *A. cephalotes*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y recolección de muestras: Este estudio se realizó en el Parque Nacional Natural Isla Gorgona ubicado en el Pacífico colombiano (2°9' N & 78°2' W) a 35 km de distancia desde el punto más cercano a la costa. El parque cuenta con un área terrestre de 1 382.29 Ha y su altura máxima se encuentra a 338 m.s.n.m. (UAESPNN, 2018). La recolección de individuos en este sitio se realizó durante caminatas a lo largo del borde oriental de la isla como en el borde sur-occidental; al interior del bosque, entre la zona de asentamiento (al sur-occidente de la isla) y sobre el camino hacia el punto más alto de la isla. Adicionalmente, se incluyen muestras secuenciadas *de novo* para localidades del Pacífico colombiano como Quibdó, Buenaventura, Dagua y Guapi.

PCR y secuenciación de ADN: El marcador genético utilizado para este estudio fue la subunidad I del gen mitocondrial que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa (COI). La extracción de ADN genómico se realizó con el kit Thermo Scientific®, para la amplificación del gen COI por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó 3.5 µl de H₂O, 12.5 µl de Taq DNA polimerasa (1X One Taq Hot Start Quic Maxter Mix), 2.5 µl BSA, 0.5 µl

DMSO, 0.5 µl de cada cebador, 5 ng de DNA para un volumen total de 25 µl. Los cebadores utilizados fueron GCTACTACATAATAKG-TATCATG (Kronauer, Gadau, & Hölldobler, 2004) y CAACATTTATTTTGATTTTTGG (Simon et al., 1994). Para el PCR se realizó una denaturación inicial a 94 °C (4 min) posteriormente una más corta a 94 °C durante 40 s, un alineamiento a 45 °C (1 min), elongación a 72 °C (1.5 min) por 6 ciclos desde el segundo paso. Luego una segunda denaturación a 94 °C (1 min), una alineación a 55 °C (1 min), una elongación a 72 °C (1.5 min) por 30 ciclos y una extensión final a 72 °C (10 min). Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa de 2 % y posteriormente se enviaron a Macrogen Inc. para su purificación y secuenciación usando una reacción con BigDye (Applied Biosystems™).

La curación de las secuencias se llevó a cabo visualmente en el programa Sequencher 4.1.4 (Arbor, 2010). Se obtuvo el marco de lectura del gen para cada secuencia en la plataforma en línea ORFfinder (Rombel, Sykes, Rayner, & Johnston, 2002). Posteriormente, las secuencias fueron sometidas en la base de datos genéticos Genbank (Benson et al., 2013) y utilizando la plataforma BLAST (Johnson et al., 2008) se compararon con registros previos para comprobar su identidad. Se construyó una base de datos con la información genética disponible en Genbank (Benson et al., 2013) y con registros nuevos que representan información genética para la Isla Gorgona y el Pacífico colombiano.

Diversidad genética: Los análisis se realizaron partir de un alineamiento de 414 pb entre las secuencias seleccionadas para este estudio. La diversidad nucleotídica (π) y el estadístico D de Tajima (Tajima, 1989) se estimaron en el programa Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). La riqueza haplotípica se calculó a partir de un criterio 99.999 % de identidad nucleotídica entre todo el conjunto de secuencias COI siguiendo una metodología descrita previamente para malaria aviar (Gil

& Sedano, 2019) y utilizando para esto el programa Usearch (Edgar, 2010).

Estructura genética: La estructura genética de *A. cephalotes* se estudió a escala continental (América) y a escala local (POT) utilizando la ubicación geográfica reportada para cada secuencia (Apéndice Digital 1). Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) del marcador COI en el programa Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010) entre las secuencias encontradas en la región *trans*-andina y aquellas de la región *cis*-andina. Adicionalmente, para la región del POT se construyó una red de haplogrupos utilizando el método “Median-Joining” en el programa PopArt (Röhl, Bandelt, & Forster, 1999) y se realizó una AMOVA entre las secuencias de los haplogrupos identificados en la isla con aquellas de los haplogrupos en el área continental del POT (Apéndice Digital 2).

Un análisis espacial de la estructura genética se desarrolló mediante una prueba de asignación de individuos para estimar el número probable de poblaciones que conforma la distribución de *A. cephalotes*. Con la incorporación de coordenadas geográficas en el análisis se considera de manera explícita la incertidumbre de la ubicación espacial de cada individuo y se puede estimar el número más probable de agrupaciones genéticas (k) alcanzando equilibrio Hardy-Weinberg (Rodríguez, 2013). Para esto se utilizó el paquete Geneland 4.0.8 del programa R 3.4 que implementa un algoritmo basado en un modelo Bayesiano y el método Monte Carlo de cadenas de Markov (Guillot, Estoup, Mortier, & Cosson, 2005). Este análisis confiere a cada individuo una probabilidad posterior de ser asignado en una agrupación k sin un conocimiento *a priori* sobre las unidades poblacionales o de sus límites geográficos (Guillot et al., 2005).

