



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**RELACIONES FILOGENÉTICAS Y PATRONES DE  
DIVERSIFICACIÓN DE LAS AVISPAS DEL  
GÉNERO *PEGOSCAPUS* (AGAONIDAE)  
POLINIZADORAS DEL COMPLEJO *FICUS AUREA*  
(MORACEAE)**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

PRESENTA:

**PAULINA VÁZQUEZ QUINTANA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ**



Ciudad Universitaria, CDMX., 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Hoja de Datos

### 1. Datos del alumno

Vázquez

Quintana

Paulina

5537069807

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

310338459

### 2. Datos del tutor

Dr.

Antonio

González

Rodríguez

### 3. Datos del sinoadal 1

Dr.

Alejandro

Zaldívar

Riverón

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.

Guillermo

Ibarra

Manríquez

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.

Juan José

Morrone

Lupi

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Karen Beatriz

Hernández

Esquivel

### 7. Datos del trabajo escrito

Relaciones filogenéticas y patrones de diversificación de las avispas del género *Pegoscapus* (Agaonidae) polinizadoras del complejo *Ficus aurea* (Moraceae)”

83pp

2019

## **Agradecimientos**

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la beca y el apoyo para llevar a cabo diversas facetas del trabajo de campo y laboratorio de la presente tesis, dentro del proyecto IN208217 denominado “Filogeografía comparada del complejo taxonómico *Ficus aurea* (Moraceae) y sus avispas polinizadoras del género *Pegoscapus* (Agaonidae)”.

### *Agradecimientos personales*

A mi mamá Tere y a mi papá Juan, por apoyarme y creer en mí desde siempre. Por motivarme y darme ánimos en los momentos que más necesitaba. Por su esfuerzo diario para que yo esté bien. Sobre todo por su amor, sus enseñanzas y su confianza. Gracias papás, los amo. ¡Lo logramos juntos! Incluyo a toda mi familia, a mis abuelitos que nos enseñaron el valor de una familia unida, a mis primos, tíos, a mis hermanos y a mi tía Pali por siempre estar dispuesta a ayudarme.

El proceso de concepción y elaboración de la tesis fue largo, tuvo origen en otros proyectos, por lo que en especial agradezco a Alejandro Gordillo por escuchar y aceptar mis ideas sobre ecología de aves. A Raúl y a Mike por acompañarme a mi pueblito, Temascalcingo. También a Rubén por incluirme en su proyecto y ayudarme a plantear el tema sobre especies invasoras.

Agradezco a todas las personas que me apoyaron en mi decisión y en las consecuencias de mudarme a Morelia, quienes han sido innumerables. En particular a Maciek, quien me motivó a tomar esta oportunidad con entusiasmo y cariño. Gracias por darlo todo, por acompañarme en México, por tu paciencia porque ambos sabemos lo que ha significado este proceso para nosotros. Te amo.

Al Laboratorio de Ecología y Sistemática Vegetal, a Karen y al Dr. Ibarra por acogerme en su equipo. A todo el lab, que con todas las conversaciones y debates me han ayudado a continuar encontrando inspiración por las avispas y los *Ficus*, y sobre todo por brindarme su amistad.

Al Laboratorio de Genética de la Conservación, en especial a Toño, quien ha hecho posible este proyecto. Gracias por permitirme continuar a pesar de los tiempos de altas y bajas en los que me encontré. A Diushi, cuya ayuda fue esencial para la realización de esta tesis, y por compartir conmigo su visión de la Ciencia. A todo el lab y a quienes me abrieron las puertas de su casa y me dieron posada en Morelia, de corazón ¡Gracias!

A mis sinodales, por su tiempo para revisar este proyecto, por todas sus aportaciones, y por discutir conmigo sobre aquellas interesantes incógnitas en la Biología.

A mis compañeros de WWF en la Ciudad de México y de la Reserva de la Mariposa Monarca; y a todo el equipo que conocí en el Bosque de Chapultepec, quienes me impulsaron profesionalmente y me dieron otra perspectiva de la situación ambiental y social en México. ¡Los admiro!

A mis amigos de toda la vida, a los amigos de la Facultad a lo largo de los años, a Mariela, Diego, Esba, Cristina, Mauricio, Javi, Isa, Gerardo, Isabel, Nati, Carol, Iván, a mis amigos del intercambio en la Universidad de Varsovia, Ola, Vincent y Tom. A todos mis profesores, ¡Les debo tanto! A mis profesores del TAE, en quienes encontré gran apoyo y amistad, gracias Roberto Zocco, Juan Carlos, Jovita. En especial, a Miss Ángeles y a Víctor, ustedes fueron clave para que decidiera seguir mi pasión en las Ciencias Naturales. Son todos ustedes personas increíbles que me ayudaron también a sensibilizarme en la parte humana. Gracias por su invaluable cariño, ánimos y enseñanzas a través de los años.

Gracias a todos ustedes los que no tengo espacio de enlistar, porque no habría sido posible sin su presencia en mi vida.

Finalmente agradezco a la Facultad de Ciencias, a la UNAM, mi casa de estudios y *alma máter*, por la cual concluyo alegremente esta etapa, le debo mi gratitud infinita por haberme dado tantas oportunidades. Por la excelencia que la caracteriza, por formarme, enseñarme el valor del esfuerzo, el compromiso y por ayudarme a crecer como persona. ¡Goya!

*A mi familia,  
Por su apoyo y amor incondicional*

## Tabla de contenido

<b>Resumen</b> .....	7
<b>Introducción</b> .....	8
I. Interacciones y especiación ecológica .....	8
II. Mutualismos y especificidad interespecífica.....	10
III. Evaluación de la coespeciación entre <i>Ficus</i> y Agaonidae .....	11
IV. Antecedentes sobre la hipótesis de especificidad uno a uno en <i>Ficus-Agaonidae</i> .....	11
V. Biología y ecología del mutualismo entre higueras y sus polinizadores .....	13
VI. Sistemática y genética del género <i>Pegoscapus</i> .....	15
VII. Especiación críptica en Agaonidae .....	16
VIII. El complejo de especies <i>F. aurea</i> y sus polinizadores.....	18
IX. Hipótesis biogeográficas de la distribución de <i>F. aurea</i> y sus polinizadores .....	20
X. Propiedades del marcador molecular COI.....	22
<b>Justificación</b> .....	23
<b>Preguntas de investigación</b> .....	24
<b>Hipótesis</b> .....	24
<b>Objetivos</b> .....	25
I. Objetivo general .....	25
II. Objetivos particulares .....	25
<b>Metodología</b> .....	26
I. Colecta en campo y puntos de muestreo .....	26
II. Identificación morfológica por microscopía y uso de claves taxonómicas.....	27
III. Extracción de ADN .....	28
IV. Amplificación de ADN por PCR.....	28
V. Edición y alineamiento de secuencias .....	30
VI. Estimación de la diversidad genética y distancias genéticas .....	30
VII. Reconstrucción de inferencia filogenética Bayesiana.....	31
VIII. Estimación de tiempos de divergencia por reloj molecular relajado .....	32
IX. Reconstrucción de áreas ancestrales .....	32
X. Análisis de delimitación de especies por el modelo <i>multi-rate Poisson Tree Processes</i> (mPTP).....	33
<b>Resultados</b> .....	35
I. Identificación morfológica por microscopía y uso de claves taxonómicas.....	35
II. Edición y alineamiento de secuencias de ADN.....	43

III. Estimación de la diversidad genética y distancias genéticas .....	44
IV. Reconstrucción filogenética bayesiana del gen COI.....	46
V. Estimación de tiempos de divergencia por reloj molecular relajado .....	49
VI. Reconstrucción de áreas ancestrales .....	50
VII. Análisis de delimitación de especies por el método mPTP.....	52
<b><i>Discusión</i></b> .....	<b>53</b>
I. Inferencias filogenéticas y evolutivas basadas en la filogenia de COI .....	53
II. Convergencias morfológicas y especiación críptica.....	56
IV. Hipótesis biogeográficas.....	57
V. Pérdida de la característica evolutiva de sacos polínicos en las coxa frontales .....	61
V. Perspectivas para futuras investigaciones.....	62
<b><i>Conclusiones</i></b> .....	<b>66</b>
<b><i>Literatura citada</i></b> .....	<b>68</b>
<b><i>Anexos</i></b> .....	<b>78</b>

## Resumen

El género *Pegoscapus* Cameron 1906 (Chalcidoidea, Agaonidae) está conformado por avispa polinizadoras nativas de América, que mantienen un mutualismo obligado con las plantas del género *Ficus* L. (subgénero *Spherosuke* Raf. Moraceae). Se han identificado cinco especies de avispa polinizadoras asociadas al complejo de especies *Ficus aurea* Nutt., para el cual se han propuesto cuatro entidades taxonómicas informales o formas (fo. *tuerckheimii*, fo. *isophlebia*, fo. *cookii* y fo. *aurea*), distribuidas desde Florida, Las Bahamas, Las Antillas Mayores y desde México hasta Panamá. A pesar de que la relación entre especies de avispa y de *Ficus* se ha considerado especie-específica, estudios recientes demuestran que la relación entre ambos interactuantes no siempre es uno a uno. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la riqueza de especies, la especificidad y las relaciones filogenéticas de los polinizadores del género *Pegoscapus* asociados a las formas de *F. aurea*; inferir posibles eventos de divergencia en el mutualismo y aportar información sobre la hipótesis de colonización de *Ficus* L. en América. Para lograrlo se realizó una filogenia de inferencia bayesiana utilizando secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI), se estimaron las distancias genéticas entre los clados y el tiempo de divergencia de los linajes de avispa mediante una filogenia datada. También se efectuó un análisis de reconstrucción de áreas ancestrales y uno de delimitación de especies con el método de mPTP (*multi-rate Poisson tree processes*). Los resultados indican la presencia de al menos nueve linajes con distancias genéticas entre ellos de alrededor del 10% para un fragmento de la región de código de barras de COI. La divergencia entre los linajes se estima que ocurrió durante el Mioceno medio-tardío (17-7 Ma). A su vez, se sugiere que no existe especificidad a nivel filogenético entre polinizadores y las formas de *F. aurea*. Se detectó un cambio de huésped para *Pegoscapus* sp. 3, y dos especies polinizadoras de *F. aurea* fo. *tuerckheimii* que presentan convergencias morfológicas marcadas con *Pegoscapus carlosi* y *Pegoscapus mariae*. Los resultados no se acoplan consistentemente con alguna de las hipótesis biogeográficas de colonización de *Ficus* en América de sur a norte de Pederneiras *et al.* 2018 o sentido norte a sur de Cruaud *et al.* 2012, aunque concuerdan parcialmente con esta última. El estudio concluye que no existe congruencia filogenética uno a uno entre los polinizadores y las formas de *F. aurea*, además proporciona evidencia de que los cambios de huésped y la especiación críptica son procesos importantes que influyen en la diversificación de las avispa polinizadoras de *Ficus*.

**Palabras clave:** mutualismo obligado, especies crípticas, COI, polinización, coespeciación.

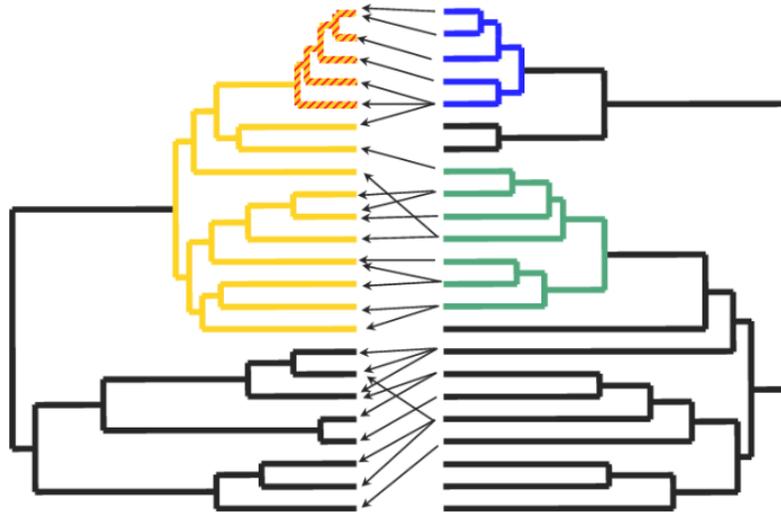
## Introducción

La idea sobre la generación de nuevas especies a partir de la adaptación a diferentes nichos ecológicos constituye el núcleo del trabajo realizado por Darwin en el siglo XIX Jousselein & Elias (2019). Se ha asumido desde entonces que las interacciones ecológicas interespecíficas juegan un papel importante en la generación de biodiversidad. En este contexto, las interacciones que ocurren entre plantas e insectos han sido propuestas como modelos idóneos para estudiar los patrones de codivergencia y diversificación, debido a la naturaleza intrincada de las interacciones (Rodríguez *et al.*, 2017). Las plantas juegan un papel importante en la historia de vida de los insectos, ya sea como fuente de alimento, hábitat o sitio de oviposición, entre otros (Slater, 2014). Estas relaciones pueden ser antagónicas en el caso de la herbivoría o el parasitismo, o mutuamente benéficas como la polinización. Además, el interés sobre el origen de las especies de insectos es fuertemente justificable, ya que son el grupo más diverso de organismos eucariotas. A este grupo corresponden dos tercios de todas las especies descritas hasta la actualidad (Stork, 2018), por lo que entender los procesos que afectan la diversificación de los insectos es crucial para dilucidar el origen de la biodiversidad.

### I. Interacciones y especiación ecológica

Existen varias teorías con las cuales se intentan explicar los patrones de diversificación en las interacciones planta-insecto. La hipótesis de especiación ecológica resultante de presiones de selección divergente ejercida por las plantas ha sido la más utilizada para explicar la radiación de insectos (Nyman *et al.*, 2010; Sasakawa & Kon, 2018). La especiación ecológica ocurre cuando el aislamiento reproductivo entre poblaciones evoluciona como resultado de una diferenciación de nicho (Rundle & Nosil, 2005).

Las relaciones antagónicas como la herbivoría, el parasitismo, la depredación y la competencia se han reconocido ampliamente como promotoras de diversificación por medio de mecanismos bien conocidos como radiación adaptativa, el modelo de escape-radiación (Fig. 1) (Erhlich & Raven, 1965), coevolución diversificadora (Thompson, 1994) o la hipótesis de evolución secuencial (Jermy, 1993).



**Fig. 1.** Ejemplo del modelo de Erhlich & Raven (1965) de coevolución por escape y radiación (tomado de Futuyma & Agrawal, 2009). Para la filogenia de las plantas (izquierda) el color negro indica el fenotipo ancestral, y el amarillo indica la evolución de una nueva defensa. La evolución de las contra adaptaciones de los insectos (derecha) se indica de manera similar.

Al respecto se ha mencionado que la evolución de nuevos caracteres asociados a la interacción está relacionada con un incremento en la tasa de diversificación (i.e. acumulación de especies por unidad de tiempo), y que las contra adaptaciones de los insectos les permiten colonizar distintos clados de plantas, pero en este caso, las contra adaptaciones no han “escalado” añadiendo nuevos fenotipos; si no que dos contra adaptaciones han evolucionado de manera independiente. Es decir, no hay necesariamente coespeciación entre linajes de plantas e insectos, por ello, las filogenias paralelas no son sinónimo de coevolución, y pueden ser simplemente consecuencia de eventos de vicarianza conjunta que resultan en especiación tanto de plantas como de insectos, Futuyma & Agrawal (2009).

Es escasa la evidencia del papel de los mutualismos en moldear y promover la diversificación, además las diferentes líneas de evidencia son contradictorias. Por ejemplo, una premisa teórica sugiere que los mutualismos de polinización deberían causar que ambos miembros de la interacción presenten coespeciación simultánea (Kiester *et al.*, 1984), pero también se ha observado que modelos que incorporan el efecto de la deriva génica y la selección estabilizadora, demuestran que las coadaptaciones que los mantienen intrincados pueden actuar en contra de estas fuerzas evolutivas (Yoder & Nuismer, 2010). En consecuencia, se ha buscado entender los mecanismos a través de los cuales los mutualismos son motores principales de la diversificación, sobre todo en sistemas de alta especificidad interespecífica (Thompson, 2005; Lengyel *et al.*, 2009).

## II. Mutualismos y especificidad interespecífica

Las relaciones mutualistas pueden ser generalistas o específicas, y en general la estrategia generalista es la que suele predominar (Faegri & Van del Pijl, 2013). En biología de la polinización, la planta generalista no depende de una sola especie de insecto para garantizar la transferencia de polen, si no que depende de un conjunto de visitantes recompensados que aseguran la reproducción sexual (Boucher & Keeler, 1982). Este conjunto puede incluir especies de diversas familias de insectos para una sola planta como es el caso de las ranunculáceas, en la que una sola especie de planta puede recibir hasta 53 especies de animales visitantes (la mayoría insectos) de hasta 29 géneros distintos (Waser *et al.*, 1996; Ollerton *et al.*, 2009). Sin embargo, las presiones de selección que ejercen los polinizadores más efectivos son las que moldean las características florales de las plantas (Stebbins, 1970; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014; Ramos & Schiestl, 2019). Esto puede significar que los polinizadores más efectivos se traten de gremios o grupos funcionales de animales que tienen comportamientos similares (Fenster *et al.*, 2004), por lo que la idea de extrema especialización (cuando hay relaciones interespecíficas) y de extrema generalización (cuando todos los visitantes son polinizadores) son concepciones que han sido malinterpretadas por falta de evidencias (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014).

Son pocos los modelos mutualistas que tienden a ser especie-específicos en la naturaleza. Uno de los modelos de mutualismo de polinización más específicos que se conocen y que implican adaptaciones morfológicas recíprocas son el que ocurre entre polillas de los géneros *Tegeticula* Zeller 1873 y *Parategeticula* Davis 1967 (Lepidoptera, Prodoxidae) y las plantas de los géneros *Yucca* L. y *Hesperoyucca* Baker (Asparagaceae). Las polillas hembras exhiben adaptaciones morfológicas y etológicas que garantizan la polinización de las yucas, las cuales a su vez tienen flores altamente modificadas que reducen la posibilidad de auto-polinización o de transferencia pasiva de polen por otros insectos (Sheppard & Oliver, 2004). Otro sistema mutualista altamente específico es el que ocurre entre avispas de la familia Agaonidae (Hymenoptera, Chalcidoidea) y las especies de plantas del género *Ficus* L. (Moraceae) comúnmente conocidas como higueras o higueros (Cook & Segar, 2010). Varios autores sugieren que quizá éste último sea el mutualismo de polinización obligado más estrecho que se conozca en términos de especificidad ecológica interespecífica. Lo anterior basado en que, mientras que alrededor de cinco especies de polillas polinizan cerca de 30 especies de *Yucca* L., en el caso de higueras y avispas se ha considerado la hipótesis (para algunos considerada un paradigma) de relación uno a uno (Corner, 1952; Ramírez, 1970; Janzen, 1979; Wiebes, 1979; Herre *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 2004). Esta relación es una simbiosis ya que es obligada para la supervivencia de ambos grupos y se ha mantenido a lo largo de periodos geológicos, pues se calcula por análisis moleculares que su origen data aproximadamente hace 75 - 90 Ma (Machado *et al.*, 2001; Cruaud *et al.*, 2012).

### III. Evaluación de la coespeciación entre *Ficus* y Agaonidae

Numerosos estudios filogenéticos en insectos y plantas (huéspedes) han tenido por objetivo probar si la especiación promovida por la adaptación a la planta es la ruta principal de la diversificación de ambos taxones, *Ficus* y agaónidos (Cook & Rasplus, 2003; Machado *et al.*, 2005; Erasmus *et al.*, 2007; Cruaud *et al.*, 2012; Pederneiras *et al.*, 2018). Estos estudios buscan evaluar la congruencia en términos de los tiempos de divergencia de las especies de ambos grupos y los patrones de cladogénesis respectivos.

La evidencia obtenida indica que la congruencia entre filogenias de plantas y polinizadores en una escala de géneros se debe a que la coevolución actúa como un motor de la diversificación. Sin embargo, en la mayoría de los casos no existe congruencia al nivel de especie (Kawakita *et al.*, 2004; Weiblen 2004). Por ejemplo, las observaciones biológicas y las reconstrucciones filogenéticas comparadas de *Ficus* y sus avispa asociadas muestran que los géneros de polinizadores se asocian consistentemente con secciones y subsecciones de *Ficus* (Cruaud *et al.*, 2012), pero a nivel de subgéneros y especies existen discordancias que sugieren que han existido diversos eventos de cambio de huésped y aislamiento reproductivo subsecuente (Fordyce, 2010). Al respecto, aún quedan preguntas importantes para lograr vincular eventos microevolutivos en escenarios macroevolutivos y viceversa.

De manera similar, la correspondencia entre características morfológicas de la planta y el polinizador también sugiere que la adaptación recíproca puede ser un importante motor de diversificación (Molbo *et al.*, 2003; Weiblen, 2004). Dos factores propuestos como claves y sugerentes de codiversificación son la especificidad en la mediación química por el reconocimiento de compuestos volátiles activos que emite el higo (Grison-Pige *et al.*, 2002) y el sistema “llave-cerradura” entre la abertura del ostiolo y las cabezas de las avispa (Kjellberg *et al.*, 2001). No obstante, algunos trabajos han demostrado que las coadaptaciones que exhiben los mutualismos pueden haber ocurrido por eventos evolutivos independientes, representando convergencias evolutivas, descartando así la coevolución *sensu stricto* (Godsoe *et al.*, 2004; Percy *et al.*, 2004).

### IV. Antecedentes sobre la hipótesis de especificidad uno a uno en *Ficus-Agaonidae*

El grado de especificidad ecológica observable morfológicamente llevó a los expertos a considerar la hipótesis de la relación interespecífica uno a uno entre las avispa Agaonidae y las plantas del género *Ficus*. Son diversos los estudios que se han centrado a lo largo del último siglo en entender la especificidad y estabilidad de la interacción, así como sus implicaciones evolutivas (Ronsted *et al.*, 2005). En este contexto existe un debate, varios estudios sustentan la existencia de patrones de codivergencia estricta entre higuera y polinizador aunque reconocen que no es una regla general (Weiblen, 2000.; Machado *et al.*, 2001; Jousselin *et al.*, 2003; Ronsted *et al.*, 2005; Cruaud *et al.*, 2012), otros indican

que esta especificidad no se conserva al menos a nivel de especie, indicando que pueden existir cambios de huésped más frecuentemente de lo que se pensaba, además del descubrimiento de especies crípticas de avispas previamente indetectables (Michaloud *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2008; Herre *et al.*, 2008). Esto hace de la interacción un sujeto de estudio cada vez más complejo. Con el fin de resumir los antecedentes, a continuación, se muestra una síntesis histórica sobre evidencia que apoya o refuta la hipótesis uno a uno:

*Evidencias de apoyo:*

- Pemberton (1921) registra varias especies de avispas Agaonidae en el Jardín Botánico de Sidney, Australia, pero sólo identifica una en el higo de *Ficus macrophylla* Desf. ex Pers.
- Timberlake (1921) encuentra 22 especies de avispas en un higo de *F. retusa* L. en Hong Kong, pero define una sola polinizadora.
- Wiebes (1965) establece que, para cada especie de *Ficus*, hay exclusivamente una especie de avispa que lo poliniza, defiende la teoría estrictamente.
- Baker & Hurd (1968) reconocen que la relación es muy específica en comparación con el caso de mutualismo obligado entre polillas y yucas.
- Ramírez (1970) reconoce excepciones a la regla, el caso de *F. aurea* fo. *tuerckheimii* en el que hay dos polinizadores (*Pegoscapus carlosi* y *P. mariae*). y el de *F. sycomorus* L. de África del Este (Wiebes, 1964). Con base en experimentos, establece que muy difícilmente ocurriría hibridación en *Ficus*.
- Cook & Rasplus (2003) argumentan que, aunque se han documentado excepciones a la especificidad uno a uno, éstas pueden representar un tercio o menos de los casos totales. Además, señalan que algunas de estas excepciones se pueden deber a errores de taxónomos.
- Cruaud *et al.* (2012): Con base en marcadores moleculares realizan una comparación filogenética entre avispas polinizadoras y huéspedes, encuentran patrones de codiversificación en una alta proporción de géneros de avispas y secciones de *Ficus*.