El modelo espacial asume que la dispersión para el género *Atta* es de 2 a 50 km (Solomon et al., 2008), se calculó *grosso modo* una capacidad máxima de dispersión media equivalente a 676 km² y se realizó un análisis en Geneland (Guillot et al., 2005) con $k = 6$

como el número máximo de poblaciones. El análisis se repitió independientemente diez veces y se recuperaron 25 000 datos a partir de 1 000 000 de iteraciones en cada repetición. Para elegir la repetición que mejor se ajusta al análisis con un modelo espacial implementado en Geneland (Guillot et al., 2005) se utilizó un criterio de decisión a partir del logaritmo de los Factores de Bayes (LBF). Si al comparar dos modelos (modelo uno y modelo dos), el valor $LBF < -2$ entonces es preferible seleccionar el modelo dos, mientras que si $LBF > 2$ será preferible seleccionar el modelo uno (Kass & Raftery, 1995).

Se realizó la delimitación geográfica en el POT de una población de *A. cephalotes*, examinando la distribución de probabilidad que resulta de la asignación de individuos en Geneland (Guillot et al., 2005). La distribución de probabilidad es incorporada a un análisis complementario de conectividad que se fundamenta en la teoría de circuitos eléctricos y es desarrollado en el programa Circuitscape 4.0 (McRae, Shah, Mohapatra, & Anantharaman, 2014). En este análisis las características del paisaje de probabilidad se presentan en términos de conductividad o resistencia. Sobre este paisaje se itera una serie de caminatas aleatorias entre nodos que siguen un modelo Markoviano (McRae, Shah, & Mohapatra, 2013). El análisis de conectividad se utiliza para proyectar en un mapa el cálculo de la conductividad de la variación genética en términos del paisaje de probabilidad de asignación de individuos. Altos valores de conductividad indican mayor conectividad entre nodos, y en este caso, los nodos corresponden a cada uno de los sitios de muestreo. La variación de la conectividad entre dos nodos representa en cierto modo un cambio espacial en la variabilidad genética. Además, en este análisis la cordillera de los Andes se constituye *a priori* como una barrera asumiendo un límite altitudinal por encima de los 1 500 m.s.n.m para la distribución de *A. cephalotes* entre la región *trans-andina* y *cis-andina*.

Análisis demográfico: Se realizó un análisis de coalescencia para examinar modelos

de migración de *A. cephalotes* entre el área continental y la Isla Gorgona con el programa Migrate 4.2.14 (Beerli, 2017) y posteriormente estimar el tamaño efectivo poblacional (θ) y la tasa de migración (M) escalados a la tasa de mutación utilizando el modelo que mejor se ajusta a los datos. Mediante un análisis bayesiano (Beerli, 2016) este programa utiliza información de la genealogía, considera la incertidumbre en la estimación propia de la genealogía y asume θ constante, o que a lo sumo varía aleatoriamente alrededor de su valor medio, resultando más informativo que el índice de fijación Φ_{st} calculado con un AMOVA.

En Migrate se programó una cadena de 900 000 genealogías, se descartaron 300 000 árboles iniciales y con 20 repeticiones independientes se hizo un promedio para la estimación de los parámetros. Para esto se utilizó un modelo de sustitución HKY ajustado (igual frecuencia para todas las bases), seleccionado en el programa jModelTest 2.1 (Darriba, Taboada, Doallo, & Posada, 2012; Guindon & Gascuel, 2003), y una proporción $T_i/T_v = 2.0$ para estimar las frecuencias nucleotídicas de los datos. Se implementó el modo adaptativo de cadenas calientes, donde en cada paso se realizan intercambios de aceptación y rechazo en las estimaciones de los parámetros, para asegurar una búsqueda independiente y comprensiva del espacio estadístico de los parámetros. La estacionalidad de la simulación fue determinada por altos valores ESS de cada parámetro. La integración termodinámica de la aproximación de Beziér (implementada en Migrate) fue utilizada para estimar el valor marginal de verosimilitud y calcular la probabilidad condicionada a los datos de los diferentes modelos. Con los modelos poblacionales de mayor probabilidad se reinterpretan los valores del parámetro M como una aproximación al número de inmigrantes efectivos por generación (Nm) (Beerli, 2016), utilizando el programa R 3.4.4 (R Core Team, 2017).

Filogenia y tiempo de divergencia: Una reconstrucción de la genealogía para los haplogrupos de *A. cephalotes* se realizó en el

programa Beast 1.8.4 (Suchard et al., 2018), disponible en Cípres (Miller, Pfeiffer, & Schwartz, 2010). El análisis se implementó considerando un reloj molecular relajado con distribución Lognormal y un modelo HKY ajustado para la sustitución nucleotídica (igual frecuencia para todas las bases). Además, se propuso un tamaño constante para la población y se asignó una distribución normal para la tasa de sustitución con un valor medio de 9.5 sustituciones por sitio por millón de años (Solomon, 2008).