*Evidencias que la refutan:*

- Eisen (1901) nota que al abrir un higo emergen muchas avispas al mismo tiempo.
- Van del Pijl (1960) define que es poco probable una relación de polinización hiper-especializada, pues se pondría en peligro el futuro evolutivo de ambas especies, pero reconoce que sí puede existir monotropía a un nivel supra específico.
- Baker (1961) argumenta que la completa interdependencia entre un grupo de plantas y un polinizador particular tendría efectos restrictivos en la evolución de los mismos.
- Wiebes (1964) encuentra dos especies de avispas polinizadoras (*Ceratosolen arabicus* Mayr 1906 y *C. galili* Wiebes 1964) en *F. sycomorus*.

- Wiebes (1979) aclara la diferencia entre la especificidad ecológica y filogenética. Menciona que la base para decir que la especificidad es uno a uno radica en que siempre se obtiene la misma especie de avispa a partir del mismo huésped. Recalca que no es necesario que la especificidad ecológica refleje concordancia filogenética, por lo que es necesario precisar el nivel taxonómico en el que se mide. Es decir, ésta parece siempre cumplirse a nivel de secciones y subsecciones de *Ficus* y géneros de agaónidos, sin embargo, a nivel de especie hay excepciones notables.
- Michaloud *et al.*, (1985) encuentran dos especies de avispas polinizadoras en el complejo *F. ottonifolia* (Miq.) Miq. en África occidental.
- Kerdelhué *et al.*, (1997) encuentran dos polinizadores activos (*Ceratosolen flabellatus* Grandi 1916 y *C. silvestranus* Grandi 1916) en *Ficus sur* en Costa de Marfil, África Occidental. Detectan que hay diferencia significativa en las abundancias de cada uno y suponen que no hay competencia directa entre ellos.
- Molbo *et al.*, (2003) utilizando marcadores moleculares encuentran especies crípticas de avispas en al menos la mitad de *Ficus* estudiados.
- Haine *et al.*, (2006) analizaron genes de ADN mitocondrial en 71 individuos de avispas, que morfológicamente fueron identificados como *Pleistodontes imperialis*. Sin embargo, las distancias genéticas encontradas fueron profundas (9-17%), sugiriendo la presencia de especies crípticas. Por lo que concluyen que éstas pueden especiar utilizando un mismo huésped sin que exista divergencia paralela de la higuera.
- Su *et al.*, (2008) obtuvieron evidencia de que avispas del género *Pegoscapus* que polinizan a una sola especie de *Ficus* no se agrupan en un mismo clado o linaje, en cambio se separan en más de un linaje y se agrupan con polinizadores de otras especies de huéspedes.
- Compton *et al.*, (2009) encontraron en una misma especie de *Ficus*, y en un mismo individuo (*F. natalensis*) a tres especies de avispas polinizadoras del género *Alfonsiella* Waterston 1920, en su distribución nativa en el bosque Kibale, Uganda.
- Cruaud *et al.*, (2012) detectan diversos cambios de planta huésped.

## V. Biología y ecología del mutualismo entre higueras y sus polinizadores

El género *Ficus* L., es un género arbóreo de la familia Moraceae que destaca por su gran riqueza. Comprende alrededor de 750 especies distribuidas en las áreas tropicales alrededor del mundo (Berg & Corner 2005) pero presenta importantes dificultades taxonómicas (Berg, 1989; Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012). En América las especies de *Ficus* se encuentran desde Florida hasta el norte de Argentina en altitudes menores a 2 500 msnm donde no se registran heladas, así como en diversos tipos de comunidades vegetales (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012). De los seis subgéneros en los que se divide *Ficus*, dos se encuentran en América, *Pharmacosyceae* Miq. y *Spherosuke* Raf.

Las especies incluidas en el subgénero *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. (sección *Pharmacosycea* (Miq.) Griseb., 20 especies) son polinizadas por avispas del género *Tetrapus* Mayr 1885 de manera pasiva, es decir, no presentan una conducta de recolección de polen ni poseen sacos polínicos, sino que éste se distribuye en el cuerpo de la avispa como resultado del tránsito aleatorio por el sicono (Tarachai *et al.*, 2008). Por otra parte, las especies del subgénero *Spherosuke* Raf. (sección *Americanae* (Miq.) Corner, 120 especies), en el que se encuentra clasificado *Ficus aurea* Nutt., es polinizado por avispas del género *Pegoscapus* Cameron 1906 de manera activa. La polinización activa implica una conducta de colecta de polen en sacos polínicos (corbículas) en los cuales se almacena y transporta, utilizando los apéndices delanteros para ser depositado (Jousselin & Kjellberg, 2001).

Todas las especies de *Ficus* comparten una estructura reproductiva única llamada higo o sicono, una inflorescencia en forma de urna que está íntimamente relacionada con las avispas de la familia Agaonidae (Walker, 1848). Las especies de *Ficus* pueden ser dioicas o monoicas, lo que también tiene implicaciones en la relación con las avispas. El caso de *F. aurea* se trata de una especie monoica, lo que significa que los individuos son hermafroditas. En el interior del sicono se encuentran flores pistiladas o estaminadas (femeninas y masculinas), y el único acceso a la inflorescencia desde el exterior es a través de una abertura apical denominada ostiolo, la cual está cerrada por brácteas. Para la producción de semillas, los *Ficus* dependen exclusivamente de que las avispas ingresen al sicono y polinicen las flores. A su vez, las avispas sólo se reproducen dentro del sicono, el cual les da refugio y alimento para que se desarrolle su descendencia, ya que las hembras oviponen a los huevecillos en los ovarios de las flores pistiladas, formando agallas. Las larvas de las avispas se alimentan del tejido del endospermo.

Las flores del sicono son protóginas, hecho que evita la autofecundación. Los autores Galil & Eisenkowitch (1968) describieron las etapas de desarrollo del sicono de *F. sycomorus* L. y el acoplamiento del proceso de polinización por las avispas: Fase A (pre-femenina): la inflorescencia se desarrolla hasta alcanzar la madurez, los estigmas de las flores son receptivos. Fase B (femenina): los óvulos están desarrollados, los estigmas son receptivos, las brácteas del ostiolo se descomprimen, lo que facilita la entrada de las avispas, éstas polinizan y/u oviponen las flores pistiladas. Fase C (interfloral): las larvas y semillas se desarrollan hasta madurar o convertirse en imagos. Fase (D) masculina: las flores masculinas maduran y el polen queda expuesto en los estambres. Emergen las avispas macho, las cuales son aproximadamente el 15% de la población de avispas (Ramírez, 1970) y fecundan a las hembras que aún se encuentran en las agallas. Los machos cavan un túnel en la pared del sicono, por el que saldrán posteriormente las hembras, las cuales ya fertilizadas son liberadas por los machos; éstas colectan polen y abandonan el sicono en búsqueda de un sicono en fase B. Fase E (post-floral): El sicono madura

completamente, se torna suave y atractivo para animales frugívoros, quienes realizarán la dispersión de las semillas (ver Anexo 1).

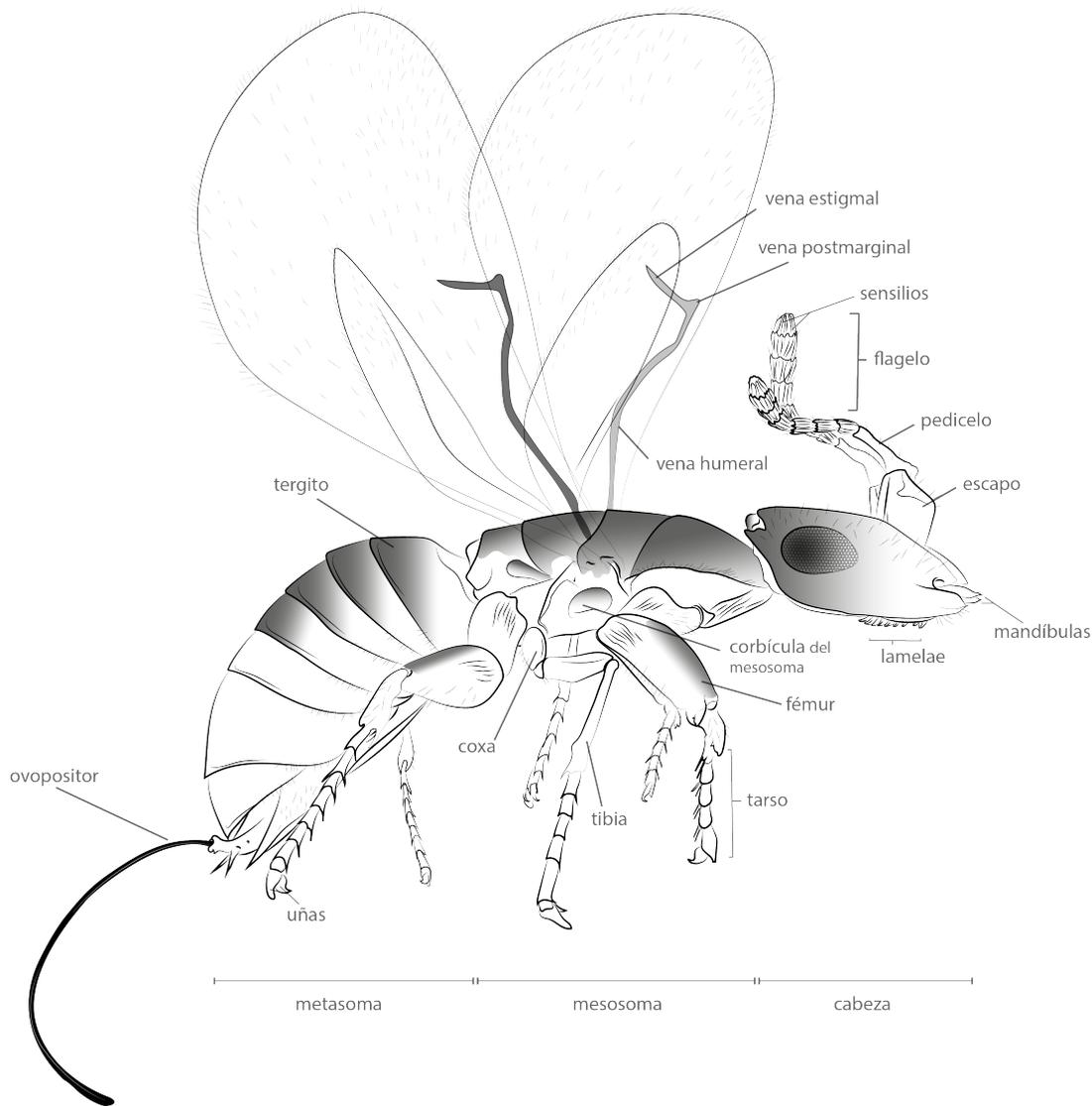
## VI. Sistemática y genética del género *Pegoscapus*

La superfamilia Chalcidoidea (Hymenoptera) es un grupo de avispas extremadamente diverso con alrededor de 23 000 especies descritas y se estima que existen alrededor de 500 000. Son avispas diminutas cuyo tamaño varía de entre 0.13 mm a 20 mm (Heraty *et al.*, 2013). La mayoría de las 19 familias tienen especies parasitoides, y algunas entre ellas Agaonidae, son fitófagas (Munro *et al.*, 2011). Al igual que ocurre con la taxonomía de *Ficus* en América, la sistemática de Agaonidae ha variado intensamente en las últimas décadas. Anteriormente se agrupaban en Agaonidae a otras cuatro subfamilias de avispas parasíticas y parasitoides con base en características morfológicas de la estructura occipital (Walker, 1848; Boucek, 1993). Sin embargo, estudios moleculares de Machado *et al.*, (1996) y Rasplus *et al.*, (1998) demostraron que Agaonidae no es un grupo monofilético, pero sí lo son todas las avispas polinizadoras, por lo que propusieron una subfamilia en Agaonidae que las incluyera (Agaoninae), la cual cuenta con 20 géneros y alrededor de 320 especies descritas.

El género *Pegoscapus* Cameron 1906 pertenece a la familia Agaonidae, específicamente a la subfamilia Agaoninae. Este género es endémico del continente americano (Wiebes, 1995). Se distribuye desde el sur de la península de Florida en Estados Unidos de América hasta el norte de Argentina, incluyendo las islas del Caribe. Se estima que divergió al menos hace 20 millones de años (Ma), aunque aún no está clara la relación sobre su posible género hermano (Machado *et al.*, 2001), lo que ha dificultado esclarecer los patrones biogeográficos del grupo.

De acuerdo con la descripción de Ramírez (1970) *Pegoscapus* se caracteriza por la presencia de corbículas en las coxas frontales, a excepción de *P. carlosi* (Ramírez 1970) y *P. mariae* (Ramírez 1970). Esta característica se refleja en el comportamiento que tienen las avispas para la recolección de polen y se diferencia del otro género de avispas polinizadoras en América, *Tetrapus*, cuyos individuos carecen de corbículas y hacen polinización pasiva. Las hembras miden de 1.2 a 1.8 mm. Tienen mandíbulas con apéndice y número variable de lamelas (Fig. 2); antenas con once segmentos; el primer flagelómero dividido en dos secciones; el segundo flagelómero es subconical y generalmente sin sensilios; los últimos siete flagelómeros tienen sensilios elongados y un número variable de setas; el último flagelómero presenta un número variable de sensilios elongados y circulares; ojo compuesto; 3 ocelos; ala anterior usualmente con vena humeral, marginal y estigmal, algunas especies con vena postmarginal corta, otras con sólo vena humeral desarrollada y algunas con venas ausentes o transparentes a la vista; ocho tergitas abdominales con espiráculos y peritremata pequeños y redondeados; ovopositor usualmente más largo que el abdomen. Se han descrito 52 especies a la fecha; sin embargo,

aún hay especies por descubrir ya que siguiendo la hipótesis de uno a uno deberían existir al menos 120 especies, una por cada especie de *Ficus* subgen. *Spherosuke*. Además, son altas las probabilidades de que existan especies crípticas dentro de las ya descritas, como ya lo han demostrado algunos autores mediante análisis genéticos (Molbo *et al.*, 2003; Haine *et al* 2006; Herre *et al.*, 2008).



**Fig. 2.** Vista lateral de una avispa hembra adulta del género *Pegoscapus* (ilustración realizada por Corona-Santiago D. K & Vázquez-Quintana P. para este trabajo).

## VII. Especiación críptica en Agaonidae

La detección de las especies crípticas, formalmente definidas como dos o más especies distintas pero clasificadas como una sola, cambió paradigmas en la ecología y modificó la manera de comprender algunos procesos en biología evolutiva (Bickford *et al.*, 2007). Los

grupos en los que se ha reconocido mayor y más profunda diversidad críptica son hongos, ranas y artrópodos (Bickford *et al.*, 2007). Dentro del último grupo destacan los himenópteros destacan por ser uno de los cuatro órdenes hiperdiversos de insectos holometábolos (Tang *et al.*, 2018).

La forma en la que se detectan especies crípticas es a partir de que se observan grandes distancias genéticas y una monofilia recíproca en organismos morfológicamente indistinguibles (al menos de manera superficial o con diferencias muy sutiles; Xiao *et al.*, 2011). En el orden Hymenoptera el ADN mitocondrial posee características excepcionales, como son un alto contenido de A+T (75%) (Wei *et al.*, 2014), reacomodo frecuente de genes (Dowton *et al.*, 2009), tasas de sustitución altas (Olivieira *et al.*, 2008), y se ve afectado al tener altas tasas de infección por *Wolbachia* (Xiao *et al.*, 2011). Sin embargo, hay marcadores moleculares tradicionalmente usados en insectos, generalmente se ha propuesto un fragmento del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI) como “código de barras” para estos análisis (Herbert *et al.*, 2003) y en insectos ha demostrado ser útil para la delimitación de especies (Coeur d’Arcier *et al.*, 2014).

Se han usado otros marcadores, por ejemplo, en su trabajo Darwell & Cook (2017) utilizaron los marcadores ITS2 (espaciador interno transcrito) y CytB (citocromo B) para evaluar la riqueza de una comunidad de avispa polinizadoras y no polinizadoras en *Ficus rubiginosa*. Ellos encontraron que la diversidad de especies incrementó con respecto a las determinadas con datos morfológicos. Esto implicó que cada género de avispa estudiado mantenía al menos una especie críptica coexistiendo en los higos de *F. rubiginosa*. En la Tabla 1 se muestran las distancias genéticas (inter e intraespecíficas) reportadas en avispa de la familia Agaonidae:

**Tabla 1.** Distancias genéticas inter e intraespecíficas reportadas en especies de avispa de la familia Agaonidae.

Especie de avispa	Especie de <i>Ficus</i>	Gen	Modelo de sustitución	Porcentaje de divergencia	
				Interclado	Intraclado
<i>Pegoscapus hoffmeyer</i> <sup>1</sup>	<i>F. obtusifolia</i>	COI	-	4.3	-
<i>Pegoscapus gemellus</i> <sup>1</sup>	<i>F. popenoei</i>	COI	-	6.6	-
<i>Pegoscapus gemellus</i> <sup>1</sup>	<i>F. bullenei</i>	COI	-	4.7	-
<i>Pegoscapus insularis</i> <sup>1</sup>	<i>F. perforata</i>	COI	-	6.1	-
<i>Tetrapus americanus</i> <sup>1</sup>	<i>F. maxima</i>	COI	-	10.8	-
<i>Pleistodontes imperialis</i> <sup>2</sup>	<i>F. rubiginosa</i>	CytB	GTR	9 -17	0 - 7
<i>Ceratosolen solmsi</i> <sup>3</sup>	<i>F. hispida</i>	COI	K	9.2	0 - 1
<i>Ceratosolen solmsi</i> <sup>3</sup>	<i>F. hispida</i>	CytB	K	15.3	0 - 2.2
<i>Sycoscapter</i> spp. <sup>4</sup>	<i>F. rubiginosa</i>	CytB	K80	6.2 - 14.3	0 - 4.1
<i>Phylotrypesis</i> spp. <sup>4</sup>	<i>F. rubiginosa</i>	CytB	K80	2.7 - 16	0 - 7.2

<i>Watshamiella</i> spp. <sup>4</sup>	<i>F. rubiginosa</i>	CytB	K80	4 - 7.7	0 - 2
<i>Eukobelea</i> spp. <sup>4</sup>	<i>F. rubiginosa</i>	CytB	K80	6.9 - 10.1	0 - 3.9
<i>Valisia</i> spp. <sup>4</sup>	<i>F. hirta</i>	COI	K80	6.4 - 27	0 - 1.4
<i>Sycoscapter</i> spp. <sup>5</sup>	<i>F. rubiginosa</i>	ITS2	K80	2.6 - 8.6	-
<i>Phylotrypesis</i> spp. <sup>5</sup>	<i>F. rubiginosa</i>	ITS2	K80	2.2 - 12.7	-
<i>Watshamiella</i> spp.	<i>F. rubiginosa</i>	ITS2	K80	0.9 - 5.7	-
<i>Eukobelea</i> spp. <sup>5</sup>	<i>F. rubiginosa</i>	ITS2	K80	21.4 - 48.9	-

Datos de: Molbo *et al.*, 2003<sup>1</sup>; Haine *et al.*, 2006<sup>2</sup>; Xiao *et al.*, 2011<sup>3</sup>; Darwell & Cook, 2017<sup>4</sup>; Xiao *et al.*, 2010<sup>5</sup>. COI: citocromo oxidasa I; CytB: citocromo B; ITS2: región espaciadora intergénica ribosomal 2; GTR: modelo general tiempo-reversible (Tavaré, 1986); K80: modelo de 2 parámetros (Kimura, 1980).

### VIII. El complejo de especies *F. aurea* y sus polinizadores

Las especies de *Ficus* en América tienden a formar complejos taxonómicos, a diferencia de lo que ocurre en el Paleotrópico, donde la sistemática alrededor de ellas es menos problemática (Berg & Villavicencio 2004). En el Viejo Mundo, la gran mayoría de las especies son dioicas, mientras que en el Neotrópico son monoicas (Berg 2007). De acuerdo con Ibarra-Manríquez *et al.*, (2012), *F. aurea* Nutt. es una de las 22 especies monoicas de *Ficus* en México, pertenece a la sección *Americanae*, subgénero *Spherosuke* Raf., comúnmente conocidas como matapalos, aunque presentan un amplio número de nombres comunes. La sección *Americanae* es polinizada por avispas del género *Pegoscapus* Cameron 1906 (Wiebes 1995).

*F. aurea* se distribuye en Florida, Las Bahamas, Islas Caicos, Antillas Mayores (Cuba, Jamaica, República Dominicana, Puerto Rico), Islas Caimán, San Andrés, México y Centroamérica hasta Panamá (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012). En México se han registrado poblaciones en ecosistemas de bosque de galería, bosque de coníferas, bosque tropical perennifolio, selva tropical subcaducifolia, dunas costeras, manglar, matorral xerófilo y en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 1 700 m.s.n.m. (*op cit.*). Es una especie fenotípicamente muy variable, particularmente varían en el tamaño de los siconos, la forma y dimensiones de las hojas, y la disposición pedunculada o sésil del sicono (Berg & Villavicencio 2004). Se han reconocido hasta 17 sinónimos para entidades colectadas en distintas localidades a lo largo de su distribución (ver Anexo 2). Berg (2007) en un intento de delimitar con mayor claridad el complejo sugirió el reconocimiento formal de sólo cuatro morfotipos (Fig. 3), los cuales carecen de un reconocimiento taxonómico formal.

1. *F. aurea* fo. *aurea*: lámina foliar oblonga a elíptica, de hasta 10cm de largo, base cuneada a redondeada; siconos de 0.6-0.8 cm de diámetro; sésiles o pedunculados
2. *F. aurea* fo. *tuerckheimii*: lámina foliar oblonga a elíptica, más de 10 cm de largo, base cuneada a redondeada; siconos de 1-1.2 cm de diámetro; higos sésiles.
3. *F. aurea* fo. *isophlebia*: lámina foliar cordiforme a ovada, base cordada a redonda; siconos de aproximadamente 1 cm de diámetro; sésiles.
4. *F. aurea* fo. *cookii*: lámina cordiforme a ovada, base cordada a redonda; siconos de aproximadamente 1 cm de diámetro; pedunculados.