RESULTADOS

La base de datos para el gen mitocondrial COI de *A. cephalotes* contiene un total de 422 secuencias de tamaño variable (224-721 pb) reportadas para 14 países de América (Apéndice Digital 3). Esta compilación de secuencias corresponde a 389 registros de GenBank (Benson et al., 2013) y 33 registros secuenciados *de novo* para la región del Pacífico colombiano (Apéndice Digital 1) con un marco de lectura abierto de 414 pb (MG948859 - MG948889, MG948891, MG948895).

Se identificaron 42 grupos haplotípicos en total, entre las 422 secuencias de la base de datos. En el POT se encuentran 18 haplogrupos, 16 de ellos son endémicos de esta región (Apéndice Digital 2). Los valores estimados para el estadístico D de Tajima en cada localidad sugieren que el marcador COI satisface la condición de neutralidad y los valores negativos observados en la mayoría de las agrupaciones indican un exceso de alelos pocos comunes en el POT (Tabla 1).

Análisis poblacional a escala regional:

El análisis de asignación de individuos implementado en Geneland (Guillot et al., 2005) indica $k = 4$ poblaciones como el número más probable de agrupaciones genéticas que conforma *A. cephalotes* ($LBF \leq -176.2542$). Este resultado constituye una primera aproximación a la delimitación geográfica de la estructura genética para *A. cephalotes* en el POT (Apéndice Digital 4). El análisis de conectividad implementado en Circuitscape (McRae et al., 2013) facilitó definir límites geográficos más precisos para una población que coincide espacialmente con la región Dominio Pacífico

TABLA 1
Diversidad de haplogrupos del gen COI de *A. cephalotes* entre localidades de la región *trans*-andina y la región *cis*-andina como un único grupo

TABLE 1
Diversity of COI gene haplogroups of *A. cephalotes* for *trans*-andean locations and the *cis*-andean region as a whole

Localidades	N	H	Hd	π	Tajima D	P-valor
Andes (Colombia)	7	3	0.0545	0.5238 ± 0.2086	-1.2371	0.1179
Buenaventura	2	2	0.0363	1.0000 ± 0.5000	0.0000	1.0000
Dagua	7	4	0.0727	0.7143 ± 0.1809	-1.4341	0.0629
Gorgona	10	2	0.0363	0.3556 ± 0.1591	0.0149	0.7352
Guapi	7	4	0.0727	0.8571 ± 0.1023	-0.8764	0.2721
Quibdó	7	4	0.0727	0.7143 ± 0.1809	-0.6540	0.3223
Costa Rica	14	4	0.0727	0.6484 ± 0.1163	-0.2600	0.4437
Ecuador	8	3	0.0545	0.4643 ± 0.2000	-0.4479	0.3318
Panamá	9	6	0.1090	0.8889 ± 0.0910	-1.0690	0.1860
<i>cis</i> -Andes	64	23	0.4181	0.8036 ± 0.0509	0.1428	0.6288

N: número de muestras, H: número de haplogrupos, Hd: diversidad haplotípica, π : diversidad nucleotídica ± desviación estándar, el índice D de Tajima con su valor-P de la prueba de neutralidad.

N: sample size, H: haplotype groups, Hd: haplotypic diversity, π : nucleotidic diversity and the standard deviation, Tajima's D and neutrality test P-value.

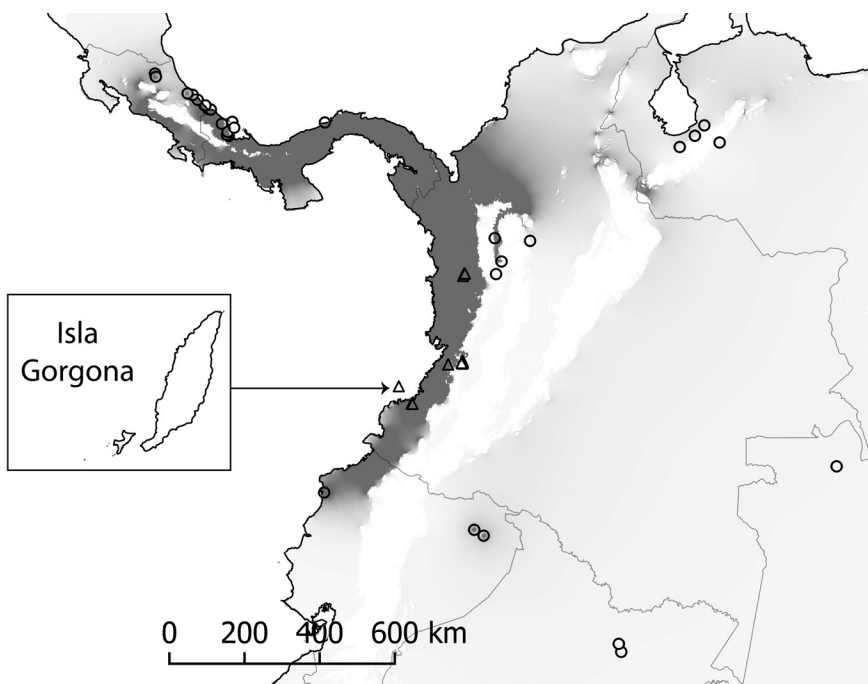


Fig. 1. Conectividad de la variabilidad genética de *A. cephalotes* en el Pacífico Oriental Tropical. A mayor conectividad espacial, más oscuro es el sombreado de gris en el mapa, y viceversa. La estimación de conectividad usa la interpolación de la probabilidad de asignación de individuos del análisis en Geneland (ver métodos y Apéndice Digital 4.A). Las accesiones del GenBank (círculos) y las muestras *de novo* para este estudio (triángulos) (ver Apéndice Digital 1).

Fig. 1. Spatial connectivity of the genetic variability for *A. cephalotes* in the Eastern Tropical Pacific. A higher connectivity across space is shown in darker gray-shade on the map, and vice versa. The connectivity estimates use spatial interpolation of probabilities from the individual assignment test using Geneland (see methods and Digital Appendix 4.A). GenBank accessions (circles) and *de novo* samples for this study (triangles) (see Digital Appendix 1).

según la caracterización de regiones biogeográficas (Morrone, 2014). Esta población de *A. cephalotes* se denomina de ahora en adelante Dominio del Pacífico y se distribuye en Costa Rica, Panamá, la mayor parte del occidente de Colombia y el norte *trans*-andino del Ecuador (Fig. 1 y Apéndice Digital 4.A).

El hecho que la mayoría de grupos haplotípicos identificados en la población Dominio del Pacífico sean en su mayoría endémicos de la región *trans*-andina es consistente con la alta probabilidad de asignación de individuos en esta población (Apéndice Digital 4.A). Existe un patrón de distribución diferencial de la variación genética de *A. cephalotes* entre las regiones *trans*-andina y *cis*-andina (AMOVA $\Phi_{st1} = 0.2749$, Prueba Exacta de Distribución Individual $P = 0.0000001$). En la

región *trans*-andina la diversidad genética de *A. cephalotes* es mayor que aquella de la región *cis*-andina (Tabla 1).

Análisis poblacional a escala local: En la Isla Gorgona los individuos de *A. cephalotes* son genéticamente similares a los individuos de localidades cercanas en áreas continentales de Colombia y en contraste, menos parecidos a las hormigas cortadoras del área continental en el Ecuador o en América central (Tabla 2). En Gorgona están representados sólo dos grupos haplotípicos de *A. cephalotes*, H16 y H17. Ambos son frecuentes en el Dominio del Pacífico con una distribución discontinua en la zona continental sin que medie una barrera geográfica aparente (Fig. 2A). La distribución espacial de H16 y H17 sugiere la delimitación

TABLA 2
Distancia genética para gen COI de *A. cephalotes*
entre la Isla Gorgona y áreas continentales del
Pacífico Oriental Tropical

TABLE 2
Genetic distance of *A. cephalotes* for gen COI among
the Gorgona Island and mainland areas of
the Eastern Tropical Pacific

Localidades	Φ_{st}^1
Costa Rica	0.42374*
Panamá	0.26829*
Andes (Colombia)	0.05405
Quibdó	0.17586
Buenaventura	0.68750
Dagua	0.61827*
Guapi	0.12773
Ecuador	0.91734*

¹ Índice de fijación entre grupos.

* Diferencias $P < 0.05$.

latitudinal ($5^{\circ}6' N$) de dos áreas en el margen continental del POT en Colombia. Estas áreas corresponden a una región hacia el sur que incluye las localidades de Quibdó, Dagua, Buenaventura, Guapi e Isla Gorgona, en el Pacífico colombiano y termina en su punto más al sur en Ecuador ($0^{\circ}4' N$). Otra región hacia el norte que incluye áreas hacia el norte de los Andes colombianos, Panamá y termina con su punto más al norte en Costa Rica ($10^{\circ}4' N$) (Fig. 2A). La genealogía de *A. cephalotes* muestra un patrón politómico extenso (Apéndice Digital 5). El tiempo de divergencia de H16 y H17 podría ser muy reciente pero esta estimación debe ser interpretada cuidadosamente debido a que el nodo que relaciona H16 y H17 con su ancestro común más cercano presenta un bajo apoyo, 0.75 de probabilidad posterior (Apéndice Digital 5).