**Fig. 3.** Hojas y siconos de las cuatro formas de *F. aurea*. 1-3. fo. *aurea*; 4-6 fo. *cookii*; 7-9; fo. *isophlebia*; 10-12 fo. *tuerckheimii* (fotografías de Karen B. Hernández-Esquivel 2018)

Berg (2007) reconoce que existen formas intermedias, las cuales han sido definidas tomando en cuenta los extremos de variación, por lo que este complejo continúa presentando problemas en su clasificación. Debido a la gran cantidad de sinonimias en este complejo, ha sido complicado asignar el árbol huésped de las especies de avispas descritas a partir del mismo. Además, existen dos problemas que han dificultado la sistemática de los polinizadores: i) la sistemática de *Pegoscapus* ha cambiado a lo largo del tiempo, por lo que también existen sinonimias para algunas especies, y ii) la gran mayoría de las colectas y descripciones se han hecho a nivel regional (Ramírez 1970; Wiebes 1995; Schiffler 2002) mientras que el límite norte de la distribución ha sido poco estudiado (Su *et al.*, 2008). En la Tabla 2. se enlistan las especies de avispas conocidas y colectadas de individuos del complejo *F. aurea*:

**Tabla 2.** Especies descritas de avispas polinizadoras de *F. aurea*

Espece de avispa	Sinonimias	Forma de <i>F. aurea</i>	Autor	Localidad
<i>Pegoscapus mexicanus</i>	<i>Eisenia mexicana</i>	fo. <i>aurea</i>	Nutall	Florida
<i>Pegoscapus urbanae</i>	-	fo. <i>isophlebia</i>	Pittier	Panamá
<i>Pegoscapus jimenezi</i>	-	fo. <i>aurea</i> fo. <i>jimenezii</i>	Tonduz & O. Jiménez	Costa Rica
<i>Pegoscapus carlosi</i>	-	fo. <i>tuerckheimii</i>	Pittier	Costa Rica
<i>Pegoscapus mariae</i>	-	fo. <i>tuerckheimii</i>	Pittier	Costa Rica

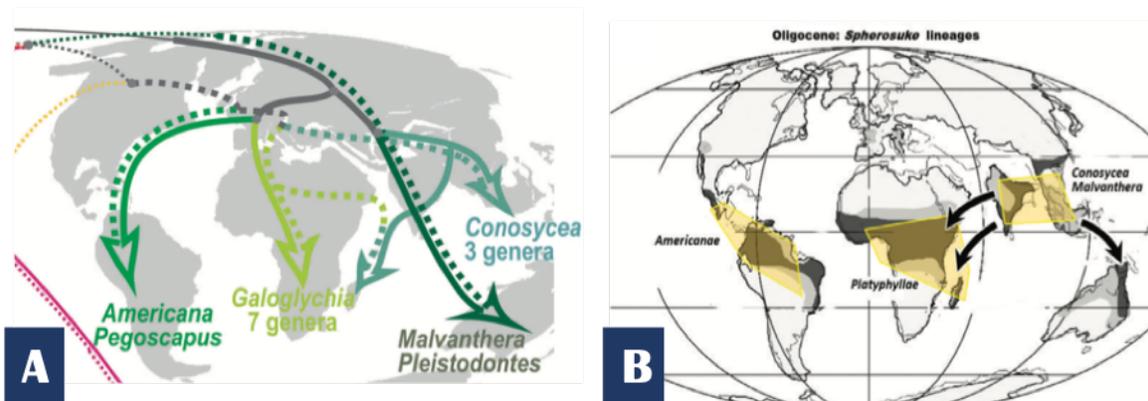
Actualmente existe un gran interés en esclarecer la sistemática de este complejo y se están realizando estudios para probar la hipótesis de que los morfotipos son realmente especies distintas (Hernández-Esquivel *et al.*, en revisión). Dado que la filogenia de algunos grupos *Ficus* no se ha logrado resolver con altos valores de soporte, se ha propuesto estudiar los complejos desde un enfoque integrativo, que tome en consideración datos morfológicos, análisis biogeográficos, ecológicos y genéticos (Dayrat, 2005). En este sentido, la utilización de métodos filogenéticos comparativos entre el huésped y sus polinizadores podrían ayudar a esclarecer la sistemática de *F. aurea* y a la vez, probar la hipótesis uno a uno de acuerdo con los morfotipos propuestos por Berg (2007) los cuales posiblemente representan especies de acuerdo con Hernández-Esquivel *et al.*, en revisión.

## IX. Hipótesis biogeográficas de la distribución de *F. aurea* y sus polinizadores

El origen de la familia Moraceae se ha estimado que ocurrió durante el Cretácico tardío hace 78.9-70.4 Ma (Magallón *et al.*, 2015). Aunque la mayoría de los autores llegan a un consenso de que el origen de *Ficus* está en Eurasia, las rutas de dispersión y la diversificación de las secciones están bajo continuo debate (Machado *et al.*, 2018). Se han

propuesto dos escenarios biogeográficos principales para el género *Ficus*, sección *Americanae* (polinizada por *Pegoscapus*) utilizando alrededor de 24 especies y basados en diversos marcadores.

Cruaud *et al.* (2012) consideran que el origen de la sección se originó a partir de una población ancestral en Eurasia que ya estaba presente hace alrededor de 75 Ma, y que se dispersó por Norte América gradualmente a través de puentes terrestres (Tiffney, 1985) de bosques perennes y cinturones de bosques tropicales; se propone que sus integrantes alcanzaron Sudamérica posteriormente por eventos de dispersión escalonados a través de las islas del Caribe y las Antillas, llegando a establecerse en el actual Brasil hace 30-32 Ma (Fig.4 A). Por otra parte, el estudio de Pederneiras *et al.*, (2018) propone que la sección *Americanae* llegó a Sudamérica por la vía de África y el Océano Atlántico, ya que durante el Eoceno (56 a 34 Ma) la distancia entre estos continentes era menor que la actual y existían una serie de islas que actuaron como escalones para la dispersión (Theide, 1977; Parrish, 1993), misma que fue coadyuvada por animales. Al incrementar la distancia entre los continentes, suponen que este fue el evento de vicarianza que resultó en la separación de los linajes *Americanae* (en América) y *Platyphyllae* en África (Fig.4 B). Posteriormente *Americanae* se fue dispersando y diversificando hacia el norte llegando a su límite de distribución actual (México y Florida en los Estados Unidos de América).



**Fig. 4.** Mapas sobre la distribución ancestral hipotética de las secciones de *Ficus* y dispersión subsecuente (tomados de Cruaud *et al.*, 2012 y Pederneiras *et al.*, 2018). **A.** Hipótesis de norte a sur (Cruaud *et al.*, 2012); las líneas sólidas indican la distribución y dispersión de las higueras, y las líneas punteadas las rutas de dispersión de las avispas. **B.** Hipótesis de sur a norte (Pederneiras *et al.*, 2018); las áreas de color gris oscuro representan antiguos bosques tropicales megatérmicos y las de color gris claro representan bosques de clima monzónico.

## X. Propiedades del marcador molecular COI

La enzima citocromo c oxidasa es una proteína ampliamente estudiada que funciona dentro del proceso de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Pentinsaari *et al.*, 2016). El gen COI codifica para la subunidad I de dicha proteína, se ubica en el genoma mitocondrial, y mide alrededor de 1 500 pares de bases (Castresana *et al* 1994; Patwardhan, 2014). El gen COI ha sido un marcador usado ampliamente en estudios filogenéticos debido a sus propiedades. Al ubicarse en el genoma mitocondrial carece de intrones, tiene exposición limitada a la recombinación, y la vía de herencia es matrilineal (Awise, 2000; Saccone *et al.*, 1999; Patwardhan, 2014). Los cebadores o *primers* universales para este gen son muy robustos, pues existe un alto grado de conservación de la secuencia del extremo 3' en la mayoría de taxones dentro de los phyla de animales (Folmer *et al.*, 1994; Zhang & Hewitt 1997). COI se ha propuesto como un “código de barras” para la identificación de insectos en general (Helbert *et al.*, 2003) y se mantiene actualmente como el código de barras estándar para animales (Ratnasingham & Herbert, 2007; Andújar *et al.*, 2018; Powers *et al.*, 2018; Suriya *et al.*, 2018). Herbert et al. 2003 propusieron que para el orden Hymenoptera la distancia  $p$  no corregida promedio entre especies es de 3.2%

Aunque algunos autores han mencionado algunas desventajas y limitaciones (Lesse & Held, 2011) de este marcador, en insectos presenta una óptima señal filogenética que se ha aplicado para resolver problemas filogenéticos a diversos niveles taxonómicos supra-específicos (Yoshizawa & Johnson, 2010; Yeates *et al.*, 2016). La tasa de evolución del gen es lo suficientemente rápida para permitir la discriminación entre especies, y en algunos casos también entre poblaciones (Cox & Herbert 2001; Wares & Cunningham, 2001). Por lo anterior y debido a la cada vez mayor accesibilidad y rapidez de las técnicas moleculares, es un marcador adecuado para estudios filogenéticos en agaónidos (Weiblen, 2001; Erasmus *et al.*, 2006).

## Justificación

Las interacciones entre *Ficus* y sus avispas polinizadoras asociadas ofrecen uno de los sistemas naturales más interesantes para estudiar el amplio espectro de preguntas sobre coevolución y codivergencia. Las preguntas sobre este mutualismo pueden dirigirse desde la perspectiva adaptativa, ecológica, filogeográfica o filogenética. Para que se puedan evaluar las congruencias históricas entre ambas partes de la interacción es necesario reconstruir las relaciones filogenéticas de ambos grupos. El presente trabajo propone aportar información para entender los patrones de variación genética interespecífica, y así inferir los procesos macroevolutivos en la historia natural de *Pegoscapus* spp. asociadas a *F. aurea*.

Aunque investigaciones similares ya se han realizado en otras regiones del planeta, en México resulta novedosa en lo relativo a las avispas polinizadoras del complejo *F. aurea*. Esta es la primera vez que se estudian las especies de polinizadores de un complejo de *Ficus* a lo largo de su distribución en el continente americano. La sistemática de *F. aurea* y *Pegoscapus* ha sido controversial, por lo que la reconstrucción de las relaciones filogenéticas de los polinizadores de cada forma del complejo *F. aurea* puede ayudar al esclarecimiento de la situación taxonómica de ambos interactuantes.

Por otra parte, los servicios ecosistémicos que proveen las higueras son numerosos. Son especies clave para el mantenimiento de comunidades de frugívoros dan refugio a varias especies de animales y fungen como reguladores del microclima (Mackay *et al.*, 2018). Las higueras dependen obligadamente de las diminutas avispas para su reproducción y permanencia en el ecosistema. Tanto avispas como higueras son sistemas biológicos que se han mantenido fuera del foco de la conservación y protección. Como es sabido, a lo largo del planeta existe una disminución drástica de especies de insectos y pequeños invertebrados (Soger *et al.*, 2012; Leather 2017; Basset & Lamarre 2019), de tal forma que la entomofauna está desapareciendo incluso antes de que la ciencia sea capaz de describirla y comprenderla (Sánchez-Bayo & Wyckhuys 2019). Por lo tanto, este estudio da un primer paso en el reconocimiento de los himenópteros polinizadores de *F. aurea* y pretende elucidar las relaciones filogenéticas entre estos, integrando el conocimiento básico de la diversidad con los procesos evolutivos y biogeográficos que han moldeado el mutualismo más estrecho de polinización hasta ahora conocido.

## Preguntas de investigación

- I. ¿Cuáles son las relaciones filogenéticas entre los polinizadores del complejo *F. aurea*?
- II. ¿Existe algún grado de especificidad ecológica interespecífica de las formas de *F. aurea* con sus avispas polinizadoras?
- III. ¿Cuáles serían los posibles patrones de divergencia de las avispas polinizadoras, y qué procesos podrían estar influyendo en la diversificación de las mismas?
- IV. ¿Los resultados son congruentes con alguna de las hipótesis biogeográficas propuestas para la actual distribución del mutualismo (*Ficus sec. Americanae-Pegoscapus*) en América (Cruaud *et al.*, 2012 y Pederneiras *et al.*, 2018)?

## Hipótesis

- I. Si se considera que cada morfotipo de *F. aurea* (*sensu* Berg 2007) es de facto una entidad biológica independiente (una especie distinta *sensu* Hernández-Esquivel *et al.*, en revisión), y que no hay cambios de huésped u otros procesos de divergencia se espera observar en la filogenia: Grupos monofiléticos de polinizadores del género *Pegoscapus* asociados respectivamente con cada entidad taxonómica de *F. aurea* (fo. *tuerchkeimii*, fo. *aurea*, fo. *isophlebia*, fo. *cookii*); o en su defecto, especies con mayor cercanía entre ellas de manera congruente con el morfotipo de *F. aurea* que polinizan.
- II. Tomando en cuenta que no se ha reconocido la especificidad uno a uno en *F. aurea* y *Pegoscapus* ya que se han reportado al menos 5 polinizadores sólo en 3 localidades, se espera que la riqueza de especies que polinizan el complejo sea igual o mayor a 5 especies, debido a la alta probabilidad de especiación críptica. Además, es factible que distintos eventos de diversificación (no sólo la coespeciación con el huésped) estén asociados a la diversidad de los polinizadores de *F. aurea*.
- III. Es posible que se identifique especiación críptica, cambios de huésped, o especiación simpátrica en las avispas del género *Pegoscapus* estudiadas, debido a que existe evidencia de que estos procesos han sucedido en otras especies de agaónidos.
- IV. Dado que la distribución de *F. aurea* y sus polinizadores es amplia abarcando Norteamérica, Centroamérica y el Caribe, se encontrará evidencia que apoye a alguna de las dos hipótesis biogeográficas de colonización de *Ficus secc. Americanae* y sus polinizadores (*Pegoscapus*) en América.

## Objetivos

### I. Objetivo general

Inferir las relaciones filogenéticas y los eventos de diversificación de las avispas del género *Pegoscapus* (Agaonidae) asociadas al complejo *F. aurea* (Moraceae).

### II. Objetivos particulares

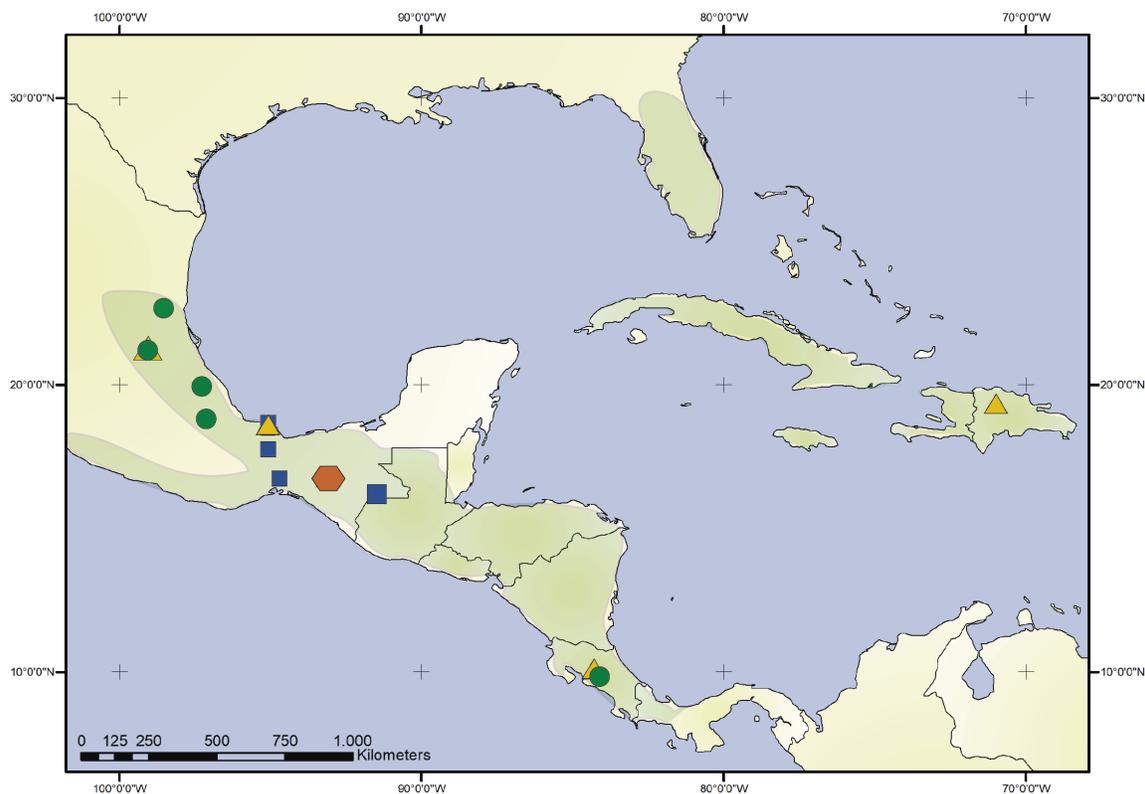
- Generar una hipótesis filogenética de las especies de *Pegoscapus* asociadas a *F. aurea* con base en el marcador COI.
- Probar la hipótesis de especificidad uno a uno, considerando como especies las cuatro formas de *F. aurea* propuestas por Berg (2007) y reevaluadas por Hernández-Esquivel *et al.* (en revisión).
- Analizar la variación genética mediante métodos de delimitación de especies entre las avispas polinizadoras de *F. aurea*
- Identificar algunas diferencias morfológicas entre las avispas polinizadoras del complejo *F. aurea* para detectar o descartar posible especiación críptica.
- Calcular la antigüedad de la divergencia entre los linajes de *Pegoscapus* haciendo un análisis de filogenia datada calibrando con evidencia fósil.
- Elucidar procesos de extinción, vicarianza y dispersión e integrar la información genética, geológica y paleoclimática para proponer una hipótesis biogeográfica sobre los procesos de diversificación de los polinizadores de *F. aurea* y sus posibles causas.

## Metodología

### I. Colecta en campo y puntos de muestreo

Entre los meses de mayo y octubre del 2017 se visitaron poblaciones del complejo *F. aurea* en doce localidades en México, una en Costa Rica y una en República Dominicana (Fig. 5). Las avispas deben ser obtenidas en la fase adulta, cuando emergen de las agallas de los higos. Esto sucede en un periodo muy corto (24 - 48 h de duración) cuando el higo se encuentra en la fase D de maduración. En cada localidad el número de individuos de avispas obtenidas de *F. aurea* fue variable debido a diversos factores. Uno de ellos, es que al ser los *Ficus* árboles de baja densidad poblacional en la comunidad (Rasplus *et al.*, 2016), pueden estar separados entre sí por varios kilómetros, por lo que en un mismo día se pueden visitar pocos árboles. Otro factor es que los árboles producen higos asincrónicamente a lo largo del año, y en consecuencia es baja la proporción de higos maduros específicamente en la Fase D de desarrollo encontrados por árbol. Éstos pueden ser de cero a 10 aproximadamente en la zona baja de la copa que se puede alcanzar utilizando una garrocha de poda. La duración de la fase D es de aproximadamente siete días para algunas especies de la sección *Americanae* (Piedra-Malagón *et al.*, 2019) y en cualquier momento de ésta las avispas pueden emerger de las agallas. Es decir, es común encontrar higos en la fase D de los cuales ya emergieron las avispas.

Una vez colectados los higos en la Fase D de desarrollo, se llevaron al laboratorio y en un periodo no mayor a 24 horas posterior a la colecta se realizó un corte sagital del sicono. El corte permite la oxigenación dentro del higo y estimula la eclosión de las avispas desde las agallas (Rasplus *et al.*, sin publicar). Este proceso fue monitoreado a través de un microscopio estereoscópico (ver Anexo 3). Las avispas hembra que lograron emerger fueron capturadas con ayuda de un pincel húmedo y fijadas en etanol al 70% para evitar el colapso de los tejidos. Al transcurso de 24 horas fueron trasladadas a etanol al 100%. Algunas avispas se seleccionaron para la toma de imágenes con microscopía electrónica y estereoscópica. El resto se almacenó en refrigeración a -20 °C hasta el procedimiento de extracción de ADN.



**Fig 5.** Distribución de *F. aurea* y puntos de muestreo. En un tono sombreado se muestra la distribución aproximada del complejo. Las figuras en el mapa indican las zonas de las cuales se obtuvieron muestras para los análisis filogenéticos y el morfotipo correspondiente: ● fo. *tuerckheimii*; ▲ fo. *aurea*; ■ fo. *isophlebia*; ◆ fo. *cookii*.

## II. Identificación morfológica por microscopía y uso de claves taxonómicas

Se observaron características a nivel de microscopio estereoscópico para tratar de determinar a las especies utilizando las claves de avispas neotropicales de Ramírez (1970) y Wiebes (1995). Se capturaron imágenes de algunas de estas avispas (una por localidad y por morfotipo de *F. aurea*) al microscopio estereoscópico y en electrónico de barrido de los siguientes ejemplares:

- *Pegoscapus* sp. 3 y *P.* sp. 6 (extraídas de *F. aurea* fo. *tuerckheimii* de Neblinas, México), *P. carlosi* y *P. mariae* (extraídas de fo. *tuerckheimii* de Costa Rica) con la finalidad de comparar los sensilios en los tres últimos flagelómeros de las antenas, el ancho del ojo y la presencia o ausencia de sacos polínicos.
- *Pegoscapus* sp. 2 (extraída de *F. aurea* fo. *isophlebia* de Veracruz, México), con el objetivo de identificar si corresponde a la especie *P. urbanae*, el polinizador descrito para *F. aurea* fo. *isophlebia* en Panamá.

- *Pegoscapus jimenezi* (extraída de fo. *aurea* de Costa Rica) para verificar su identidad.

Para las imágenes de microscopía electrónica de barrido el equipo utilizado fue un microscopio GEOL JSM-IT300 ubicado en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM, Unidad Morelia. Se trabajó en la modalidad de bajo vacío a una presión de 70 pascales. Se analizaron imágenes adquiridas con electrones retrodispersados (BED). Las muestras se congelaron a -20°C para evitar la deformación de las estructuras.

### III. Extracción de ADN

Se utilizó el kit de extracción Invitrogen PureLink Genomic DNA (ThermoFisher Scientific). Como base se siguió el protocolo de fábrica sugerido, sin embargo, fue necesario realizar diversas modificaciones. El protocolo final se menciona con detalle en el Anexo 4. Para seleccionar a las avispa que serían sometidas al procedimiento de extracción, se revisaron las muestras en el microscopio estereoscópico con el fin de verificar el buen estado de los ejemplares. Se extrajo el ADN de cada ejemplar por separado.

La concentración y pureza del ADN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop™. Las muestras en las que se obtuvo una concentración mayor a 2.0 ng/μL y valores de pureza confiables se seleccionaron para ser sometidas a la amplificación de un fragmento del gen COI usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### IV. Amplificación de ADN por PCR

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 800 pb del gen COI de cada individuo. Para la PCR se utilizaron los *primers* específicos diseñados por Su *et al.*, (2008):

COI-1-Ple F: 5' TTA ATT GGA AAT GAT CAA ATT TAT AAT 3'  
COI-2M R: 5' ACA TAA TGA AAA TGT GCT ACT ACA TAA TAN 3'.

Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguida por 37 ciclos de desnaturalización a 94 °C (40 s), alineación a 52 °C (uno a uno 0 min), elongación a 72 °C (1:25 min) y elongación final a 72 °C por 8 min. Se determinaron las proporciones de la mezcla de la siguiente manera para obtener 22 μL de producto final:

*Taq* polimerasa Platinum PCR Supermix, 11 μL; primer F COI -1- Ple: 1.1 μL; primer R COI -2M: 1.1 μL; Agua Mili-Q, 3.5 μL; BSA como adyuvante, 2.8 μL; ADN de la muestra, 2.8 μL.

Se validó la amplificación por medio de electroforesis en geles de agarosa 1.5% con SYBR safe™. De cada producto obtenido se cargó en el gel 1 µL con 1.5 µL de azul de bromofenol. Una vez terminada la electroforesis, se iluminó el gel con una lámpara UV para verificar la calidad del amplicón. De esta manera, al observar la intensidad y uniformidad de las bandas se seleccionaron los productos candidatos a secuenciación. Se enviaron a purificar y secuenciar los productos de PCR seleccionados (Tabla 3) siguiendo la guía de preparación de muestras de los laboratorios de MacroGen© Rockville, Maryland, EUA.

**Tabla 3.** Datos de los individuos de *Pegoscapus* de los que se realizó extracción y secuenciación. Se presentan las coordenadas geográficas, nombres de las localidades y el morfotipo de *F. aurea* del que fueron obtenidos.