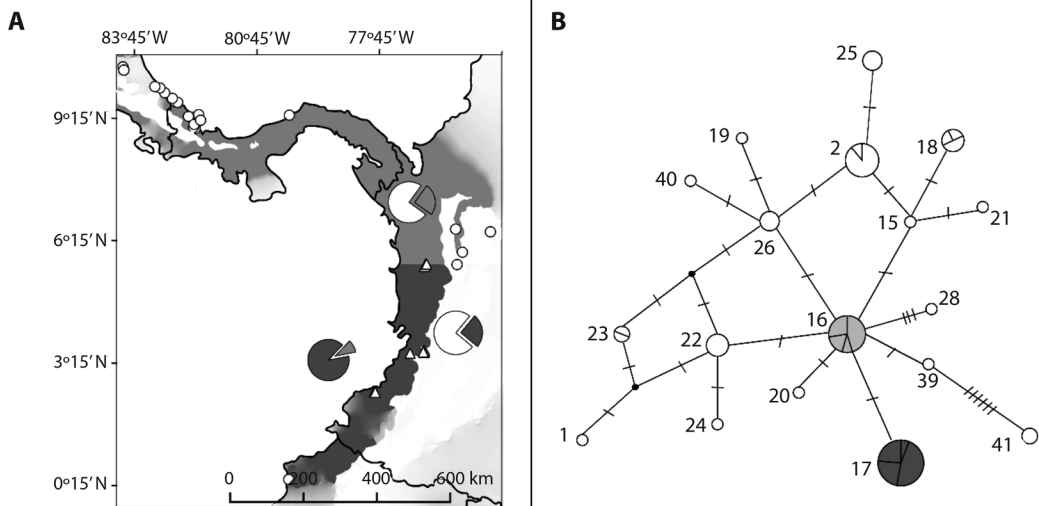


Fig. 2. (A) Distribución de los haplogrupos H16 (gris claro) y H17 (gris oscuro) y la frecuencia de estos haplogrupos en el área continental y en la Isla Gorgona (gráfico circular). **(B)** Red de haplogrupos en el Dominio del Pacífico. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de cada haplogrupo, a mayor tamaño mayor número de secuencias en la muestra. En la red cada barra entre los círculos equivale a un paso mutacional y los puntos negros representan un ancestro hipotético. Los círculos en color gris claro y gris oscuro representan los haplogrupos H16 y H17, respectivamente; y los círculos blancos representan la proporción de los otros haplogrupos numerados en el Dominio del Pacífico (Apéndice Digital 2).

Fig. 2. (A) Distribution of haplotypic groups H16 (light grey) and H17 (dark grey) and the frequency of these haplogroups in the mainland and the Gorgona Island (pie charts). **(B)** Haplotype network in the Pacific Domain. The size of the circles is proportional to the frequency of each haplogroup, that is, the larger the circle, the greater number of sequences in the sample. In the network, each bar between circles is equivalent to a mutational step and the black dot represent an unknown ancestor. The circles in light gray and dark gray represent the haplogroups H16 and H17, respectively; and the circles in white show the proportion of the other haplogroups numbered in the Pacific Domain (Apéndice Digital 2).

Existe evidencia de diferenciación genética dentro del área continental como también entre la Isla Gorgona y las áreas continentales del POT (Fig. 2A). Se encontró diferenciación de *A. cephalotes* entre la Isla Gorgona y la región sur de la costa pacífica (AMOVA $\Phi_{st_2} = 0.1641$, Prueba Exacta de Distribución Individual $P = 0.01366$) (Fig. 2A). Igualmente existe diferenciación genética entre la Isla Gorgona y la región norte de la costa pacífica (AMOVA $\Phi_{st_2} = 0.1828$, Prueba Exacta de Distribución Individual $P = 0.00545$) (Fig. 2A). Es informativo señalar que también existe diferenciación genética entre las regiones norte y sur dentro del área continental (AMOVA $\Phi_{st_2} = 0.22269$, Prueba Exacta de Distribución Individual $P = 0.00001$).

Los resultados del análisis de la coalescencia sugieren que dos de los siete modelos poblacionales examinados en Migrate-n acumulan aproximadamente el 92 % de la probabilidad en la selección de modelos (Apéndice Digital 5). Ambos modelos coinciden en indicar un flujo genético asimétrico entre la Isla Gorgona y el área continental del Pacífico, pero describen relaciones de ancestría diferentes entre las poblaciones examinadas aquí. Los modelos poblacionales con mayor probabilidad, ambos, sugieren que existe migración unidireccional desde la isla hacia el continente (Apéndice Digital 6). La estimación de parámetros demográficos con estos dos modelos resulta en valores modales para $\theta_{\text{continente}}$, θ_{Gorgona} y $M_{\text{Gorgona} \rightarrow \text{Continente}}$ alrededor de 0.01430, 0.00271 y 508.0, respectivamente. El cálculo de Nm sugiere que cerca de 4 inmigrantes por generación se mueven hacia la población del Pacífico continental desde la isla. Sólo la distribución posterior de $M_{\text{Gorgona} \rightarrow \text{Continente}}$ muestra que una parte de esta curva podría no diferenciarse de cero y por esto su interpretación debe realizarse con precaución (Apéndice Digital 7). Colectivamente, el análisis sugiere que el flujo podría ser bajo o que la cantidad de variación entre las secuencias parciales de COI podría ser insuficiente para la estimación de una distribución de M con todos sus valores diferentes a cero.

Las nuevas secuencias del gen COI de *A. cephalotes* de la Isla Gorgona y el Pacífico colombiano cubren una brecha de información en el POT que se suman a los aportes de previos estudios (Martins et al., 2007; Solomon et al., 2008; Tranter, 2016). Sabemos ahora que el Pacífico colombiano, incluyendo la Isla Gorgona, alberga una proporción importante de la diversidad genética de *A. cephalotes*; aproximadamente 23 % de la diversidad genética que ha sido caracterizada para esta especie en Suramérica. Así, una región que equivale a menos del 1 % del área global, acumula cerca de un cuarto de la diversidad genética de herencia matrilinea para esta especie.