No. individuos <i>Pegoscapus</i>	Forma de <i>F. aurea</i>	Árbol	Localidad	Estado	Coordenadas	
					Latitud	Longitud
1	fo. <i>aurea</i>	R2	Neblinas	Querétaro	16.80017	-93.08631
2	fo. <i>aurea</i>	R4	Neblinas	Querétaro	21.299166	-99.0675
1	fo. <i>aurea</i>	R6	Neblinas	Querétaro	21-266388	-99.07638
2	fo. <i>aurea</i>	R7	Neblinas	Querétaro	21.280556	-99.07111
2	fo. <i>aurea</i>	R9	Neblinas	Querétaro	21.266111	-99.07305
5	fo. <i>aurea</i>	RD1	San José de las Matas	República Dominicana	19.351248	-70.983113
1	fo. <i>aurea</i>	TUX5R	Los Tuxtlas	Veracruz	18.44738	-95.08270
2	fo. <i>aurea</i>	TUX9R	Los Tuxtlas	Veracruz	18.53267	-95.06250
3	fo. <i>aurea</i>	TUX17SE	Los Tuxtlas	Veracruz	18.591745	-95.08546
2	fo. <i>aurea</i>	CR3J	Alajuela	Costa Rica	10.09120	-84.29755
4	fo. <i>tuerckheimii</i>	N1	Neblinas	Querétaro	21.243055	-99.10749
1	fo. <i>tuerckheimii</i>	N4	Neblinas	Querétaro	21.28112	-99.09166
1	fo. <i>tuerckheimii</i>	N5	Neblinas	Querétaro	21.270013	-99.05666
1	fo. <i>tuerckheimii</i>	N6	Neblinas	Querétaro	21.270267	-99.06267
2	fo. <i>tuerckheimii</i>	N8	Neblinas	Querétaro	21.248889	-99.07250
1	fo. <i>tuerckheimii</i>	N9	Neblinas	Querétaro	21.25556	-99.0745
3	fo. <i>tuerckheimii</i>	ORI1	Orizaba	Veracruz	18.83034	-97.1467
3	fo. <i>tuerckheimii</i>	ORI2	Orizaba	Veracruz	18.83166	-97.14694
1	fo. <i>tuerckheimii</i>	ORI5	Orizaba	Veracruz	18.8328	-97.1345
1	fo. <i>tuerckheimii</i>	HUE1	Hueytamalco	Veracruz	19.943851	-97.28709
1	fo. <i>tuerckheimii</i>	XAL1	Xalapa	Veracruz	19.45965	-96.93904
1	fo. <i>tuerckheimii</i>	CIE1	El Cielo	Veracruz	23.05195	-99.18444
2	fo. <i>tuerckheimii</i>	CR2T	San José	Costa Rica	9.85756	-84.17854

3	fo. <i>tuerckheimii</i>	CR6T	San José	Costa Rica	9.856139	-84.17272
4	fo. <i>isophlebia</i>	ACA3	Acayucan	Veracruz	17.7351	-95.0778
1	fo. <i>isophlebia</i>	ACA9	Acayucan	Veracruz	17.62619	-95.0829
3	fo. <i>isophlebia</i>	NIZ1	Nizanda	Oaxaca	16.670277	-95.01361
1	fo. <i>isophlebia</i>	MG1	Las Margaritas	Chiapas	16.311367	-92.006789
2	fo. <i>isophlebia</i>	TUX1BS	Los Tuxtlas	Veracruz	18.59083	-95.0724
1	fo. <i>isophlebia</i>	TUXPBS	Los Tuxtlas	Veracruz	18.59083	-95.0676
1	fo. <i>isophlebia</i>	TUX7	Los Tuxtlas	Veracruz	18.555362	-95.06098
1	fo. <i>isophlebia</i>	TUX13S	Los Tuxtlas	Veracruz	18.459825	-95.08127
2	fo. <i>isophlebia</i>	TUXB4	Los Tuxtlas	Veracruz	18.583511	-95.07476
1	fo. <i>cookii</i>	CSU1	Cañón del Sumidero	Chiapas	16.80017	-93.08631

---

**Total: 62**

---

## V. Edición y alineamiento de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias, se analizaron con la herramienta en línea BLAST (Altschul *et al.*, 1990) provista por NCBI (National Center for Biotechnology Information). Aquellas que no mostraron afinidad por la familia Agaonidae fueron descartadas. Se analizó la calidad de los cromatogramas en el programa Sequencher 5.4.6 (Gene Codes Corporation, 2017) y FinchTV 1.5.0 (Patterson *et al.*, 2004). Se descartaron las secuencias que incluyeran gran cantidad de sitios ambiguos (N) o en las que se observaran dobles picos de lectura en el medio de la secuencia. El alineamiento se llevó a cabo en los programas PhyDE v.09971 (Müller *et al.*, 2005) y MEGA (Tamura *et al.*, 2007), utilizando el algoritmo Muscle (Edgar, 2004) y se afinó manualmente dada una función objetiva. Los datos inciertos se verificaron visualmente en los cromatogramas. Una vez definida la matriz de secuencias, se verificó la presencia de posiciones ambiguas utilizando en el programa GBlocks (Castresana, 2002) en línea y se verificó que no existiera saturación de bases utilizando el programa DAMBE (Xia 2018).

## VI. Estimación de la diversidad genética y distancias genéticas

Se calcularon diversos parámetros para la estimación de la diversidad genética: la diversidad haplotídica (Hd), nucleotídica (Pi), número de sitios segregantes (S) y número de sitios conservados se estimaron en el programa DnaSP v.6 (Rozas *et al.*, 2019). Se calcularon las distancias genéticas bajo el modelo Kimura de 2 parámetros (K80; Kimura 1980) entre y dentro de los clados resultantes de la filogenia bayesiana, mediante el programa MEGA v.7 (Kumar *et al.*, 2015). Se elaboraron tablas de estas distancias interclado e intraclado.

Para evaluar las distancias genéticas entre otros géneros dentro de la familia Agaonidae, se compararon a las especies *Eupristina verticillata* y *Blastophaga nipponica* (Tabla 4). La avispa *E. verticillata* poliniza a *Ficus microcarpa*, una especie arbórea originaria de Asia (Sri Lanka, India, sur de China, Islas Ryukyu, Australia y Nueva Caledonia). A su vez, *B. nipponica* se encuentra en Asia (Japón, Korea, Taiwan y sur de China) y poliniza a *F. erecta* (complejo de especies de hasta 17 epítetos), se ubica dentro de la subsección *Frutescentiae*. Finalmente, para comparar las divergencias genéticas entre especies del mismo género, se compararon las secuencias con el individuo *Pegoscapus obscurus* (Tabla 4), misma que poliniza a *F. longifolia* nativo de Brasil y perteneciente al subgénero *Spherosuke*.

## VII. Reconstrucción de inferencia filogenética Bayesiana

Para los análisis filogenéticos se añadieron diversas secuencias de COI obtenidas de GenBank, con distintos fines: Como grupos externos para la filogenia bayesiana se añadieron dos secuencias de especies del género *Tetrapus*, avispas que polinizan a *Ficus* de la sección *Pharmacosyceae* en América (Ramírez-Benavides, 2016) y dos secuencias de géneros hermanos de *Pegoscapus* (*Eupristina* y *Blatophaga*) (Tabla 4). También se añadieron dos secuencias de especies bien identificadas de *Pegoscapus*, *P. obscurus* y *P. jimenezi* como referencia para la divergencia interespecífica y para conocer las relaciones entre estas con respecto a las obtenidas en laboratorio. El modelo de sustitución nucleotídica de mejor ajuste se determinó por medio del programa jModelTest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) con el Criterio de Información de Akaike (AIC). El modelo evolutivo utilizado fue el *General Time Reversible* (GTR) (Tavaré, 1986) tomando en cuenta la heterogeneidad de las secuencias (+G) y la proporción de sitios invariables (+I). El análisis de inferencia bayesiana se realizó en el programa MrBayes v.3.2.6 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), para el cual se implementaron dos corridas independientes de 13 millones de generaciones con cuatro Cadenas de Markov Monte Carlo, muestreando cada 1000 generaciones. Los valores de ESS (Tamaño efectivo de muestra) fueron mayores a 200 y fueron visualizados con la herramienta Tracer v.1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018). Posteriormente se excluyeron 13 000 árboles correspondientes al 10% de *burnin* utilizando MrBayes. Para visualizar el filograma resultante se utilizó el programa FigTree v.1.4.3 (Rambaut, 2016), en donde se analizaron los valores de probabilidad posterior.

**Tabla 4.** Secuencias de COI obtenidas de GenBank para las reconstrucciones filogenéticas.

Espece	No. de acceso	Autor	Localidad
<i>Tetrapus costaricanus</i>	JN103266	Cruaud <i>et al.</i> , 2012	Guyana Francesa
<i>Tetrapus americanus</i>	AB308327	Su <i>et al.</i> , 2008	Los Tuxtlas
<i>Eupristina verticillata</i>	AB488713	Azuma <i>et al.</i> , 2016	Yonaguni, Japón

<i>Blastophaga nipponica</i>	LC176392	Wachi <i>et al.</i> , 2016	Nagasaki, Japón
<i>Pegoscapus jimenezi</i>	GQ367944	Cruaud <i>et al.</i> , 2010	Costa Rica
<i>Pegoscapus obscurus</i>	JN103286	Cruaud <i>et al.</i> , 2012	Brasil

---

### VIII. Estimación de tiempos de divergencia por reloj molecular relajado

Para la datación de los tiempos de divergencia entre los clados de la filogenia se utilizó el programa BEAST v.2.5 (Drummond & Rambaut, 2007). Para la calibración del reloj molecular se utilizaron dos fósiles. En el primer punto de calibración se utilizó un fósil de la especie extinta *Tetrapus mayri*, proveniente del depósito de Florissant, Colorado, EUA, cuya edad estimada es de 34.5 Ma (Machado *et al.*, 2001), considerando ésta la edad mínima del ancestro más reciente para el grupo externo utilizado, *Tetrapus costaricanus* y *T. americanus*. El segundo punto de calibración fue establecido para el nodo principal de *Pegoscapus* utilizando el único fósil de la especie extinta *Pegoscapus peritus* encontrado en depósitos de ámbar en República Dominicana, cuya edad estimada es de entre 15 y 20 Ma (Iturralde-Vinent & MacPhee, 1996; Peñalver *et al.*, 2006). Para el análisis se estableció la media de 17.5 Ma, en este último caso. Se implementó el mismo modelo de sustitución nucleotídica utilizado para la reconstrucción filogenética (GTR+I+G). El árbol se construyó utilizando el modelo de especiación de Yule y un reloj log-normal relajado. Se implementaron 100 millones de generaciones, realizando un muestreo cada 1000 árboles. El análisis fue evaluado a través de los valores de ESS y de la convergencia de las cadenas para descartar el 10% de las generaciones muestreadas a través de la herramienta TreeAnnotator de BEAST, para finalmente construir el árbol a través del algoritmo *maximum clade credibility*.

### IX. Reconstrucción de áreas ancestrales

La estimación de las áreas ancestrales se realizó través de los algoritmos Statistical Dispersal-Vicariance Analysis (S-DIVA) (Yu *et al.*, 2010; Nylander *et al.*, 2008) y Statistical Dispersal-Extinction-Cladogenesis (S-DEC) (Ree & Smith, 2008), modelos incluidos dentro del software RASP (*Reconstruct Ancestral States in Phylogenies*) v4.2 (Yu *et al.*, 2015). En ambos casos se utilizaron 100 000 árboles ultramétricos obtenidos a través de la estimación de los tiempos de divergencias con BEAST, y se descartaron el 10% de ellos. Se consideraron nueve áreas, determinadas con base en las provincias y subprovincias morfotectónicas de México (Ferrusquia-Villafranca 1990) (Tabla 5). Estas áreas corresponden a la distribución de las formas de *F. aurea* de donde se muestrearon las distintas especies de *Pegoscapus* analizadas en el presente estudio.

**Tabla 5.** Asignación de localidades de muestreo de las especies de *Pegoscopus* a provincias morfotectónicas.

Área	Provincia/subprovincia morfotectónica	Localidad de muestreo	Especie(s) de <i>Pegoscopus</i>
A	Campechano-Petenense/ Tuxtleña	Los Tuxtlas, Ver	<i>P. sp. 2</i> , <i>P. sp. 7</i>
B	Campechano-Petenense/ Planiciense	Acayucan, Ver.	<i>P. sp. 2</i>
C	Neovolcanense/ Meridional	Hueytamalco, Pue.	<i>P. sp. 3</i>
D	Oaxaquense/ Valle Nacionaliana	Orizaba, Ver.	<i>P. sp. 3</i>
E	Sierra Madre Orientalense	Neblinas, Qro.	<i>P. sp. 3</i> , <i>P. sp. 5</i> , <i>P. sp. 6</i>
F	Chiapanense/ Comitaniense	Las Margaritas, Chis.	<i>P. sp. 1</i>
G	Cordillera de Talamanca/ Montes del Aguacate	Costa Rica	<i>P. mariae</i> , <i>P. carlosi</i> , <i>P. jimenezi</i>
H	Cordillera Central	República Dominicana	<i>P. sp. 4</i>

Se aplicó un modelo no constreñido que permite cualquier combinación de áreas geográficas en una matriz de adyacencia con un máximo de ocho áreas adyacentes en ambos análisis. Además de la estimación de eventos de dispersión y vicarianza, se incluyó la estimación de eventos de extinción en el modelo biogeográfico, y las tasas de dispersión fueron configuradas con la misma probabilidad para cada área habitada por las distintas especies de *Pegoscopus*. Se excluyó del análisis a la secuencia de COI de la especie *Pegoscopus obscurus*, originaria de Brasil.

#### **X. Análisis de delimitación de especies por el modelo *multi-rate Poisson Tree Processes* (mPTP)**

Se utilizó el método de delimitación de máxima verosimilitud a través del programa mPTP v.0.2.4 (Kaplí et al. 2016) para calcular un modelo de especiación dentro del grupo de *Pegoscopus* estudiado. El programa mPTP está diseñado principalmente para analizar loci reconocidos como código de barras. A través de mPTP, se permite incorporar diferentes niveles de diversidad genética intra e interespecífica derivada de diferencias en la historia evolutiva, variación en la tasa mutacional o en el muestreo, es decir, no es necesario la similitud entre los umbrales de distancias genéticas. La precisión de mPTP se correlaciona fuertemente con la proporción de especies monofiléticas en la filogenia subyacente. Las especies polifiléticas se delimitarán en grupos más pequeños o se delimitarán con otras

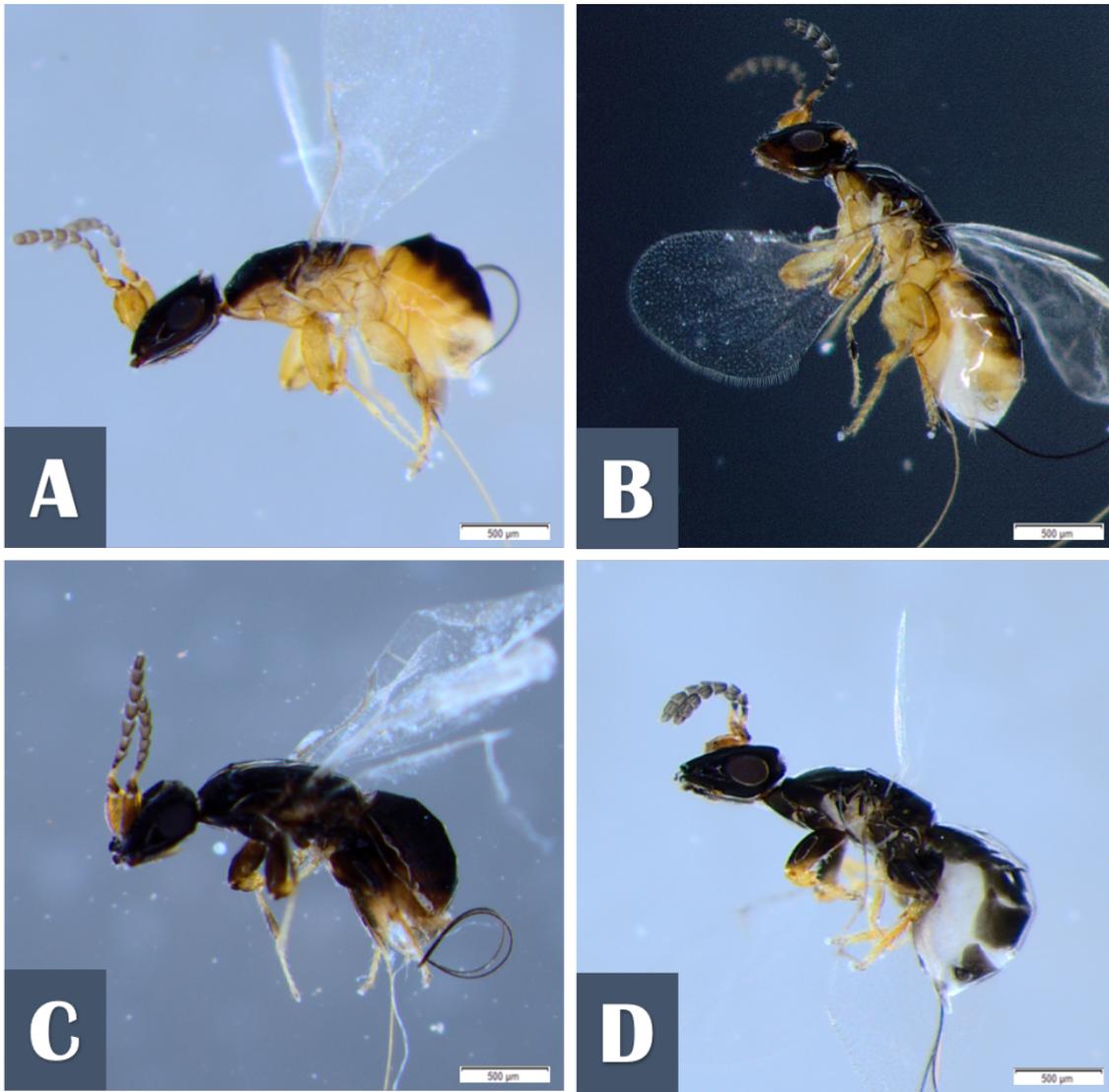
especies anidadas. Para implementar este método de delimitación de especies fue necesario la generación de una muestra de árboles a través de cadenas de Markov Monte Carlo. Se utilizó como base una topología inicial basada en inferencia bayesiana calculada en el presente trabajo. Para ello, se calcularon los valores de probabilidad posterior para cada clado como valor de confianza para la delimitación de máxima verosimilitud, implementando 50 millones de generaciones y muestreando cada 1 000. Se descartaron el 10% de los árboles muestreados.

## Resultados

### I. Identificación morfológica por microscopía y uso de claves taxonómicas

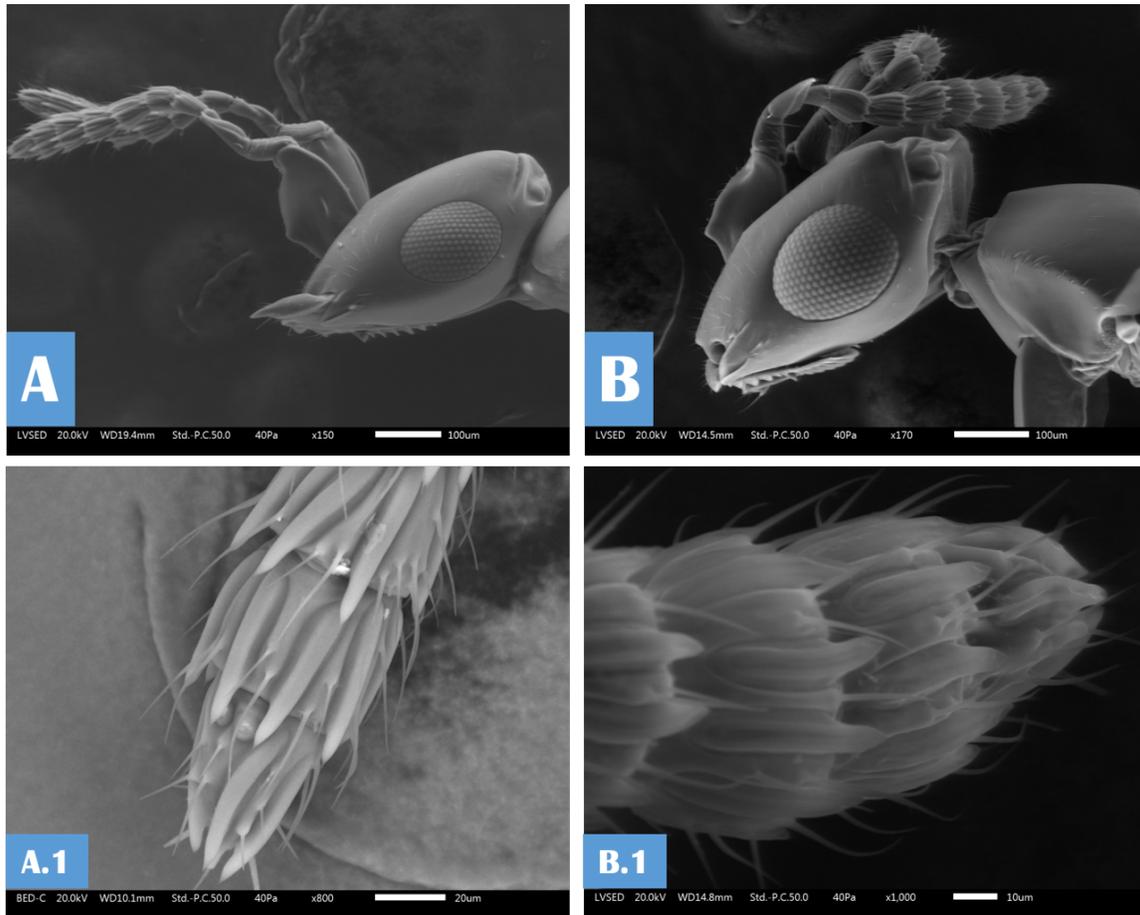
Morfológicamente se identificaron tres especies de *Pegoscapus* con las claves de Ramírez (1970) y Wiebes (1995). Las especies que se identificaron fueron aquellas provenientes de las localidades de Costa Rica. Se identificaron las especies *P. mariae* y *P. carlosi* a partir del árbol huésped *F. aurea* fo. *tuerckheimii*. Se identificó también a *P. jimenezi* proveniente también de Costa Rica, de *F. aurea* fo. *aurea*. Al menos siete grupos de individuos que no fueron identificados a nivel de especie se consideraron como *Pegoscapus* sp., y de acuerdo con los resultados de los análisis filogenéticos y los valores de distancias genéticas entre clados, se les asignaron números ascendentes. En la Fig. 6 se muestran las imágenes obtenidas por el microscopio estereoscópico de las avispas obtenidas a partir de *F. aurea* fo. *tuerckheimii*.

Entre los polinizadores de *F. aurea* fo. *tuerckheimii* (Fig.6) se observan a simple vista dos patrones de coloración ventral distintos, amarillo-ámbar (Fig. 6 A, B) y negro con las patas amarillentas (tibia, tarso, uñas y peines) (Fig. 6. C, D). Los cuatro ejemplares poseen similitud en el tamaño (alrededor de 1.5 mm). Sin embargo, se aprecian diferencias sutiles en las formas de la cabeza y proporción del tamaño de esta con el ancho del ojo.



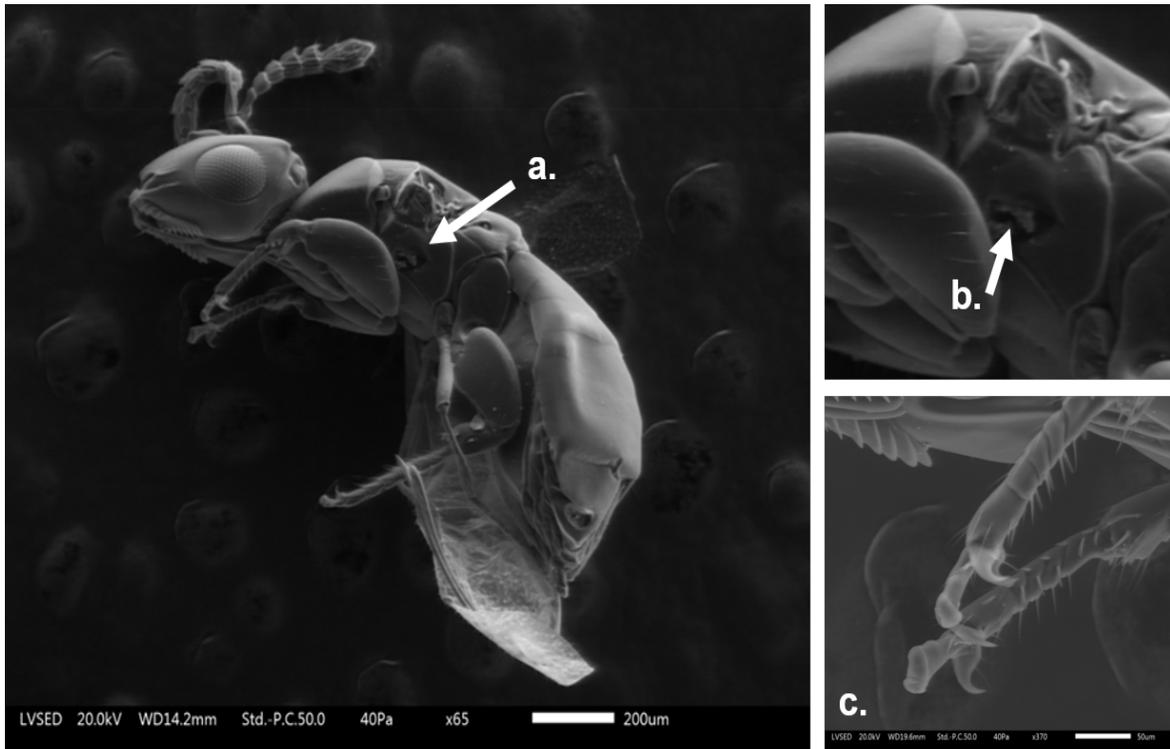
**Fig. 6.** Imágenes obtenidas por microscopio estereoscópico de la vista lateral las avispas hembras polinizadoras de *F. aurea fo. tuerckheimii*. **A.** *P. mariae*, Costa Rica; **B.** *P. sp. 6*, Neblinas, México; **C.** *P. carlosi*, Costa Rica. **D.** *P. sp. 3*, Neblinas, México.

Al examinar a los ejemplares al microscopio electrónico se observaron diferencias en el ancho y tamaño del ojo, así como en el ángulo de la estructura occipital (Fig. 7 A y B). También se enfocaron los tres últimos segmentos de la antena de *Pegoscapus sp. 6* y *P. sp. 3* respectivamente (Fig. 7 A.1 y B.1). Se aprecian sensilios redondeados y pequeñas setas (más delgadas). La disposición de los sensilios es similar en ambos organismos.



**Fig. 7.** Imágenes de microscopía electrónica de la vista lateral de la cabeza y antenas de las avispas polinizadoras de la fo. *tuerckheimii* en México. **A.** *P.* sp. 6 (amarilla, localidad Neblinas; **A.1.** Sensilios de los tres últimos segmentos de la antena de *P.* sp.6; **B.** *P.* sp. 3 (negra, localidad Neblinas; **B.1** Sensilios de los tres últimos segmentos de la antena de *P.* sp.3

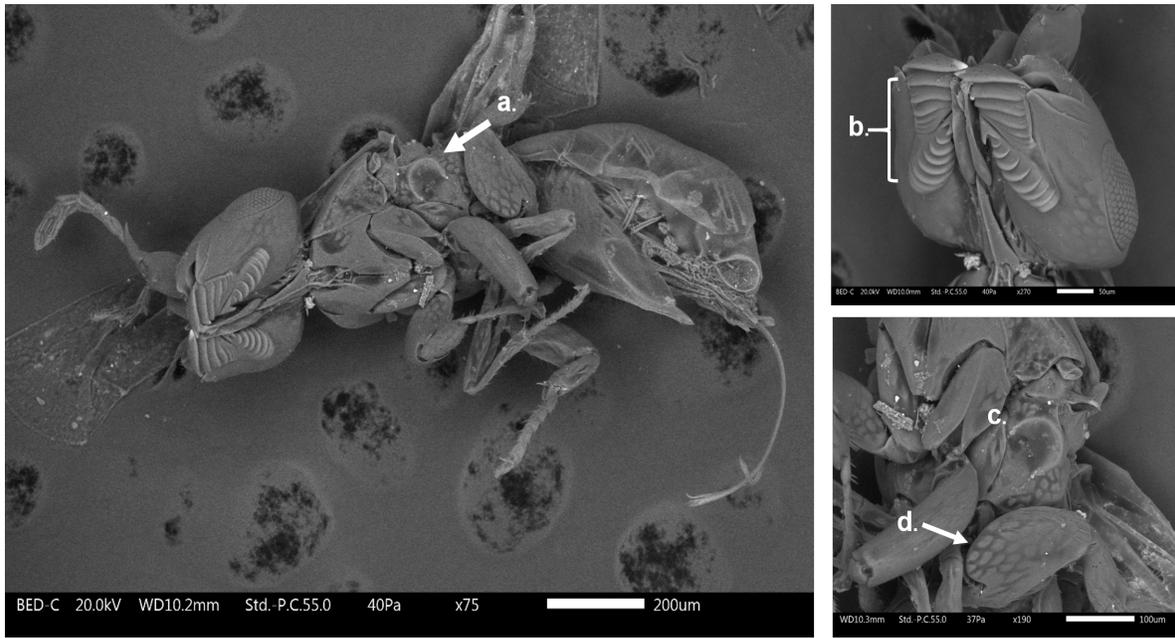
Como una observación incidental, en un ejemplar de *Pegoscopus* sp. 3 (huésped fo. *tuerckheimii*, localidad Neblinas, coloración negra) se observaron sacos polínicos en el mesosoma (Fig. 8).



**Fig. 8.** Detalle de estructuras de *P. sp. 3*. **a.** saco polínico o corbícula en el mesosternum; **b.** detalle del polen al interior del saco polínico; **c.** peines en los tarsos de las patas delanteras, con los cuales hacen la recolección del polen de manera activa.

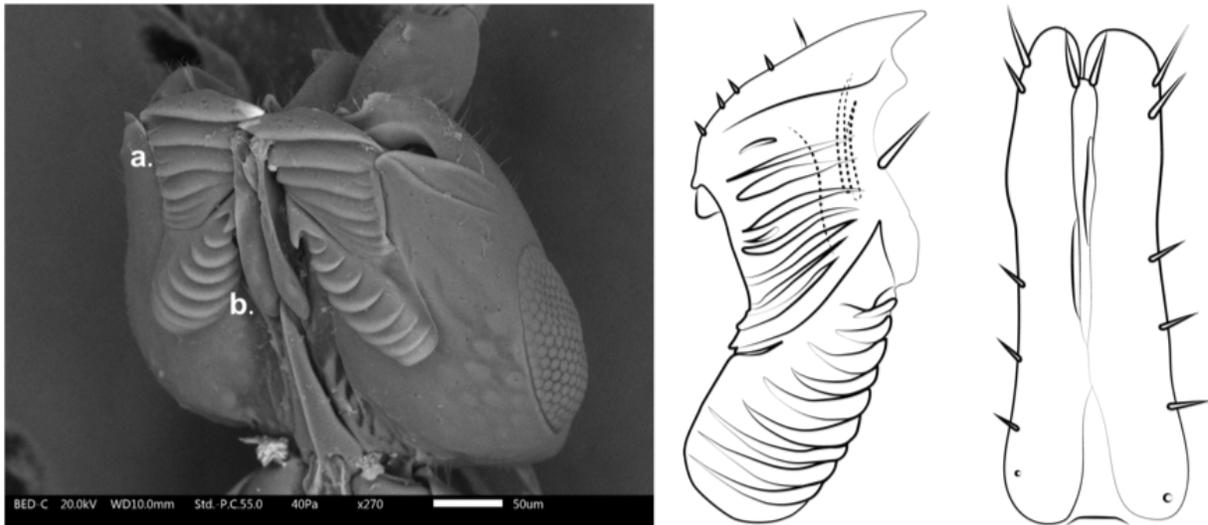
En el caso de *P. sp. 6* (huésped fo. *tuerckheimii*, localidad Neblinas, coloración amarilla) no fue posible observar sacos polínicos de manera clara en las imágenes a microscopio electrónico.

En el caso del polinizador de *F. aurea* fo. *isophlebia* (Fig. 9), se detectaron discrepancias entre los individuos muestreados y la especie descrita *P. urbanae* (Ramírez 1970; Wiebes 1995) para *F. isophlebia* en Costa Rica. A simple vista, el color de las avispas encontradas es predominantemente ámbar, a diferencia de lo referido por Ramírez (1970) y Wiebes (1995) quienes refieren que es de color negro.



**Fig. 9.** Vista ventral de una avispa hembra polinizadora de *Ficus* fo. *isophlebia*, de la localidad de Acayucan, Veracruz (*P. sp. 2*). **a, c.** saco polínico en el mesosoma; **b.** apéndices mandibulares; **d.** destaca la observación de patrones de coloración en los fémures, que indican tipos de materiales distintos (a simple vista no es observable, esta coloración sólo se detectó con la técnica de microscopía electrónica).

Además, se encontraron 13 lamelas en *P. sp. 2* cuando se esperarían 12 (Fig. 10) de acuerdo con la clave de Ramírez (1970). También difiere este ejemplar en el ángulo de apertura de la mandíbula con respecto a la clave. En la estrucutra maxilar tampoco se encontraron las setas medias descritas por Ramírez (1970).



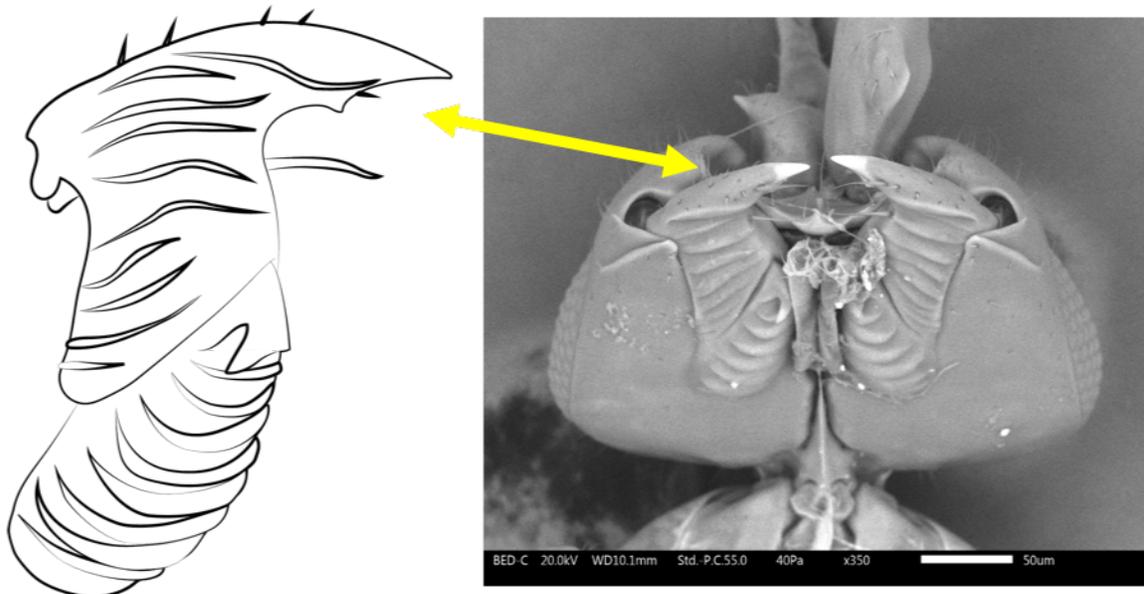
**Fig. 10.** Comparación de apéndice mandibular de *P.sp. 2* y maxila mostrada en la clave de Ramirez (1970). **a.** 13 lamelas en el apéndice mandibular. **b.** estructura maxilar.

En cuanto a los polinizadores de *F. aurea* fo. *aurea*, sólo se identificó a *P. jimenezi*, obtenido de una población en Costa Rica. En la Fig. 11 se muestran imágenes laterales del cuerpo de las avispas polinizadoras de esta forma, observadas en microscopio estereoscópico. El tamaño de todos los ejemplares es muy similar, siendo éste de entre 1.2-1.3 mm de largo. Se observan características parecidas entre éstos en cuanto a la coloración y la forma de la cabeza, con excepción de *P. sp. 5* (Fig. 11 D). El color en esta avispa es negro más intenso en las patas (fémur y tibia) y en la parte ventral del mesosoma; mientras que en el resto de avispas estas estructuras son de un tono parduzco-ámbar. En cuanto a la forma de la cabeza también es diferente *P. sp. 5* (Fig. 11 D), aunque similar con *P.sp. 7* (Fig. 8 B) pues el ángulo occipital es menos recto que en el resto, dando una apariencia más redondeada. En las imágenes A, C y D (Fig. 11) se observa que la vena postmarginal del ala está completamente ausente, característica de *P. jimenezi* de acuerdo con Wiebes (1995).



**Fig. 11.** Polinizadores de *F. aurea* fo. *aurea*. **a.** *P.* sp. 4, República Dominicana; **b.** *P.* sp. 7, Los Tuxtlas; **c.** *P.s* cf. *jimenezi*, Costa Rica; **d.** *P.* sp. 5, Neblinas.

Para corroborar que el ejemplar de Costa Rica corresponde a *P. jimenezi* (Ramírez, 1970) se visualizó el apéndice mandibular de un ejemplar (Fig. 12) pues la característica distintiva es un diente apical muy pronunciado. De acuerdo con lo observado, se confirmó que se trata de esta especie. Se puede comparar la agudeza de este diente con el de la Fig. 10, correspondiente a *P.* sp. 2.



**Fig. 12.** Vista ventral de la cabeza de *P. jimenezi*, se observa el diente apical pronunciado, como se ilustra en la clave de Ramírez (1970).

Finalmente, en las avispas de polinizadoras de *F. aurea* fo. *cookii* se observa una coloración ámbar (Fig. 13). Esta es similar a la coloración de las avispas polinizadoras de la fo. *tuerckheimii*: *P. mariae* y *P. sp. 6*. Entre estas dos, los polinizadores de fo. *cookii* son más similares a *P. mariae* por la forma trapezoide de la cabeza (ver Fig. 6 A). En cuanto al tamaño también son similares a *P. mariae* y carecen de vena postmarginal en el ala anterior. Sin embargo, la diferencia visible al microscopio estereoscópico radica en la presencia de manchas negras en los fémures de las patas frontales y posteriores.



**Fig.13.** Avispa hembra polinizadora de *F. aurea* fo. *cookii*, de la localidad Parque Nacional Cañón del Sumidero, Chiapas.

## II. Edición y alineamiento de secuencias de ADN

De los 62 individuos enviados a secuenciar, se obtuvieron secuencias viables de 46 individuos. Una vez integradas las secuencias obtenidas de GenBank para los análisis, la matriz final analizada constó de 52 secuencias. El fragmento de COI alineado fue de 513 pb de longitud. De las 52 secuencias, 9 correspondieron a avispas obtenidas de fo. *isophlebia* de 3 localidades; 24 de la fo. *tuerckheimii* de cuatro localidades; 13 de la fo. *aurea* de cuatro localidades, y no se obtuvieron secuencias viables de los polinizadores de la fo. *cookii* de la localidad de El Sumidero, Chiapas (para ver referencia de las localidades ver Tabla 3 en la sección Metodología).

### III. Estimación de la diversidad genética y distancias genéticas

De las 52 secuencias de la matriz no se tomaron en cuenta los grupos externos para las estimaciones de diversidad (2 secuencias de *Tetrapus* spp., 2 secuencias de géneros hermanos de *Pegoscopus*). De un total de 48 secuencias analizadas, la composición nucleotídica fue en mayor porcentaje A+T = 75%, mientras que G+C = 25%.

De las 48 secuencias de *Pegoscopus* spp. se encontraron un total de 35 haplotipos (H), 104 sitios polimórficos (S) (20.3%), 184 sitios invariables (35.8%), y 76 sitios informativos de parsimonia (14.8%). La diversidad haplotídica ( $H_d$ ) resultante es de 0.98 mientras que la diversidad nucleotídica ( $P_i$ ) es de 0.082. La matriz de distancias genéticas entre los clados resultantes incluyendo los grupos externos de la filogenia, se muestra en la Tabla 5. Se observa que las distancias genéticas entre las dos especies formalmente reconocidas de *Pegoscopus* se encuentran entre el 10 y 13%. Las distancias genéticas entre el género *Pegoscopus* y el género *Eupristina* se encuentran entre el 14 y 19%, entre *Pegoscopus* y *Blastophaga* 17 y 24% y entre *Pegoscopus* y *Tetrapus* entre el 19 y 24%.

**Tabla 6.** Matriz de distancias genéticas interclado (%) relativas calculadas bajo el modelo 2 parámetros de Kimura (K80)

	<b>Clado</b>	<b>Especie</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	
	<b>1</b>	A	<i>P. sp. 1</i>														
	<b>2</b>	B	<i>P. sp. 2</i>	10													
	<b>3</b>	C	<i>P. sp. 3</i>	12	10												
	<b>4</b>	D	<i>P. sp. 4</i>	11	8	7											
	<b>5</b>	E	<i>P. sp. 5</i>	12	9	7	5										
	<b>6</b>	F	<i>P. sp. 6</i>	14	11	8	7	5									
	<b>7</b>		<i>P. sp. 7</i>	14	11	10	10	8	8								
45	<b>8</b>	G	<i>P. cf. jimenezi</i>	13	14	12	11	10	10	14							
	<b>9</b>	H	<i>P. carlosi</i>	12	13	10	10	8	10	11	13						
	<b>10</b>	I	<i>P. mariae</i>	12	10	10	8	7	11	12	12	10					
	<b>11</b>		<i>P. jimenezi</i>	13	12	10	8	7	9	12	8	11	10				
	<b>12</b>		<i>P. obscurus</i>	12	11	10	11	11	13	12	16	12	11	13			
	<b>13</b>		<i>E. verticillata</i>	18	16	14	18	18	17	16	21	18	19	18	15		
	<b>14</b>		<i>B. nipponica</i>	23	21	21	19	18	19	17	24	21	20	21	20	17	
	<b>15</b>		<i>Tetrapus spp.</i>	20	21	20	19	20	22	22	24	21	19	21	20	20	19

Las distancias genéticas dentro de los clados reconocidos en la filogenia bayesiana se muestran en la Tabla 7. En ésta se observa que el grupo con mayor divergencia intraclado es *P. jimenezi* (4 - 10%) y el grupo con menor divergencia es *P. sp. 5* (clado E) con sólo un rango entre 0 y 0.7% entre sus individuos.

**Tabla 7.** Rango de distancias genéticas absolutas intraclado calculadas bajo el modelo de 2 parámetros de Kimura (K80).

Clado	Especie	% Divergencia	Forma	Localidad
G	<i>Pegoscapus jimenezi</i>	4 – 10	fo. <i>aurea</i>	Costa Rica
B	<i>Pegoscapus sp. 2</i>	3 – 8.9	fo. <i>isophlebia</i>	Los Tuxtlas
H	<i>Pegoscapus carlosi</i> *	0 – 3	fo. <i>tuerckheimii</i>	Costa Rica
F	<i>Pegoscapus sp. 6</i>	0.4 – 7.6	fo. <i>tuerckheimii</i>	SMO
I	<i>Pegoscapus mariae</i> *	0 – 2.6	fo. <i>tuerckheimii</i>	Costa Rica
A	<i>Pegoscapus sp. 1</i> *	1.8 – 2	fo. <i>isophlebia</i>	Chiapas
D	<i>Pegoscapus sp. 4</i> *	0 – 1	fo. <i>aurea</i>	República Dominicana
C	<i>Pegoscapus sp. 3</i> *	0 – 1.2	fo. <i>tuerckheimii</i>	SMO
E	<i>Pegoscapus sp. 5</i> *	0 – 0.7	fo. <i>aurea</i>	Neblinas

Se marcan con \* las especies cuya divergencia es menor al 3%, y que por lo tanto se consideran una sola especie de acuerdo con lo estimado para Hymenoptera (Herbert *et al.* 2003).

#### IV. Reconstrucción filogenética bayesiana del gen COI

Dentro del clado de *Pegoscapus* se diferenciaron nueve clados ( $P > 0.95$ ) listados con las letras A-I (Fig. 14). A los individuos de cada clado, se les asignó el nombre *Pegoscapus sp.* y se enumeraron del uno al siete de acuerdo con los clados observados en la filogenia. Esto se debe a que dichos individuos no se agrupan con individuos de especies reconocidas de las que fueron incluidas algunas secuencias como *P. jimenezi* y *P. obscurus* y tampoco fue posible identificarlos a través de caracteres morfológicos. Las relaciones filogenéticas entre los clados que presentan valores de probabilidad posterior (P) mayor a 0.95, son *P. obscurus* como grupo hermano de *P. mariae*, y a su vez, *P. mariae* como grupo hermano de *P. carlosi*.

El grupo de *P. sp. 3* (clado C) consiste en individuos que provienen de *F. aurea* fo. *tuerckheimii* de tres localidades diferentes a lo largo de la Sierra Madre Oriental (Orizaba,

Neblinas y Hueytamalco), lo que indica que existe flujo génico entre estas poblaciones. En este grupo (clado C) se observa que existen relaciones más cercanas entre individuos de distintas localidades que entre individuos colectados de un mismo árbol.

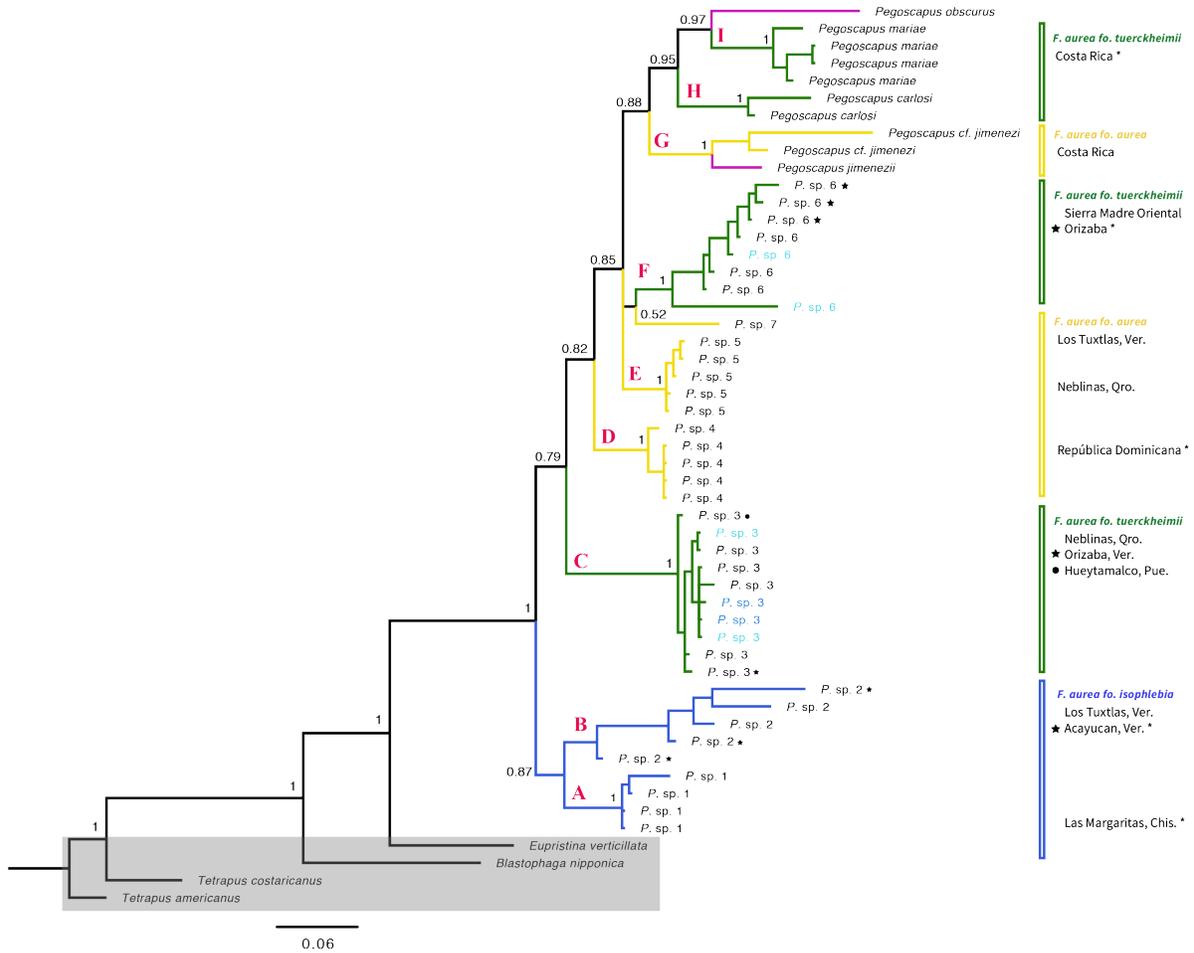
Las avispas polinizadoras de *F. aurea* fo. *aurea* corresponden a los clados E (*P. sp.* 5), corresponde a avispas provenientes de en la localidad de Neblinas, Querétaro, D (*P. sp.* 4) de República Dominicana.y *P. sp.* 7, de los Tuxtlas, Veracruz. Entre ellas no existe una relación filogenética cercana, y las posibles relaciones observadas en la filogenia son pobremente soportadas ( $P = 0.85$ ).