De este modo fue posible hacer una aproximación espacial de la estructura genética en el POT para uno de los organismos más abundantes y con más amplia distribución en el continente americano. Los resultados de la asignación de individuos de *A. cephalotes* en cuatro agrupaciones espacialmente definidas en este estudio no coinciden con la asociación de agrupaciones geográficas presentado por Solomon et al. (2008), esta aproximación filogenética para definir agrupaciones geográficas es inconsistente con el soporte de la topología del árbol. Dichas agrupaciones no son reproducibles debido a un extenso patrón de politomías en la genealogía del marcador COI, es decir, un patrón generalizado de bajo soporte de nodos que se verificó con un análisis de inferencia filogenética realizado en nuestro estudio (Apéndice Digital 5).

En contraste con el estudio previo, nosotros presentamos una aproximación a la biogeografía de *A. cephalotes* implementando un análisis de asignación de individuos en poblaciones con un modelo espacial explícito que tiene en cuenta la variación genética y la capacidad de dispersión conocida para la especie. Este modelo es sujeto de análisis probabilísticos bayesianos reproducibles que además pueden ser consistentemente extrapolados a un contexto geográfico bien definido, utilizando

una metodología con un marco teórico robusto (Guillot et al., 2005).

La evidencia sugiere que la Isla Gorgona mantiene en sus 26 km² el 11 % de los haplogrupos del gen COI en el Dominio del Pacífico, la población de *A. cephalotes* genéticamente más diversa del continente. La distribución espacial de los haplogrupos identificados en el Dominio del Pacífico indica que la Isla Gorgona pudo ser colonizada por reinas procedentes de la costa pacífica colombiana con las cuales presenta mayor identidad de ADN de herencia matrilinea. Aunque la capacidad de dispersión de *A. cephalotes* podría ser suficiente para promover la colonización de la isla desde áreas continentales próximas, eventos de introducción antropogénica de estas hormigas cortadoras no pueden ser excluidos como una explicación parsimoniosa para la colonización de ambos haplotipos en la isla.

Probablemente la colonización de la Isla Gorgona se dió desde latitudes al norte de la localidad de los Andes (6°15' N) como también desde poblaciones al suroccidente colombiano como la localidad de Guapi, un puerto de embarcación con influencia en la isla a tan solo 60 km de distancia (Fig. 2.A). Este resultado es congruente con estudios previos que indican, como entre los artrópodos, los linajes que colonizan islas provienen de las áreas continentales más próximas (Edwards & Thornton, 2001; Garb & Gillespie, 2006, 2009; Gillespie & Roderick, 2002; Lourenco & Flores, 1989; Sharma & Giribet, 2012). Por otra parte, estudios en la Isla Gorgona sobre la diversidad y el proceso de dispersión de las especies de árboles han especulado que el tamaño de la isla limita la disponibilidad de hábitats (Yockteng & Cavelier, 1998).

Independientemente del mecanismo de dispersión de *A. cephalotes* para colonizar la Isla Gorgona, la estimación de parámetros demográficos indica que el flujo genético de *A. cephalotes* entre la isla y el continente puede estar restringido. Es posible que la abundante población de *A. cephalotes* en un área insular pequeña, como es el caso de la Isla Gorgona, facilite la continua dispersión de algunas reinas

hacia áreas continentales próximas y en cambio restrinja el establecimiento en la isla de reinas inmigrantes que portan los grupos haplotípicos menos frecuentes de las áreas continentales. Así, el tamaño de la Isla Gorgona puede estar restringiendo el número de individuos en las poblaciones locales y aumentando potencialmente las tasas de extirpación en la isla.

Bajo nuestro análisis, los individuos de *A. cephalotes* que habitan las selvas del Pacífico colombiano, incluyendo la Isla Gorgona, conforma una población de hormigas cortadoras denominada aquí como Dominio del Pacífico. El rango de distribución geográfica de esta población puede ser acotada y representada en un mapa de conectividad genética, donde se observa que hacia los límites geográficos de la población es razonable predecir un cambio en su patrón de variación genética (Fig. 1 y Apéndice Digital 4A). Lo anterior permite especular que la diversidad genética de la región *cis*-andina colombiana conforma una agrupación divergente de aquella identificada en el POT. En estas fronteras sería interesante conocer cómo es la relación de la diversidad genética del Dominio del Pacífico con aquella de la región *cis*-andina de Colombia, Venezuela y Ecuador en una escala espacial más detallada.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Diana Gil y Javier Colmenares por sus aportes a una versión preliminar de este manuscrito. Gracias a Vanessa Muñoz Valencia por facilitar material que fue secuenciado por RS y editadas por AL como apoyo logístico a su trabajo de tesis. RS agradece a Claritza Muñoz como asistente de laboratorio de PCR y a la Dra. Mildrey Mosquera-Escudero por su generoso recibimiento en laboratorio del Departamento de Ciencias Fisiológicas. Este estudio es una contribución para la formación de estudiantes otorgada a RS por la Universidad del Valle. El permiso de investigación ha sido aprobado por la Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales de Colombia, y agradecemos a Luis

Payan y Ximena Zorrilla por su apoyo durante la visita en la Isla Gorgona.