Por otra parte, las avispas polinizadoras de *F. aurea* fo. *aurea* (Clado G) y fo. *tuerckheimii* (H +I) simpátricos en Costa Rica están más relacionadas entre sí que con las avispas que polinizan a los mismos morfotipos en cualquier localidad de México y República Dominicana, evidenciando mayor cercanía filogenética congruente con la cercanía geográfica, que con la forma de *F. aurea* a la que están asociadas.

El clado G contiene a los individuos de *P. jimenezi* de Costa Rica. La secuencia obtenida de GenBank se muestra con una rama en color rosa en la filogenia (Fig. 14). Aunque los tres individuos se agrupan en un mismo clado, existe un nodo entre ellos que sugiere la existencia de un ancestro común y por lo tanto alta divergencia genética entre los individuos colectados en campo y el individuo referencia de GenBank ( $> 3\%$ ) Morfológicamente se identifican como la misma especie, anterior (ver Fig. 12), por lo que se podría tratar de especiación críptica.

Se observa que *P. obscurus* que poliniza a otra especie de *Ficus* (*Ficus longifolia*) con distribución en Brasil, se encuentra anidado al clado I, avispas polinizadoras de la fo. *tuerckheimii* de Costa Rica ( $P= 0.97$ ). Estas relaciones indican nuevamente que existe más cercanía filogenética entre grupos de regiones geográficas cercanas que entre grupos que polinizan a una misma forma de *F. aurea*.

Finalmente, en la filogenia también se observan diferencias en las longitudes de las ramas internas de los clados. Aunque de manera general la longitud de las ramas intraclado se mantiene en un rango corto, destacan algunas ramas largas en la topología. En el clado B se observan ramas internas más largas, que corresponden a avispas que polinizan al morfotipo *isophlebia* en las localidades de los Tuxtlas y Acayucan, Veracruz. En el clado F también se observa un individuo muy divergente del resto, *P. sp.* 6. Los individuos del clado G, de la especie *P. jimenezi* también tienen ramas largas. Sin embargo, a pesar de las divergencias, se mantienen agrupados en un clado, sin entremezclarse individuos en otros linajes. La alta variación genética dentro de estos grupos, y la falta de diferencias morfológicas entre los individuos que los conforman, sugieren la presencia de especies crípticas. De manera contrastante, los clados que presentan ramas más cortas entre los individuos son el clado D (*P. sp.* 4) y C (*P. sp.* 3).



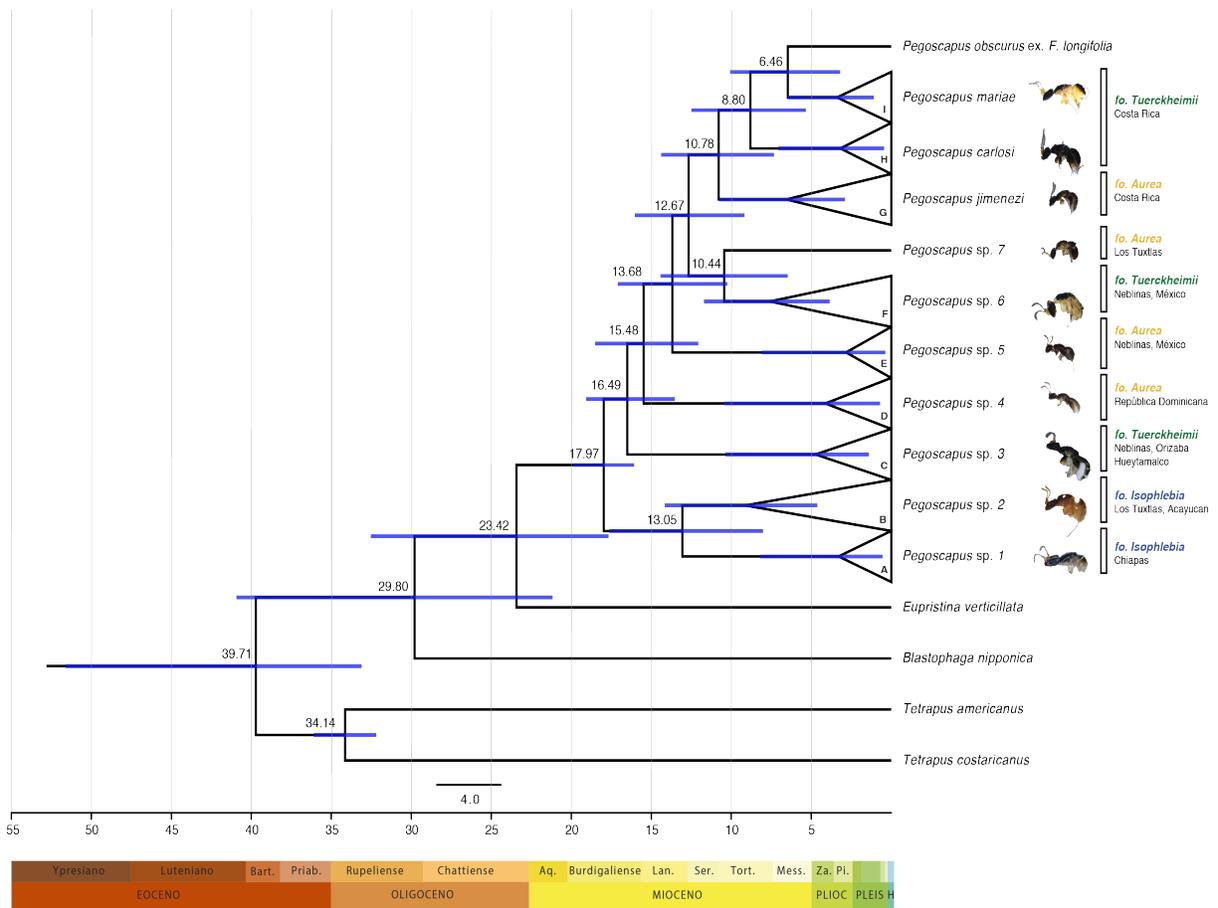
**Fig.14.** Filogenia de inferencia bayesiana de las avispas polinizadoras de tres morfotipos del complejo *F. aurea*: fo. *tuerckheimii* (verde), fo. *aurea* (amarillo), fo. *isophlebia* (azul). Las ramas rosas indican que los individuos son secuencias obtenidas de Genbank. Las letras (A-I) listan a los clados resultantes; para cada clado se muestra el valor de probabilidad posterior en el nodo. Del lado derecho de la filogenia se indican el morfotipo de *F. aurea* y la localidad de la cual se colectaron los especímenes analizados. La figura \* indica que las avispas de dicha localidad se colectaron de un solo individuo de *F. aurea*. Los individuos de *Pegoscapus* que se colectaron de un solo huésped se marcan del mismo color en la filogenia.

## V. Estimación de tiempos de divergencia por reloj molecular relajado

La datación molecular indica que la diversificación de los linajes de *Pegoscapus* que polinizan al complejo *F. aurea* ocurrió a partir y durante el Mioceno medio-tardío (Fig. 15), en un periodo comprendido entre hace aproximadamente 18 – 6.5 Ma. Como linajes más antiguos aparecen los ancestros de los clados C (*P. sp. 3*) de la Sierra Madre Oriental, el cual divergió hace alrededor de 19 – 14.5 Ma y del clado D (*P. sp. 4*), de la isla La Española en República Dominicana, con edad estimada de hace  $16 \pm 2$  Ma.

Para las avispas polinizadoras de la fo. *isophlebia* en Veracruz y Chiapas (clados A y B) se estima que el último ancestro en común entre estos linajes existió hace  $13 \pm 4$  Ma, durante el Mioceno medio. En un periodo similar, hace 16 – 11 Ma divergió el linaje que dio origen a las avispas del clado E (*P. sp. 5*), que se distribuyen hoy en la localidad de Neblinas y polinizan a la fo. *aurea*. Hace  $10.5 \pm 3.5$  Ma existió el último ancestro común del clado F (polinizadoras de la fo. *tuerckheimii* en la SMO y *P. sp. 7* (polinizadora de la fo. *aurea* en los Tuxtles), así como de los grupos G+H+I (Costa Rica) y *P. obscurus* (Brasil).

Los linajes que divergieron más recientemente son los que se distribuyen en Costa Rica (G+H+I) y Brasil, en el Mioceno tardío. Entre éstos y de acuerdo con los resultados, el nodo más antiguo es el que da origen a *P. jimenezi* ( $10 \pm 3$  Ma), seguido de *P. carlosi* ( $8 \pm 3$  Ma) y el más reciente *P. mariae* ( $6.5 \pm 4$  Ma) con respecto a *P. obscurus* de Brasil.



**Fig. 15.** Árbol de máxima credibilidad de clados, se muestran los tiempos de divergencia estimados para especies de *Pegoscapus* que polinizan al complejo *F. aurea*. Las barras en los nodos representan los tiempos mínimos y máximos de divergencia estimados dentro del intervalo de confianza >95% de HPD (*highest posterior density*), mientras que los números en el nodo representan las medias de dichos tiempos en millones de años.

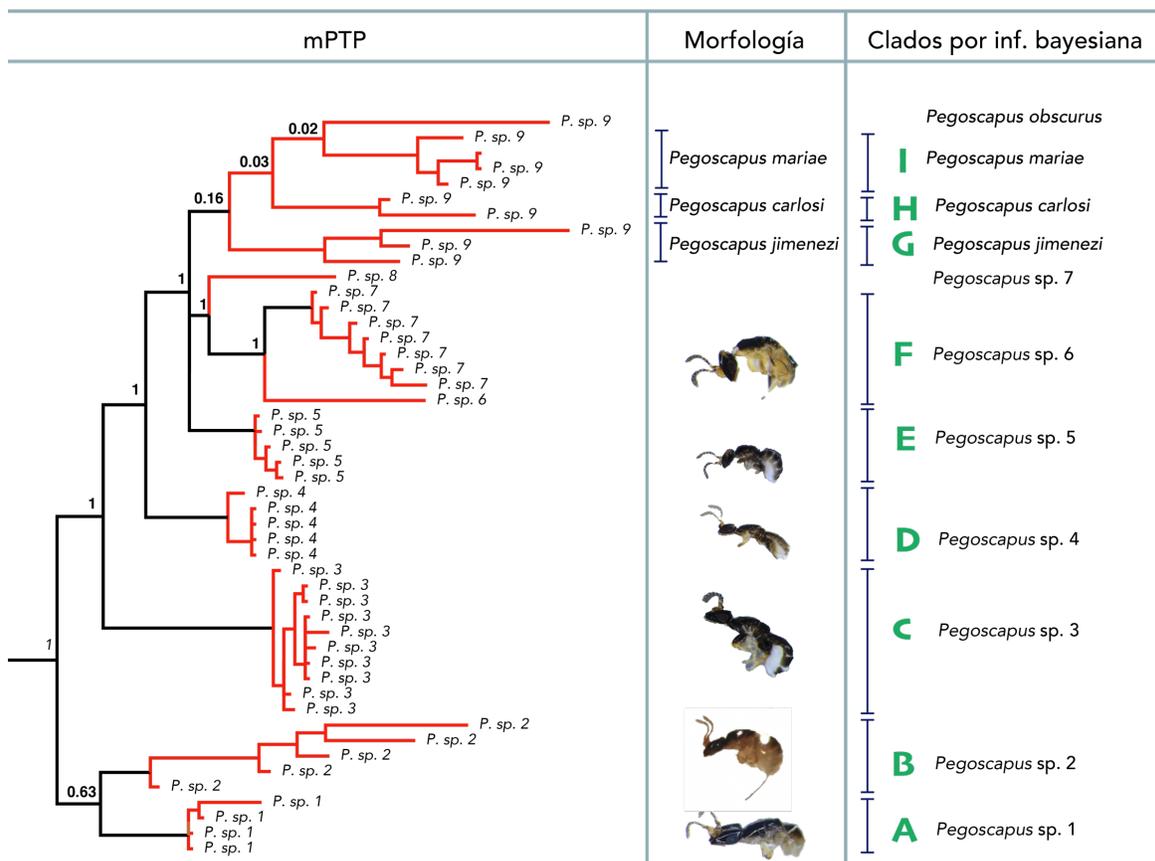
## VI. Reconstrucción de áreas ancestrales

Los valores de verosimilitud globales para los valores de probabilidad de los nodos fueron congruentes entre ambos modelos (S-DIVA y S-DEC) (Fig.16). Así mismo, se observó congruencia total entre las áreas predichas entre los dos análisis. El escenario mostrado por ambos modelos, sugiere que el área ancestral para el ancestro común más reciente de *Pegoscapus* spp. se conformaba por las cuatro regiones morfotectónicas (BEFH: Tuxtla, Sierra Madre Orientalense, Chiapanense, y en República Dominicana). A partir de dicha población ancestral, ocurrió un evento vicariante que separaría a los linajes polinizadores de *fo. isophlebia* en Chiapas y Veracruz (clados A + B) respecto al resto. Posteriormente, se identificaron cinco eventos vicariantes y cuatro de dispersión durante la configuración de la actual distribución de *Pegoscapus* spp. asociadas al *F. aurea*.



## VII. Análisis de delimitación de especies por el método mPTP

El análisis de delimitación mPTP sugirió un modelo de especiación en donde se reconocen nueve especies de *Pegoscapus* que polinizan el complejo *F. aurea* (Fig. 17, izquierda). Al menos dos especies pero con bajo valor de soporte fueron delimitadas y que polinizan la fo. *ishoplebia* en Chiapas: *P.sp. 1*, y *P.sp. 2*, del clado A y B, respectivamente. Al contrario, con una alta probabilidad posterior, se estimó que el clado C que poliniza la fo. *tuerckheimii* (*P.sp. 3*); y D y E (*P.sp. 4* y *P.sp. 5*) que polinizan la fo. *aurea*, representan linajes evolutivos independientes. Sin embargo, en el clado F, el análisis de delimitación de especies sugiere que éste se conforma de al menos 2 especies de *Pegoscapus* ( $P=1$ ). Se reconoció a la rama nombrada como *P.sp. 7* en el análisis filogenético, como una especie distinta la cual para este análisis fue nombrada *P.sp. 8* ( $P=1$ ). Finalmente, el modelo de especiación obtenido para *Pegoscapus* sugiere que el clado G+H+I, aquel que incluye a las especies de Costa Rica *P. mariae*, *P. carlosi* y *P. jimenezi*, y de Brasil *P. obscurus*, representan una única especie pero con un valor muy bajo de probabilidad posterior.



**Fig. 17.** Cuadro comparativo entre el modelo de especiación estimado por mPTP (izquierda), la variación morfológica observada y especies identificadas con clave taxonómica (centro) y los clados obtenidos en la reconstrucción filogenética por inferencia bayesiana (derecha). Los números en los nodos representan los valores de probabilidad posterior para cada especie delimitada en el modelo estimado por mPTP.

## Discusión

### I. Inferencias filogenéticas y evolutivas basadas en la filogenia de COI

#### i. Inconsistencia filogenética entre polinizadores de cada morfotipo de *F. aurea*

El filograma demuestra una clara inconsistencia filogenética entre las relaciones filogenéticas de los polinizadores y el huésped en el que se encuentran. Es decir, no se observan clados que se agrupan de manera correspondiente con cada uno de los cuatro morfotipos de *F. aurea* evaluados. Por lo tanto, no existe un único grupo de avispas que esté favoreciendo el flujo génico específicamente en cada una de las formas de *F. aurea* (*sensu* Berg 2007) o especies (*sensu* Hernández-Esquivel *et al.*, en revisión). Esto indica que no hay especificidad a un nivel filogenético con cada forma de *F. aurea*.

Lo anterior podría tener repercusiones en las interpretaciones sobre los procesos de especiación de los *Ficus*. De acuerdo con los resultados, y suponiendo que no hay intercambio de polen entre las poblaciones de los morfotipos de *F. aurea* en la mayoría de los casos, se infiere que las poblaciones de un mismo morfotipo están aisladas reproductivamente al no compartir al mismo polinizador. Dependiendo de la estructura genética de las poblaciones del complejo, se podrían detectar especies independientes. Por ello, los resultados sugieren que es más probable que los morfotipos de *F. aurea* podrían tratarse en realidad de especies distintas como sostiene Hernández-Esquivel *et al.*, (en revisión). Esto es plausible, ya que Carvajal (2007) describe una nueva especie que antes se consideraba dentro del complejo, la denomina *Ficus rzedowskiana* en la región de los Tuxtlas, la cual es apoyada por Ibarra-Manríquez *et al.* (2012). Sin embargo, no se tomó en cuenta en este estudio y se evaluó la hipótesis de las cuatro formas propuestas por Berg (2007). No obstante, el árbol del que se obtuvo la secuencia de la avispa *P. sp. 5*, en la localidad de Los Tuxtlas, podría corresponder a *F. rzedowskiana* Carvajal & Cuev.

En cuanto a la especificidad uno a uno, se puede decir que es posible que las avispas se diversifiquen de manera simpátrica polinizando a un mismo morfotipo de *Ficus*, sin que implique necesariamente la especiación del huésped. Para evaluar estas hipótesis será necesario la revisión taxonómica por métodos morfológicos y genómicos de las entidades que componen al complejo *F. aurea*, idealmente en toda su distribución, y hacer análisis de filogenética y filogeografía comparativa.

#### ii. Alta especificidad ecológica entre avispas y los morfotipos a los que polinizan.

Aunque no se demuestra correspondencia filogenética entre las avispas asociadas a cada forma de *F. aurea*, la especificidad ecológica es muy marcada y es prácticamente uno a uno con respecto a cada morfotipo de prácticamente cada localidad. Es decir, las avispas

fueron altamente divergentes genéticamente entre sí en 8 de 10 localidades, donde se encontraban los morfotipos de *F. aurea*. Si se asume que cada uno de los clados recuperados en la filogenia representa una especie diferente, 8 de cada 10 poblaciones de higueras muestreadas tienen su propia y única especie de polinizador.

La especificidad ecológica en las especies de *Pegoscapus* parece ser muy marcada, ya que no se encontró una misma entidad genética de avispa polinizando al mismo morfotipo de *F. aurea* en diferentes localidades (excepto *P. sp. 3* que se encontró en fo. *tuerckheimii* en Orizaba, Neblinas y Hueytamalco). En otras palabras, son ecológicamente restringidas a prácticamente una higuera por localidad. Lo que determina esta especificidad ecológica tan marcada son características fenotípicas coadaptativas entre las avispas y las higueras. Las más determinantes son el tamaño del ostiolo y el tamaño de la avispa, así como la forma de la cabeza. Una de las características que se ha considerado como la más importante y de la que dependen el resto, es la capacidad de detección por las avispas de compuestos volátiles que emite el higo (Wang *et al.*, 2012). Se ha demostrado que mezclas de estos compuestos son específicos a diversas especies de *Ficus* (Hossaert-McKey *et al.*, 2016). Se desconoce qué tan variable es el espectro de esencias que emiten los higos del complejo *F. aurea*, así como si los sensilios de las antenas de las avispas muestran plasticidad para detectarlos. Para poder saberlo, es necesario realizar experimentos en los que se evalúe la especificidad en la atracción químico sensorial de la avispa hacia el higo, así como el éxito o fracaso exhibido al entrar por el ostiolo (Hossaert-McKey *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 2018). Esto permitiría definir qué poblaciones de higueras de cada morfotipo de *F. aurea* podrían ser receptivas a qué especies de avispas y establecer con claridad a cada uno de los polinizadores. Con ello también se podría dar mayor evidencia para probar la hipótesis del aislamiento de flujo génico entre los morfotipos de *F. aurea*.

*iii. Mayor congruencia filogenética geográfica que por la asociación a las formas de F. aurea que polinizan Pegoscapus spp.*

Los resultados indican que las relaciones filogenéticas entre las avispas son más congruentes con su cercanía geográfica, que con la entidad morfológica de *F. aurea* a la que polinizan. Por lo que el factor geográfico en la distribución podría ser más influyente en los procesos de especiación y diversificación, que la compatibilidad entre los morfotipos de *F. aurea*. Esto podría significar dos cosas. Una, que los morfotipos del complejo aurea son una clasificación artificial parafilética y que en realidad no hubo codiversificación con las avispas que lo polinizan y que han ocurrido múltiples cambios de huésped; la otra, es que pudiera haber otras especies de *Ficus* que podrían ser grupos hermanos de este complejo, en las cuales han coevolucionado las avispas, y que, dado que no se han muestreado en este estudio, estén causando falta de resolución en las relaciones. También, la falta de resolución de estas ramas podría deberse a la falta de muestreo en Centroamérica donde también se distribuye la fo. *tuerckheimii* y a la no inclusión de otros polinizadores de *Ficus* neotropicales.

iv. *Falta de resolución de los nodos profundos en la filogenia bayesiana.*

Si bien la filogenia bayesiana apoya con altos valores de probabilidad la existencia de nueve clados de los diferentes polinizadores asociados a *F. aurea*, permanecen poco claras las relaciones entre ellos, a excepción de la existente entre las especies *P. carlosi* y *P. mariae* (grupos hermanos) y entre estos dos grupos con *P. jimenezi*. Las tres especies de las que se resuelve la filogenia son de Costa Rica. Sin embargo, las relaciones de parentesco entre los clados que se distribuyen en México y República Dominicana es incierto. Son varios factores los que pueden explicar la falta de resolución a ese nivel de la filogenia. Es poco probable que se deba al tamaño del fragmento del código de barras analizado, ya que es reconocido que una matriz de secuencias de al menos 500 pb ya evita complicaciones analíticas (Smith *et al.*, 2018). Más bien, un factor importante puede ser que la laguna de datos en el territorio comprendido entre México y Costa Rica. De igual forma, es posible que los grupos hermanos de los clados presentados correspondan a avispas que polinizan a otros *Ficus* neotropicales, no necesariamente a *F. aurea*. Una muestra de ello es que el individuo de *P. obscurus* que poliniza a *Ficus longifolia* (especie de *Ficus* que no es del complejo *aurea*), se relaciona como hermana de *P. mariae* (P=0.97). Para comprender mejor la conectividad y la estructura de las poblaciones de avispas asociadas a un morfotipo, se deberá muestrear a lo largo de toda la distribución del complejo, en particular en localidades intermedias entre México y Costa Rica, hasta Panamá. Otro factor que se infiere a partir del estudio, es que, para estos himenópteros, únicamente el gen COI o código de barras no es suficiente para resolver las relaciones entre nodos más profundos de los linajes. Por ello, es altamente recomendable incluir datos de al menos un gen nuclear.

vi. *Implicaciones para la conservación*

Una pregunta en términos de conservación que surge a partir de este estudio es que, al ser un mutualismo interespecífico de baja densidad poblacional, pero con alta especificidad ecológica podría ser especialmente vulnerable a los efectos de la fragmentación por la destrucción de hábitat. Por lo anterior cobran relevancia estudios poblacionales de *Ficus* y de las avispas para entender el mutualismo en términos de estabilidad. Si las poblaciones de los mismos genotipos de *Ficus* son muy escasas, se pone en peligro a ambos taxones, higueras y avispas. Aunque las especies de higueras pueden ser numerosas en un mismo bosque tropical, los individuos por especie son escasos (baja densidad poblacional) (Janzen 1979; Rasplus *et al.*, 2016). Estudios han sugerido que se necesitan aproximadamente 100 árboles para mantener poblaciones locales de avispas, y que alrededor de 300 árboles son los mínimos para mantener una población viable de *Ficus* (McKey, 1989). Un punto que se debería evaluar al respecto, es si la densidad poblacional de los árboles está relacionada con la variación genética en las poblaciones de sus polinizadores. Por ello, próximos estudios sobre la variación genética a nivel poblacional de las avispas se podrían evaluar, a nivel dentro de un solo árbol o inclusive dentro de un mismo sicono.

## II. Convergencias morfológicas y especiación críptica

Se detectaron dos convergencias evolutivas en rasgos morfológicos que resaltan en los polinizadores de *F. aurea* fo. *tuerckheimii* en México y Costa Rica. En estas localidades, se encontraron dos especies de avispas dentro de los siconos. A simple vista, o bien al microscopio estereoscópico, se observan rasgos similares en tamaño y coloración. En ambas regiones hay dos polinizadores, una entidad de coloración clara o ámbar, y otra con coloración negra u oscura. Se podría suponer, que las avispas oscuras de México en la fo. *tuerckheimii* son las mismas que las avispas oscuras de la fo. *tuerckheimii* en Costa Rica; y de manera correspondiente con las avispas de coloración ámbar en ambas localidades. Sin embargo, las secuencias del marcador COI resultaron ser muy divergentes entre las cuatro entidades y no se recuperaron como monofiléticas con respecto a las formas de *Ficus* ni en cuanto al patrón de coloración. Las dos especies de polinizadores en Costa Rica (*P. mariae* y *P. carlosi*) son más similares entre ellas genéticamente, y son grupos hermanos filogenéticamente ( $P= 0.95$ ). Mientras que las dos avispas en México (*P. sp. 6*, amarilla y *P. sp. 3*, negra) son muy divergentes entre ellas, no son grupos hermanos y pertenecen a linajes distantes. No obstante, se observaron claramente convergencias morfológicas entre estos polinizadores (la avispa color ámbar en fo. *tuerckheimii* en México con respecto de *P. mariae* de Costa Rica; la avispa oscura en fo. *tuerckheimii* en México con respecto de *P. carlosi* de Costa Rica). Las diferencias sólo son detectables a nivel genético y a nivel de análisis morfológico por microscopía electrónica, sin embargo son detectables y por ello no se determinan como especies crípticas. La convergencia morfológica es un patrón frecuentemente observado que ocurre entre especies con ambientes similares, nichos tróficos o estrategias de historias de vida similares (Ceccarelli & Zaldívar-Riverón 2013). Estos resultados demuestran que muy probablemente organismos similares morfológicamente a nivel superficial que han sido catalogados como una misma especie, sean más de una (crípticas) que presentan convergencias morfológicas y se demuestra la importancia de realizar este esfuerzo de detección y descripción de especies con métodos moleculares en insectos, en particular en himenópteros chalcidoideos. Otra posible explicación al fenómeno observado es el patrón de estasis morfológica, es decir, clados que acumulan variación fenotípica a una tasa muy lenta, misma que no corresponde con la tasa de mutación molecular (Davis *et al.*, 2014). Sin embargo para probar esta hipótesis sería necesario evaluar a nivel genómico si los genes asociados a los caracteres morfológicos similares están bajo selección estabilizadora y realizar un análisis detallado de los caracteres en cuestión.

Pero, ¿qué factores pueden permitir esta convergencia morfológica tan peculiar? Se han reportado varias especies de *Ficus* que poseen a simple vista dos especies de avispas polinizadoras en sus higos. En la mayoría de los casos en los que sucede este fenómeno, una especie es amarilla (también descritas como ámbar, o miel) y otra es negra (u oscura). Poco se ha estudiado al respecto, pero en tales estudios se ha observado que las avispas de color amarillo se dispersan por la noche y las de color negro se dispersan durante el día

(Harrison 2003; Sutton *et al.*, 2018). También se ha registrado que las avispas de color negro viven más tiempo (unas pocas horas) y tienen ojos más pequeños, mientras que las amarillas viven menos horas y tienen ojos más grandes (Conchou *et al.*, 2014). Es decir, pueden ocupar nichos distintos en el higo al ovoponer ya sea de día o de noche. ¿Pero el higo ofrece en realidad nichos distintos para las avispas negras y amarillas? Sorprendentemente, se ha demostrado en algunos higos, que la composición química de la esencia (compuestos fitoquímicos volátiles) emitida por los frutos varía entre el amanecer y el anochecer. Por lo que las dos especies de avispa (amarillas y negras) están expuestas a diferentes rangos de esencias que emite el higo. Esto es una característica ecológica divergente que puede facilitar la coexistencia de ambas. Por ello, suponiendo que los higos de la fo. *tuerckheimii* en México y en Costa Rica puedan emitir esencias diferentes de día y de noche, esta sería la razón por la cual se discierne el nicho ecológico para que se propicien las convergencias morfológicas de coloración en dos pares de avispas (negras y amarillas) de especies distintas respectivamente.

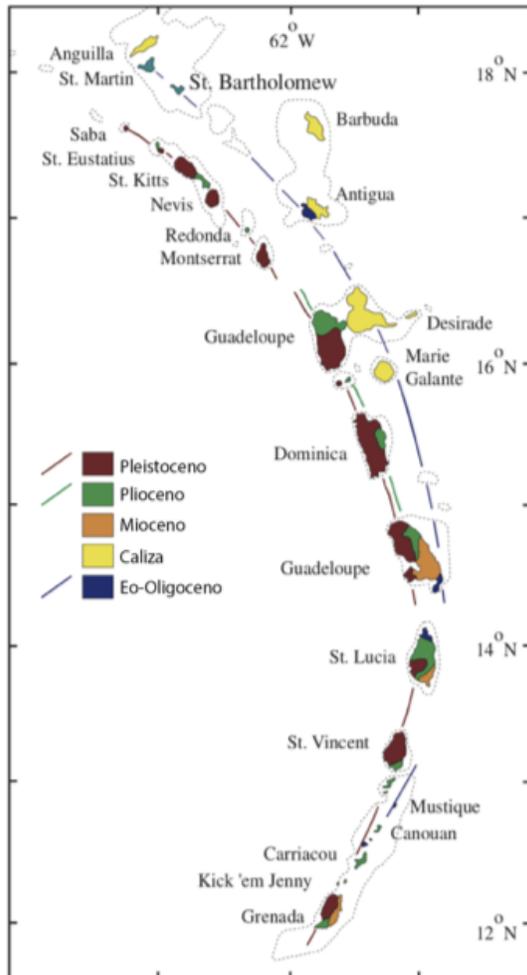
Aunque en el caso anterior se descartan las avispas mencionadas como especies crípticas, los resultados apuntan la posibilidad de la existencia de especies crípticas dentro de algunos otros clados. Con base en el método de delimitación de especies por divergencia del código de barras mayor al 3% en himenópteros (Herbert *et al.* 2003), se podría suponer la existencia de especies crípticas dentro de los grupos de: *Pegoscapus jimenezi*, *P. sp. 2* y *P. sp. 6*. Dentro de esos clados, los individuos divergen en un rango de 4 – 10% , 3 – 8.9% y 0.4 – 7.6 % respectivamente. En estos grupos en particular, sería necesario aumentar el número de muestra poblacional para confirmar la hipótesis de especiación críptica.

#### **IV. Hipótesis biogeográficas**

La datación molecular indica que el periodo de diversificación de los linajes de *Pegoscapus* estudiados se dio durante el Mioceno medio-tardío. Este resultado coincide con uno de los periodos de mayor diversificación de *Ficus* en América de acuerdo con Machado *et al.*, 2018. Ellos estiman que ocurrieron dos periodos de radiación adaptativa en *Ficus*, uno durante el Mioceno medio y otro en el Plioceno. El resultado coincide con este primer periodo de radiación. El Mioceno se caracterizó por tener una temperatura global más cálida que la actual, (aproximadamente 17.8 °C temperatura media global en superficie (Knorr *et al.*, 2011) y altos niveles de precipitación, lo que permitió la expansión de los bosques y selvas tropicales en América (Kreft & Jetz 2007; Machado *et al.*, 2018). Los altos niveles de temperatura y humedad pudieron por lo tanto haber estado correlacionados con la alta riqueza de especies en general.

Los linajes más recientes, corresponden a los polinizadores de *F. aurea* en Costa Rica (*P. carlosi*, *P. mariae* y *P. jimenezi*). Esto sugiere, en primera instancia, que la distribución de los ancestros de las avispas analizadas podría encontrarse más al norte, en es decir, en México. Lo anterior, es comprobado por el análisis de reconstrucción de áreas

ancestrales. Como área ancestral, arroja un área comprendida por las actuales provincias morfotectónicas Campechano-Petense (Planiciense), Sierra Madre Orientalense, Chiapanense, y la Cordillera Central de la isla La Española (República Dominicana). El mismo análisis indica que a partir de un evento vicariante se separaron las especies *P. sp. 1* y *P. sp. 2*, de Chiapas y los Tuxtlas respectivamente. La separación entre ambos linajes se estima que ocurrió hace alrededor de  $12 \pm 2$  Ma, de acuerdo con la datación molecular. Si se toma en cuenta la media (12 Ma), la edad coincide con el surgimiento de la Sierra de Chiapas, la cual se calcula que emergió hace alrededor de 12.5 Ma (Aguayo-Camargo &



**Fig. 18.** Mapa de las Antillas Menores, se marcan las edades aproximadas de las rocas expuestas y la posición del frente volcánico durante el Eoceno – Oligoceno (líneas). Las líneas punteadas muestran el límite de la isóbata de 200m. Modificado de Wadge 1994.

Córdova 1987). Por lo que al parecer, la orogénesis de este sistema montañoso fue el evento vicariante que separó a estas dos especies. Además, la propuesta de que el área ancestral incluía a la actual provincia morfotectónica de Chiapas (Chiapanense) coincide con que en esta región del Suroeste de México (los estados de Oaxaca y Chiapas) es la región con mayor riqueza de especies de *Ficus* en México. En ambos estados se cuenta con 19 especies de las 22 que se encuentran en el país (Ibarra-Manríquez *et al.*, 2012).

Posterior al evento vicariante que separó a *P. sp. 1* y *P. sp. 2* del resto, ocurrieron eventos de dispersión y de vicarianza en el proceso de colonización de *Pegoscapus* hacia otras regiones de México (como la SMO). La Sierra Madre Oriental es una formación antigua del periodo Paleógeno (Era Cenozoica) que se ha propuesto que se configuró a lo largo de tres episodios calculados hace 86-80 Ma, 75-65 Ma y 55 y 44 Ma (Dickinson *et al.*, 1988; Fitz-Díaz *et al.*, 2014). En la SMO, se encuentran las especies que polinizan a la fo. *tuerckheimii*.

Ambas polinizadoras de la fo. *tuerckheimii* en México tienen fechas estimadas de divergencia de sus respectivos linajes muy diferentes. El linaje de *P. sp. 3* (avispa negra) data de hace 17 – 14 Ma. Mientras que el origen del linaje de *P. sp. 6* (avispa amarilla) data de hace alrededor 14 –

7.5 Ma. Ante esta gran diferencia, se deduce que alguna de estas especies no codivergió a la par de su huésped. Por ello, se revisó la filogenia datada de *Ficus* de Cruaud et al. 2012, en la cual se incluye a *Ficus* fo. *tuerckheimii*, un ejemplar de Costa Rica. La edad media de surgimiento de este organismo, la estimaron de hace 10 Ma. Por lo que es más probable que sea la avispa amarilla (*P.* sp. 6) el polinizador que estuvo más cercano a la evolución de su huésped, y que *P.* sp. 3 especió en otra higuera mucho tiempo antes. Esto significaría que, en algún momento del pasado geológico, la avispa negra realizó un cambio de huésped y actualmente poliniza a *F. aurea* fo. *tuerckheimii* de México. Para probar de una manera más certera la coevolución o los eventos de cambio de huésped es necesario contar con la filogenia de las formas de *F. aurea*. Una vez obtenida, sería necesario realizar análisis de filogenética comparativa tales como reconciliación de árboles filogenéticos (por ejemplo, con el algoritmo EUCALYPT, Donati et al., 2015), pruebas de permutación robustas (por ejemplo, ParaFit, Legendre et al., 2002) mismas que ponen a prueba la hipótesis nula de que la evolución de los interactuantes ha sido independiente. O bien, utilizar filogenias robustas y análisis más complejos basados en modelos que tomen en cuenta procesos de origen de nuevos genes (duplicación y transferencia) y de pérdida de genes (por ejemplo, el modelo *DTL duplication, transfer and loss*, Szöllösi & Daubin 2012).

Por otra parte, la avispa *P.* sp. 4 de República Dominicana (RD) tiene una interpretación interesante. La isla La Española, en la que se encuentra RD es muy particular desde el punto de vista geológico ya que se compone de fragmentos o bloques de distintos orígenes. Algunos son muy antiguos y datan del periodo Cretácico, por lo que no es improbable que esta área se considerara ancestral para las especies estudiadas. Otros bloques de roca son muy recientes, del periodo Cuaternario, pues la isla continúa emergiendo como consecuencia de la subducción de la placa Norteamericana por debajo de la placa del Caribe (Calais et al., 2016; Cana-Ortiz et al., 2017). El fósil de *P. peritus* de República Dominicana con el cual se calibró la datación molecular, procede del ámbar de los alrededores de la Cordillera Septentrional, cuya orogénesis fue en el Mioceno, por lo que se calcula que el género *Pegoscapus* ya se encontraba ahí hace al menos 17.45 Ma (Machado et al., 2005). La geología en el Caribe es muy compleja, pero se acepta que las Antillas Mayores son más antiguas (del periodo Cretácico) y preceden al surgimiento de las Antillas Menores y el Istmo de Panamá (Santiago-Valentín & Olmstead, 2004; Fig.18 y 19). La composición florística actual en las Antillas Mayores muestra afinidad con grupos de plantas derivadas tanto de origen Laurásico y Gondwánico (Cana-Ortiz et al., 2018). De acuerdo con el análisis de reconstrucción de áreas ancestrales, el linaje de *P.* sp. 4 de República Dominicana surgió en esa región por vicarianza a partir de poblaciones en el continente, probablemente de la parte Norte (Florida).

Es probable que este polinizador en República Dominicana haya seguido un patrón de distribución de norte a sur, desde la Península de Florida y a través de Cuba, sin embargo, al carecer de muestras de estas localidades es difícil determinarlo. Además, *P.* sp. 4 no tiene relación cercana con las especies de avispas del sur (*P. obscurus*, *P. mariae*

y *P. carlosi*) de Costa Rica. Los puentes terrestres que podrían haber llevado a las avispas hacia el Caribe desde Sudamérica (arco volcánico de las Antillas Menores), surgieron en su mayoría durante el Plioceno y Pleistoceno (Robertson *et al.*, 2009), cuando por el registro fósil en ámbar se sabe que *Pegoscapus* ya estaba en la isla desde el Mioceno, además, en las Antillas Menores no hay registros de *F. aurea*.



**Fig. 19.** Ilustración del cierre paulatino del canal de Panamá y surgimiento de la actual Costa Rica, desde los últimos 20 Ma hasta concluir el puente terrestre hace alrededor de 3 Ma. Modificado de Robertson *et al.* (2009).

Dado que las especies de avispas más recientes son las de distribución más sureña (Costa Rica y Brasil), la evidencia obtenida en este estudio apoya parcialmente a la hipótesis biogeográfica de colonización de *Pegoscapus* de norte a sur expuesta por Cruaud *et al.*, (2012), en la que explica que el género *Pegoscapus* junto con la sección Americana de *Ficus*, colonizan América desde bosques boreales entre la actual Europa y Norteamérica desde hace 75 Ma. No obstante, los patrones que explican la distribución actual de *Pegoscapus* en Mesoamérica no son muy claros y parece que hubo fluctuaciones en la distribución, es decir, no se observa un patrón unidireccional hacia una región o zona geográfica. Esto es evidente en el análisis de reconstrucción de áreas ancestrales, en donde el linaje de *P. sp. 5* de la actual SMO se explica mediante un evento de dispersión iniciado hace alrededor de 12 - 7 Ma. La especie *P. sp. 7* polinizadora de la fo. *aurea* en los Tuxtlas, se origina por un evento vicariante, desde un ancestro común con *P. sp. 5*. Esto es plausible ya que coincide con el inicio de la formación de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) de la cual la región de los Tuxtlas forma parte (Ferrari *et al.*, 2011). La FVTM presentó eventos de vulcanismo desde el Mioceno hasta el Holoceno (Zamora-Camacho *et al.*, 2015).

Es posible que las oscilaciones entre periodos glaciales e interglaciares que comenzaron en el Plioceno y continuaron durante el Pleistoceno fueron las responsables de la distribución de especies de montaña como lo son las polinizadoras de la fo. *tuerckheimii* en bosques húmedos de altitud en Centroamérica. Esto coincide con la hipótesis de especiación de entomofauna en regiones montañosas que propuso Halffter (1987). Por lo que, las fluctuaciones climáticas durante el Plioceno-Pleistoceno favorecieron el origen de

distintos linajes en *Pegoscapus*, como ha ocurrido con otros grupos de animales como los reptiles (Streicher *et al.*, 2009), además de que el cierre del puente terrestre entre Norteamérica y Sudamérica se completó en el Plioceno (2.8 Ma de acuerdo con O' Dea *et al.*, 2016). Recientemente, se inició un debate acerca del origen de la formación del Istmo de Panamá, ya que algunos autores sostienen que el canal marítimo centroamericano se cerró hace 15-13 Ma durante el Mioceno medio (Montes *et al.*, 2016); sin embargo, aún no existe consenso científico y la hipótesis más aceptada es que, aunque en el Mioceno medio ya había algunos pequeños bloques de superficie terrestre en Centroamérica, el estrecho estaba incompleto y poco a poco dejaba de ser carácter marino y evolucionaba por el aporte sedimentario de ríos de los alrededores y la elevación del suelo marino por actividad volcánica (Buchs *et al.*, 2019) hasta completar el puente terrestre hace alrededor de 3 Ma. Los resultados de este trabajo apoyan la teoría de que Centroamérica se comenzó a cerrar en el Mioceno medio (ya que los linajes de *P. jimenezi*, *P. mariae*, *P. carlosi* y datan en promedio de hace 10.7 y 8.8 Ma.

Aunque es probable que un solo ejemplo biogeográfico de un grupo taxonómico, no sea representativo de los patrones exhibidos para diversos componentes bióticos de una región, el contrastar y comparar escenarios filogeográficos de linajes con distribución compartida, provee de evidencia más robusta para la identificación de los patrones biogeográficos y permite identificar hasta qué punto pueden ser válidos para otros taxones (Avice 2000; Hickerson *et al.*, 2006; Castoe *et al.*, 2009). En este sentido, el mutualismo entre avispas e higueras podría ser un modelo muy adecuado para elucidar un patrón biogeográfico para insectos y plantas en el Neotrópico. En particular conocer la filogeografía comparada entre *F. aurea* y sus polinizadores ayudaría a comprender mejor la historia biogeográfica de Centroamérica, Mesoamérica, la península de Florida y el Caribe, regiones extremadamente diversas y con alto grado de endemismos (Campbell 1999; Flores-Villela & Salazar 2009; Mata-Silva *et al.*, 2019).

## **V. Pérdida de la característica evolutiva de sacos polínicos en las coxa frontales**

Las especies *Pegoscapus carlosi* y *Pegoscapus mariae* de acuerdo con la datación molecular, especiaron a partir de linajes más recientes que las especies de *Pegoscapus* muestreadas en México. Por lo anterior, se asume que los sacos polínicos coxales son caracteres que pueden perderse evolutivamente. Es de notable interés científico que siendo la polinización activa un carácter etológico (que implica adaptaciones fenotípicas particulares) raro y complejo en las interacciones planta-insecto, sea un carácter que al mismo tiempo pueda perderse fácilmente una vez adquirido. El hecho de que haya aparecido evolutivamente tan sólo en cuatro géneros de familias distintas de plantas [(*Lophocereus* Engelm. (Cactaceae), *Glodichino/Phyllanthus* L. (Phyllantaceae), *Yucca* L. (Asparagaceae) y *Ficus* (Moraceae)] sugiere que la ganancia de esta adaptación es muy infrecuente evolutivamente, mientras que la pérdida podría ser común, al menos en el mutualismo avispas-higueras.

Esto podría tener implicaciones evolutivas importantes, por la siguiente razón. Un indicador del tipo de polinización (activa o pasiva) que tienen los higos, es la proporción de anteras/óvulos dentro de las inflorescencias. En higos con polinización pasiva, la proporción de anteras es mucho mayor que en higos con polinización activa y es una de las características que sugieren coevolución. Por lo que sería muy interesante evaluar la proporción anteras/óvulos en los higos de *F.aurea* fo. *tuerckheimii* en México y en Costa Rica ¿podría ser esto indicador de especiación de la fo. *tuerckheimii*?

Si se toma en cuenta que *F. aurea* fo. *tuerckheimii* de México y Costa Rica son una misma especie, significa que los cambios morfológicos que impliquen la pérdida o ganancia de sacos polínicos y posiblemente cambios etológicos en la recolecta de polen, pueden ocurrir en las avispas sin que ocurra especiación recíproca en *Ficus*. La adquisición de la conducta de polinización activa o el paso a polinización pasiva son eventos evolutivos que pueden ocurrir múltiples ocasiones en los agaónidos (Kjellberg *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2004). Un estudio por Cook *et al.*, (2004) también registró la pérdida del carácter de polinización activa entre géneros y dentro de un mismo género también (*Pleistodontes*), pero no dentro de una misma especie. El presente estudio provee evidencia que la adquisición de la conducta de polinización activa o el paso a polinización pasiva, son eventos evolutivos que pueden ocurrir en múltiples ocasiones tratándose de los agaónidos y refuta la hipótesis de que la polinización activa fue un evento que apareció por única vez dentro de un linaje.

## **V. Perspectivas para futuras investigaciones**

### *i. Descripción morfológica y determinación de las especies de Pegoscapus polinizadoras del complejo F. aurea*

Es necesario esclarecer la situación taxonómica de las avispas polinizadoras de *F. aurea*. Una vez identificadas como entidades genéticas distintas y en las que no existe flujo génico, es necesaria la descripción y determinación de las especies con ejemplares hembras y machos. Hasta el momento los dos estudios que se han realizado con avispas polinizadoras de higueras en México revelan información importante; sin embargo, muchos ejemplares de avispas permanecen sin identificar ni describir (Su *et al.*, 2008; Van Goor *et al.*, 2018) por lo que se dificulta la integración del conocimiento del tema en esta región.

### *ii. Integración de genes nucleares al análisis filogenético*

Aunque la precisión y eficiencia del uso de delimitación de especies por el código de barras genético de COI varía entre grupos taxonómicos, se ha demostrado que es muy eficiente para la clase Insecta y que los análisis filogenéticos con esta región proporcionan resultados robustos (Jiang *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2011; Herbert *et al.*, 2016). En particular se ha

reafirmado su precisión en algunos órdenes como en Hymenoptera y Orthoptera (Virgilio *et al.*, 2010). No obstante, existen factores que pueden causar confusión en los patrones de variación mitocondrial, como lo son la infección por *Wolbachia* ya que altera las rutas por las cuales la mitocondria se hereda a la descendencia (Smith *et al.*, 2012), o bien la condición haplodiploide de las avispas. La haplodiploidía implica que las hembras se desarrollan a partir de óvulos fertilizados (son diploides), mientras que a partir de óvulos no fecundados se desarrollan los machos (son haploides). Por lo anterior, es conveniente integrar al análisis realizado en este trabajo las secuencias de al menos un gen nuclear, como el gen ITS2 que se ha propuesto como código de barras nuclear (Yao *et al.*, 2010; Darwell *et al.*, 2014) o bien de otros genes como *Wingless* (*wg*), Factor de elongación 1-a (*EF1a*) y 28S ribosomal (*28S r*) que se han utilizado ampliamente en himenópteros apócritos para estudiar las relaciones evolutivas entre ellos (Ceccarelli *et al.*, 2012; Cruaud *et al.*, 2012; Castañeda-Osorio *et al.*, 2019). En particular, el análisis del gen 28S en insectos ha demostrado proveer mayor señal filogenética a niveles más profundos (Zhang & Sota 2007; Cruaud *et al.*, 2011b). Además, dada la rápida sustitución observada en COI en himenópteros, también se podría complementar el estudio añadiendo otro gen mitocondrial como Citocromo b (*Cyt b*) para mejorar la resolución filogenética con un análisis multigénico.