RESUMEN

La variación genética entre las poblaciones insulares y continentales de las hormigas cortadoras de hojas ha sido poco estudiada, a pesar de su importancia para comprender su capacidad de dispersión, estructura regional y distribución de una de las especies más abundantes en el Neotrópico. **Objetivo:** Analizar la variación genética de una población insular de *Atta cephalotes* en un contexto regional más amplio para América Central y del Sur. **Métodos:** Se secuenció el gen de la Citocromo oxidasa I de *A. cephalotes* para las poblaciones de la isla Gorgona y el continente para realizar un análisis de la varianza molecular, flujo de genes, así como para calcular el tiempo de divergencia de los haplogrupos que se encuentran en la isla. Se realizó una prueba de asignación de individuos para estimar la conectividad genética espacial y la distribución de esta hormiga en el Pacífico Oriental Tropical. **Resultados:** un total de 33 muestras de la isla y el continente colombiano se compararon con 389 secuencias de *A. cephalotes* registradas en Genbank para América Central y Suramérica. Esta hormiga cortadora de hojas en la Isla Gorgona está estrechamente relacionada con el continente colombiano a pesar de que la separación entre la isla y el continente probablemente constituya una barrera para el flujo de genes. Es probable que dos de los haplogrupos más comunes en el continente llegaran a la isla recientemente. Por lo tanto, no se puede excluir la influencia antropogénica en el proceso de colonización de la isla por parte de esta hormiga cortadora de hojas. Un mapa de conectividad muestra que esta población tiene límites geográficos que se superponen en gran medida con una región biogeográfica dentro del Pacífico Oriental Tropical. Esta población *trans-andina* acumula el 23 % de la diversidad de herencia matrilineal de *A. cephalotes*. **Conclusiones:** Esta hormiga cortadora de hojas en la isla Gorgona y el Pacífico colombiano está estrechamente relacionada con la población centroamericana y toda esta región alberga un segmento significativo de la diversidad genética de *A. cephalotes* de Suramérica.

Palabras clave: *Atta*, colonización, hormiga, población insular.

REFERENCIAS

- Arbor, A. (2010). Sequencher (Version 4.10). Gene Codes Corporation. Michigan, USA. Retrieved from <https://www.genecodes.com>
- Arcusa, J. M. (2017). *Monitoreo de la reserva natural Paititi mediante el uso de grupos funcionales de hormigas (Hymenoptera: Formicidae)*, Buenos Aires, Argentina. Buenos Aires, Argentina: Universidad

Nacional de Mar del Plata. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

- Bacci, M. J., Solomon, S. E., Mueller, U. G., Martins, V. G., Carvalho, A. O. R., Vieira, L. G. E., & Silva-Pinhati, A. C. O. (2009). Phylogeny of leafcutter ants in the genus *Atta fabricius* (Formicidae: Attini) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 51, 427-437.
- Beerli, P. (2016). Migrate Documentation. Florida, USA: Florida State University, Department of Scientific Computing.
- Beerli, P. (2017). *Migrate* (Version 4.2.14). Retrieved from https://popgen.sc.fsu.edu/Migrate/Download_old.html
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41, 36-42.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing - Supplementary Information. *Nature Methods*, 9(8), 772-772.
- Edgar, R. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460-2461.
- Edwards, J. S., & Thornton, W. B. (2001). Colonization of an island volcano, Long Island, Papua New Guinea, and an emergent island, Motmot, in its caldera lake. VI. The pioneer arthropod community of Momot. *Journal of Biogeography*, 28, 1379-1388.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Fernández, F. (2003). *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
- Fowler, H. G., Pagani, M. I., Da Silva, O. A., Forti, L. C., Da Silva, V. P., & De Vasconcelos, H. L. (1989). A pest is a pest is a pest? The dilemma of neotropical leaf-cutting ants: Keystone taxa of natural ecosystems. *Environmental Management*, 13(6), 671-675.
- Garb, J. E., & Gillespie, R. G. (2006). Island hopping across the central Pacific: Mitochondrial DNA detects sequential colonization of the Austral Islands by crab spiders (Araneae: Thomisidae). *Journal of Biogeography*, 33(2), 201-220.
- Garb, J. E., & Gillespie, R. G. (2009). Diversity despite dispersal: Colonization history and phylogeography of Hawaiian crab spiders inferred from multilocus genetic data. *Molecular Ecology*, 18(8), 1746-1764.

- Gil, D. L., & Sedano, R. E. (2019). Genetic variation of avian malaria in the tropical Andes: a relationship with the spatial distribution of hosts. *Malaria Journal*, 18(1), 129.
- Gillespie, R. G., & Roderick, G. K. (2002). Arthropods on islands : Colonization, Speciation, and Conservation. *Annual Review of Entomology*, 47, 595-632.
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F., & Cosson, J. F. (2005). A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, 170(3), 1261-1280.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), 696-704.
- Haines, B. (1975). Impact of Leaf-Cutting Ants on Vegetation Development at Barro Colorado Island. In F. B. Golley & E. Medina (Eds.), *Tropical Ecological Systems. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)* (11th Ed, pp. 99-111). Berlin, Germany: Heidelberg.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server), W5-W9.
- Kass, R. E., & Raftery, A. E. (1995). Bayes' Factors. *Journal of the American Statistical Association*, 90(430), 773-795.
- Kronauer, D. J. C., Gadau, J., & Hölldobler, B. (2004). Phylogenetics of the new world honey ants (genus *Myrmecocystus*) estimated from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32, 416-421.
- Lincango, E. P., & Morales, G. (2005). *Análisis de Riesgo de Plagas para la Importación de Productos Vegetales a las Islas Galápagos*. Ecuador: Fundación Charles Darwin.
- Lourenco, W., & Flores, E. (1989). Los Escorpiones (Chelicerata) De Colombia. I. La Fauna De La Isla Gorgona. Aproximacion Biogeografica. *Caldasia*, 16(76), 66-70.
- Martins, J., Solomon, S. E., Mikheyev, A. S., Mueller, U. G., Ortiz, A., & Bacci Jr, M. (2007). Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). *Insect Molecular Biology*, 16(6), 777-784.
- McRae, B., Shah, V., & Mohapatra, T. (2013). *Circuitscape 4 User Guide*. The Nature Conservancy. Retrieved from <http://www.circuitscape.org>
- McRae, B., Shah, V., Mohapatra, T., & Anantharaman, R. (2014). *Circuitscape 4.0*. Retrieved from <http://www.circuitscape.org>
- Miller, M., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). *Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees*. Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans, LA, USA.
- Morrone, J. J. (2014). Biogeographical regionalisation of the neotropical region. *Zootaxa*, 3782, 1-110.
- R Core Team. (2017). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R fundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Robertson, D. R., & Allen, G. R. (2015). *Peces Costeros del Pacifico Oriental Tropical: sistema de Información en línea*. Versión 2.0. Balboa, República de Panamá: Instituto Smithsonian de Investigación.
- Rodriguez, S. (2013). Hardy-Weinberg Law. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2nd Ed., pp. 396-398). Cambridge, USA: Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-374984-0.00683-5
- Röhl, A., Bandelt, H. J., & Forster, P. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.
- Rombel, I. T., Sykes, K. F., Rayner, S., & Johnston, S. A. (2002). ORFfinder: a vector for high-throughput gene identification. *Gene*, 282(1-2), 33-41.
- Sharma, P. P., & Giribet, G. (2012). Out of the Neotropics: Late cretaceous colonization of Australasia by American arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1742), 3501-3509.
- 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.
- Solomon, S. E., Bacci, M. J., Martins, J. J., Goncalves Vinha, 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.
- Solomon, S. E., & Mikheyev, A. S. (2005). The Ant (Hymenoptera : Formicidae) Fauna of Cocos Island, Costa Rica. *The Florida Entomologist*, 88(4), 415-423.
- Solomon, S. E. (2007). *Biogeography and evolution of widespread leafcutting ants, Atta spp. (Formicidae, Attini)* (Doctoral dissertation). The University of Texas at Austin, Texas, USA.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4(1), 1-5.

- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- Terborgh, J., Feeley, K., Silman, M., Nuñez, P., & Balukjian, B. (2006). Vegetation dynamics of predator-free land-bridge islands. *Journal of Ecology*, 94, 253-263.
- UAESPNN. (2018). *Plan de Manejo Parque Nacional Natural Gorgona 2018-2023*. Colombia. Retrieved from <http://www.parquesnacionales.gov.co/portal/es/organizacion/planes-de-manejo-areas-del-sistema-de-parques-nacionales-naturales-de-colombia/>
- Valdés-Rodríguez, S., Chacón De Ulloa, P., & Armbrecht, I. (2014). Especies de hormigas del suelo en el Parque Nacional Natural Gorgona, Pacífico Colombiano. *Revista de Biología Tropical*, 62, 265-276.
- Vázquez Moreno, L. L., Matienzo Brito, Y., Alfonso Simonetti, J., Moreno Rodríguez, D., & Álvarez Núñez, A. (2009). Diversidad de especies de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) en cafetales afectados por *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Fitosanidad Habana*, 13(3), 163-168.
- Vega, C., Hernandez-Guerrero, C., & Cruz-Barraza, J. (2012). Biogeografía de esponjas marinas (Phylum Porifera); estudios en el Pacífico Oriental. *CICIMAR Océánides*, 27(1), 35-50.
- Yockteng, R., & Cavelier, J. (1998). Diversidad y mecanismos de dispersión de árboles de la Isla Gorgona y de los bosques húmedos tropicales del Pacífico colombo-ecuatoriano. *Revista de Biología Tropical*, 46(1), 45-53.
- Zabala, G. A., Arango, L. M., & Chacón de Ulloa, P. (2013). Diversidad de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) en un paisaje cafetero de risaralda, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 141-149.