### *iii. Determinación de infección por Wolbachia*

Los himenópteros tienen tasas altas de evolución del ADN mitocondrial, por lo que es común encontrar niveles altos de divergencia de ADN mitocondrial en un nivel intraespecífico (Xiao *et al.*, 2012). Para complementar el entendimiento de los procesos de especiación en el complejo *Pegoscapus* que poliniza a *F. aurea*, sería necesario evaluar si las poblaciones estudiadas están infectadas por *Wolbachia*. En caso de que alguna población de *Pegoscapus* spp. hubiera estado infectada, se estaría subestimando la divergencia genética de COI observada dentro de algunos clados, y posiblemente sobreestimando la diversidad en los análisis de delimitación de especies. Esto es debido a que la variación genética es menor en las avispas infectadas con *Wolbachia*. Aunque se ha observado que la infección por este endosimbionte bacteriano puede causar partenogénesis, feminización, aborto de machos y sobre todo incompatibilidad citoplasmática (lo que implicaría una barrera precigótica y aislamiento de flujo génico dentro de una población) (Sakamoto *et al.*, 2018). Anteriormente se consideraba improbable que la infección pudiera causar especiación simpátrica (ya que se consideraba que las infecciones por esta bacteria no persisten por largos periodos relativos a los tiempos necesarios para la especiación; Shoemaker *et al.*, 2011). Sin embargo, se han detectado numerosas especies crípticas de agaónidos y otros insectos que divergen entre sí de manera correlacionada con la cepa de *Wolbachia* con la que están infectadas (Shoemaker & Jaenike 1999; Sun *et al.*, 2011; Correa & Ballard 2016).

*iv. Estudio de las implicaciones de la comunidad biológica dentro del higo (avispa no polinizadora y nematodos) en la evolución del mutualismo de polinización.*

Además de los polinizadores dentro del higo, existen múltiples interacciones con otras especies, entre ellas, avispas chalcidoideas parasitoides y cleptoparasitoides que se han propuesto con cierto grado de especificidad del *Ficus*. Adicionalmente, las avispas polinizadoras tienen nematodos asociados que se ha observado tienen efectos negativos en su eficacia biológica o adecuación al reducir la cantidad de huevos depositados (Van Goor *et al.*, 2018). Los análisis de redes ecológicas contribuyen al reconocimiento de patrones de generalización o especialización entre las especies, y permiten la detección de procesos subyacentes que estén promoviendo y dirigiendo la diversificación en comunidades simbióticas (Farache *et al.*, 2018).

*v. Estabilidad de las relaciones de polinización en *F. aurea* ante un escenario de cambio climático*

Los mutualismos son particularmente vulnerables al cambio climático ya que las especies interactuantes suelen responder de manera diferente, lo que puede desestabilizar las interacciones (Sutton *et al.*, 2018). Por lo que sería de gran interés el análisis de modelos de este sistema en un escenario de cambio climático, pues los *Ficus* son especies claves en los ecosistemas a los que pertenecen. Algunos de los estudios que se han realizado, indican que los insectos diminutos como los agaónidos sucumben rápidamente ante estrés por altas temperaturas fuera del higo (Al-Khalaf *et al.*, 2015). Un incremento de 3°C sobre una media de 29°C disminuye la media de vida de las avispas en un 33-60%, por lo que tienen menos tiempo para encontrar un sicono, ovoponer, y polinizar una flor receptiva (Jevanandam 2013). También se ha observado que la disminución de las lluvias en una región de Australia, ha tenido impactos negativos en la fructificación de *Ficus* al reducir considerablemente la producción de siconos (MacKay & Gross 2018) y en consecuencia disminuye la población de avispas, y de aves que se alimentan de los higos. Ante los cambios climáticos acelerados que se están presentando alrededor del planeta, surge una serie de preguntas de investigación que intenten predecir los efectos y mitigar la afectación de las poblaciones, (inclusive evitar la extinción) mediante esquemas de conservación efectivos. Para ello, son necesarios estudios a nivel local que busquen entender el fenómeno de polinización de los *Ficus* como un sistema complejo que incluya a otras relaciones, como la que se mantiene con los dispersores de semillas (aves principalmente), la fragmentación de hábitat o el efecto de la variación de temperatura y precipitación.

*vi. Ampliación del área de muestreo en Centroamérica*

Existen registros de algunas de las formas del complejo *F. aurea* en Florida, Cuba, Nicaragua, el Salvador, Guatemala y Panamá cuyas avispas no fueron colectadas para este estudio por razones de financiamiento. Sin embargo, existen zonas para las que no existen

registros como en Honduras, y probablemente sí existan ejemplares de *F. aurea* y sus avispa polinizadoras que puedan aportar más información para esclarecer las historias evolutivas de estos taxones.

## Conclusiones

- a. Los resultados demuestran la existencia de al menos nueve linajes distintos de polinizadores asociados a las formas de *F. aurea*. En ellos se encuentran cuando menos diez especies provisionales distintas de *Pegoscapus*, es decir, cinco más de las hasta ahora reconocidas. Lo anterior refuta la hipótesis de especificidad filogenética uno a uno, inclusive para cada forma de *F. aurea* propuesta por Berg (2007).
- b. Se reconocen con altos valores de probabilidad posterior (P) las relaciones filogenéticas entre las avispas polinizadoras de *F. aurea* fo. *aurea* y fo. *tuerckheimii* en Costa Rica, así como los polinizadores de la fo. *isophlebia* en México. Sin embargo, es necesario complementar el estudio con un mayor número de muestra de avispas y con la inclusión de al menos un marcador nuclear para elucidar con mayores valores de P las relaciones entre los polinizadores de *F. aurea* en la zona central de México y el Caribe.
- c. La especificidad ecológica por región geográfica entre los clados de *Pegoscapus* y las formas de *F. aurea* es prácticamente uno a uno, ya que no se encontraron avispas de linajes genéticos distintos polinizando a los morfotipos en localidades distantes. Es decir, casi para cada morfotipo en cada localidad (8 de 10) se le asocia un linaje genético de avispa distinto.
- d. Se propone la existencia de especies crípticas con base en las divergencias genéticas en una región del código de barras (gen COI). Estas distancias intraclado oscilan entre el 0.4 y el 10%, siendo estos: *P. jimenezi* (4 – 10%); *P. sp. 2* (3 – 8.9%) y *P. sp. 6* (0.4 – 7.6%). Para confirmar la hipótesis se recomienda ampliar la muestra particularmente de estos grupos.
- e. Se establece que las avispas polinizadoras de *F. aurea* fo. *tuerckheimii* para México son distintas que las que polinizan la misma forma en Costa Rica. Pues aunque son morfológicamente conservadas entre sí (presentan convergencias morfológicas en tamaño y patrón de coloración) la evidencia genética y morfológica a nivel de microscopía electrónica confirma que se tratan de especies distintas: *P. mariae* ≠ *P. sp. 6*; y *P. carlosi* ≠ *P. sp. 3*.
- f. El periodo de diversificación de los linajes actuales de *Pegoscapus* ocurrió durante el Mioceno medio-tardío. Esta radiación se vio favorecida por las condiciones climáticas que prevalecieron durante el Mioceno, las cuales incluyeron temperaturas cálidas y altos índices de humedad. A su vez, el análisis de

reconstrucción de áreas ancestrales sugiere que la divergencia de los linajes fue consecuencia de cinco eventos vicariantes y cuatro eventos de dispersión.

- g. Se infiere un cambio de huésped realizado por *P. sp. 3* a partir de otra planta (*Ficus*) más antigua que *F. aurea* fo. *tuerckheimii*. Esto se infiere a partir de la filogenia datada de *Ficus* realizada por Cruaud *et al.*, (2012). Es necesario contar con la filogenia y estimaciones de los tiempos de divergencia del complejo *F. aurea* para poder comprobar esta inferencia.
- h. Al tratarse *Pegoscapus mariae* y *Pegoscapus carlosi* de especies provenientes de linajes más recientes que el resto de las avispas *Pegoscapus* estudiadas, se asume que la característica de presencia de sacos polínicos en las coxa frontales es un carácter que se puede perder evolutivamente, sin que exista la especiación del huésped, en este caso *F. aurea* fo. *tuerckheimii*.
- i. Los resultados no se acoplan a la hipótesis biogeográfica de colonización de *Ficus* de sur a norte explicada por Pederneiras *et al.*, (2018) y parecen ser parcialmente más congruentes con la hipótesis de Cruaud *et al.*, (2012) de norte a sur. No obstante, los patrones no son claros en Mesoamérica, por lo que los eventos de diversificación observados en los polinizadores del complejo de especies *F. aurea* pueden deberse a procesos paleoclimáticos de distinta magnitud ocurridos desde el Mioceno, tales como glaciaciones o cambios fisiográficos puntuales. Principalmente el surgimiento de la Sierra Madre Oriental, la orogénesis de la Sierra de Chiapas y la formación del Istmo de Panamá.
- j. Este estudio representa el muestreo más extenso de las avispas del género *Pegoscapus* para el complejo de especies *F. aurea*, y es el segundo realizado en México con avispas polinizadoras de higueras, siendo pionero el trabajo de Su *et al.*, (2008). Como este trabajo ha demostrado, existen múltiples incógnitas que aún quedan por resolver en cuanto al mutualismo entre avispas polinizadoras y sus huéspedes, los árboles tropicales del género *Ficus*. También plantea la necesidad de aceptar la complejidad de la interacción e integrar estudios a nivel de comunidades, que tomen en cuenta el papel de las avispas no polinizadoras, los nematodos y las bacterias que se asocian en este complejo microhábitat.

## Literatura citada

- Aguayo-Camargo, J. E., & Cordova, S. M. (1987). Origen y evolución de los rasgos morfoestructurales postcretácicos de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 15-39.
- Al Khalaf, A., Quinnell, R. J., & Compton, S. G. (2015). Influence of temperature on the reproductive success of a fig wasp and its host plant.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 489-522.
- Avise, J.C. (2000). Phylogeography: The history and formation of species. *Harvard University Press*. London. ISBN 0-674-66638-0
- Azuma, H., Harrison, R. D., Nakamura, K., & Su, Z. H. (2010). Molecular phylogenies of figs and fig-pollinating wasps in the Ryukyu and Bonin (Ogasawara) islands, Japan. *Genes & genetic systems*, 85(3), 177-192.
- Baker, H. G., & Hurd Jr, P. D. (1968). Intrafloral ecology. *Annual review of entomology*, 13(1), 385-414.
- Basset, Y., & Lamarre, G. P. (2019). Toward a world that values insects. *Science*, 364 (6447), 1230-1231.
- Berg, C. C., & Villavicencio, X. (2004). *Taxonomic studies on Ficus (Moraceae) in the West Indies, extra-Amazonian Brazil, and Bolivia*. Universitetet i Bergen.
- Berg, C. C., Corner, E. J. H., & Nooteboom, H. P. (2005). *Flora Malesiana. Series I, Seed plants. Volume 17, Part 2: Moraceae (Ficus)*. Nationaal Herbarium Nederland.
- Berg, C.C. (1989). Classification and distribution of Ficus. *Experientia* 45:605-611
- Berg, C.C. (2007). Proposals for treating four species complexes in Ficus subgenus Urostigma section Americaneae (Moraceae). *Blumea* 52:295-312
- Berg, C.C. & Wiebes, J. T. (1992). African fig trees and fig wasps. (*North-Holland, Amsterdam*)
- Boucek, Z. (1993). The genera of chalcidoid wasps from Ficus fruit in the New World. *J. Nat.Hist.* 27(1): 173-217
- Boucher, D.H.; James, S., Keeler, K.H. (1982). The ecology of mutualism. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13: 315-47
- Bowler D.E. & Benton T.G. (2005). Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. *Biol. Rev.* 80:205-25.
- Buchs, D. M., Irving, D., Coombs, H., Miranda, R., Wang, J., Coronado, M. & Portugal, E. (2019). Volcanic contribution to emergence of Central Panama in the Early Miocene. *Scientific reports*, 9(1), 1417.
- Calais, É., Smithe, S., de Lépinay, B. M., & Prépetit, C. (2016). Plate boundary segmentation in the northeastern Caribbean from geodetic measurements and Neogene geological observations. *Comptes Rendus Geoscience*, 348(1), 42-51.
- Campbell, J. A. (1999). Distribution patterns of amphibians in Middle America. *Patterns of distribution of amphibians: a global perspective*, 111-210.
- Cano Ortiz, A., Musarella, C. M., Piñar Fuentes, J. C., Bartolomé Esteban, C., Quinto-Canas, R., Pinto Gomes, C. J., ... & Cano, E. (2018). Advances in the Knowledge of the Vegetation of Hispaniola (Caribbean Central America). *Vegetation. London: IntechOpen*, 83-99.

- Cano-Ortiz, A., Musarella, C. M., & Carmona, E. C. (2017). Biogeographical Areas of Hispaniola (Dominican Republic, Republic of Haiti). *Plant Ecology: Traditional Approaches to Recent Trends*, 165.
- Castañeda-Osorio, R., Belokobylskij, S. A., Braet, Y., & Zaldívar-Riverón, A. (2019). Systematics and evolution of the parasitoid wasp genera of the tribe Holcobraconini (Hymenoptera: Braconidae: Doryctinae). *Organisms Diversity & Evolution*, 1-14.
- Castoe, T. A., de Koning, A. J., Kim, H. M., Gu, W., Noonan, B. P., Naylor, G., ... & Pollock, D. D. (2009). Evidence for an ancient adaptive episode of convergent molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(22), 8986-8991.
- Castresana, J., Lubben, M., Saraste, M., Higgins, D.G. (1994). Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *The EMBO Journal*. 13(11): 2516-2525
- Ceccarelli, F. S., & Zaldívar-Riverón, A. (2013). Broad polyphyly and historical biogeography of the neotropical wasp genus *Notiospathius* (Braconidae: Doryctinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(1), 142-152.
- Ceccarelli, F. S., Sharkey, M. J., & Zaldívar-Riverón, A. (2012). Species identification in the taxonomically neglected, highly diverse, neotropical parasitoid wasp genus *Notiospathius* (Braconidae: Doryctinae) based on an integrative molecular and morphological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 485-495.
- Coeur d'Acier, A., Cruaud, A., Artige, E., Genson, G., Clamens, A.-L., Pierre, E., Hudaverdian, A., Simon, J.-C., Jousset, E. & Rasplus, J.-Y. (2014). DNA barcoding and the associated PhylAphidBase website for the identification of European Aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae). *Plos One*, 9, e97620.
- Compton, S. G., Grehan, K., & Van Noort, S. (2009). A fig crop pollinated by three or more species of agaonid fig wasps. *African Entomology*, 17(2), 215-223.
- Conchou, L., Cabioch, L., Rodriguez, L. J., & Kjellberg, F. (2014). Daily rhythm of mutualistic pollinator activity and scent emission in *Ficus septica*: ecological differentiation between co-occurring pollinators and potential consequences for chemical communication and facilitation of host speciation. *PLoS One*, 9(8), e103581.
- Cook, J. M., & Rasplus, J. Y. (2003). Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5), 241-248.
- Cook, J. M., & Segar, S. T. (2010). Speciation in fig wasps. *Ecological Entomology*, 35, 54-66.
- Cook, J. M., Bean, D., Power, S. A., & Dixon, D. J. (2004). Evolution of a complex coevolved trait: active pollination in a genus of fig wasps. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(2), 238-246.
- Cook, J.M., Bean, D., Power, S.A., Dixon, D.J. (2004). Evolution of a complex coevolved trait: active pollination in a genus of fig wasps. *J. Evol. Biol.* 17: 238-246
- Corner, E.J.H. (1952). Wayside trees of Malaya. *Singapore: Gov. Print*
- Correa, C. C., & Ballard, J. W. O. (2016). Wolbachia associations with insects: winning or losing against a master manipulator. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3, 153.
- Cruaud, A., Cook, J., Da-Rong, Y., Genson, G., Jabbour-Zahab, R., Kjellberg, F., & Ubaidillah, R. (2011). Fig-fig wasp mutualism: the fall of the strict cospeciation paradigm. *Evolution of plant-pollinator interactions*. Cambridge University Press, London, UK, 68-102.
- Cruaud, A., Ronsted, N., Chantarasuwan, B., Siang-Chou, L., Clement, W.L., Couloux, A., Cousins, B., Genson, G., Harrison, R.D., Hanson, P.E., Hossaert-Mckey, M., Jabbour-

- Zahab, R., Jouselin, E., Kerdelhué, C., Kjellberg, F., Lopez-Vaamonde, C., Peebles, J., Qiong-Peng, Y., Santinelo-Pereira, R.A., Schramm, T., Ubaidillah, R., Van Noort, S., Weiblen, G.D., Rong-Yang, D., Yodpinyanee, A., Libeskind-Hadas, R., Cook, J.M., Rasplus, J.Y., Savolainen, V. (2012). An extreme case of plant-insect codiversification: figs and fig-pollinating wasps. *Syst. Biol.* 61(6): 1029-1047
- Darwell, C. T., & Cook, J. M. (2017). Cryptic diversity in a fig wasp community—morphologically differentiated species are sympatric but cryptic species are parapatric. *Molecular ecology*, 26(3), 937-950.
- Darwell, C. T., Al-Beidh, S., & Cook, J. M. (2014). Molecular species delimitation of a symbiotic fig-pollinating wasp species complex reveals extreme deviation from reciprocal partner specificity. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 189.
- Davis, C. C., Schaefer, H., Xi, Z., Baum, D. A., Donoghue, M. J., & Harmon, L. J. (2014). Long-term morphological stasis maintained by a plant–pollinator mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), 5914-5919.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* 56(6): 879-886
- Dickinson, W. R., Klute, M. A., Hayes, M. J., Janecke, S. U., Lundin, E. R., McKittrick, M. A., & Olivares, M. D. (1988). Paleogeographic and paleotectonic setting of Laramide sedimentary basins in the central Rocky Mountain region. *Geological Society of America Bulletin*, 100(7), 1023-1039.
- Donati, B., Baudet, C., Sinaireri, B., Crescenzi, P., & Sagot, M. F. (2015). EUCALYPT: efficient tree reconciliation enumerator. *Algorithms for Molecular Biology*, 10(1), 3.
- Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (1965). Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 18(4), 586-608.
- Espinosa, D., Ocegueda, S. (2008). El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural. En: Capital natural de México vol.1: Conocimiento actual de la biodiversidad. *CONABIO*. Cap.1:33-65
- Faegri, K., & Van Der Pijl, L. (2013). *Principles of pollination ecology*. Elsevier.
- Farache, F. H. A., Cruaud, A., Rasplus, J. Y., Cerezini, M. T., Rattis, L., Kjellberg, F., Pereira, R. A. S. (2018). Insights into the structure of plant-insect communities: specialism and generalism in a regional set of non-pollinating fig wasp communities. *Acta Oecologica*, 90, 49-59.
- Fenster, C. B., Armbruster, W. S., Wilson, P., Dudash, M. R., & Thomson, J. D. (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 35, 375-403.
- Ferrari, L., Orozco-Esquivel, T., Manea, V., & Manea, M. (2012). The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone. *Tectonophysics*, 522, 122-149.
- Ferrusquía-Villafranca, I. (1990). Carta de Regionalización Biogeográfica. Provincias Bióticas (con Enfoque en Criterios Morfotectónicos)(IV. 8.10). 1: 4,000,000. Atlas Nacional de México. *Univ. Nal. Aut. Mex.*, Inst. Geog., México.
- Fitz-Diaz, E., Hudleston, P., Tolson, G., & Van Der Pluijm, B. (2014). Progressive, episodic deformation in the Mexican Fold–Thrust Belt (central Mexico): evidence from isotopic dating of folds and faults. *International Geology Review*, 56(6), 734-755.
- Flores-Villela, O., & Martínez-Salazar, E. A. (2009). Historical explanation of the origin of the herpetofauna of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80(3), 817-833.

- Futuyma, D. J., & Agrawal, A. A. (2009). Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(43), 18054-18061.
- Galil, J., Eisikowitch, D. (1968). On the pollination ecology of *Ficus sycomorus* in East Africa. *J. Ecol.* 49(2): 259-269
- Haine, E.R., Martin, J., Cook, J.M. (2006). Deep mtDNA divergences indicate cryptic species in a fig-pollinating wasp. *BMC Evol. Biol.* 6:83
- Halffter, G. (1987). Biogeography of the montane entomofauna of Mexico and Central America. *Annual review of entomology*, 32(1), 95-114.
- Harmon, R. S. (2005). Geological development of Panama. In *The Rio Chagres, Panama* (pp. 45-62). Springer, Dordrecht.
- Harrison, R.D. (2003). Fig wasp dispersal and the stability of a keystone plant resource in Borneo. *Proc. R. Soc. Lond.* 270: S76-S79
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., Zakharov, E. V., Telfer, A. C., Levesque-Beaudin, V., Milton, M. A., ... & deWaard, J. R. (2016). Counting animal species with DNA barcodes: Canadian insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1702), 20150333.
- Hernández-Esquível, K.B., Piedra-Malagón, E., Cornejo-Tenorio, G., González-Rodríguez, A., Mendoza-Cuenca, L., Ruiz-Sánchez, E., Ibarra-Manríquez, G. (en revisión). Unraveling the extreme morphological variation in the neotropical *Ficus aurea* complex (subg. *Spherosuke*, sect. *Americanae*, Moraceae). *Journal of Systematics and Evolution*.
- Herre, E.A., Jandér, K.C., Machado, C.A. (2008). Evolutionary ecology of figs and their associates: recent progress and outstanding puzzles. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 39:439-58
- Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavender-Bares, J., Crandall, K. A., Graham, C. H., Johnson, J. B., ... & Yoder, A. D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after. *Molecular phylogenetics and evolution*, 54(1), 291-301.
- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F., Yoder, A.D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol. Phyl. and Evol.* 54: 291-301
- Hossaert-Mckey, M., Gibernau, M. & Frey, J.E. 1994. Chemosensory attraction of fig wasps to substances produced by receptive figs. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 70:185-191.
- Hossaert-McKey, M., Proffit, M., Soler, C. C. L., Chen, C., Bessière, J. M., Schatz, B., & Borges, R. M. (2016). How to be a dioecious fig: chemical mimicry between sexes matters only when both sexes flower synchronously. *Scientific reports*, 6, 21236.
- Ibarra-Manríquez, G., Cornejo-Tenorio, G., González-Castañeda, N., Piedra-Malagón, E. M., & Luna, A. (2012). El género *Ficus* L.(Moraceae) en México. *Botanical Sciences*, 90(4), 389-452.
- Jackson, A.P., Machado, C.A., Robbins, N., Allen-Herre, E. 2008. Multi-locus phylogenetic analysis of neotropical figs does not support co.speciation with the pollinators: The importance of systematic scale in fig/wasp cophylogenetic studies. *Symbiosis* 45:1-16
- Janzen, D.H. 1979. How to be a fig. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10: 13-51
- Janzen, D.H. 1980. When is it coevolution?. *Evolution* 34(3): 611-612
- Jermey, T. (1993). Evolution of insect-plant relationships-a devil's advocate approach. *Entomologia experimentalis et applicata*, 66(1), 3-12.

- Jevanandam, N., Goh, A. G., & Corlett, R. T. (2013). Climate warming and the potential extinction of fig wasps, the obligate pollinators of figs. *Biology letters*, 9(3), 20130041.
- Jiang, Z. F., Huang, D. W., Zhu, C. D., & Zhen, W. Q. (2006). New insights into the phylogeny of fig pollinators using Bayesian analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(2), 306-315.
- Jousselin, E. & Kjellberg, Finn. 2001. The functional implications of active and passive pollination in dioecious figs. *Ecology Letters* 4(2):151-158
- Jousselin, E., & Elias, M. (2019). Testing host-plant driven speciation in phytophagous insects: a phylogenetic perspective.
- Jung, S., Duwal, R. K., & Lee, S. (2011). COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 266-270.
- Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., & Flouri, T. (2017). Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, 33(11), 1630-1638.
- Kato, M., Takimura, A., & Kawakita, A. (2003). An obligate pollination mutualism and reciprocal diversification in the tree genus *Glochidion* (Euphorbiaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5264-5267.
- Kerdelhué, C., Hochberg, M. E., & Rasplus, J. Y. (1997). Active pollination of *Ficus sur* by two sympatric fig wasp species in West Africa. *Biotropica*, 29(1), 69-75.
- Kiester, A. R., Lande, R., & Schemske, D. W. (1984). Models of coevolution and speciation in plants and their pollinators. *The American Naturalist*, 124(2), 220-243.
- Kjellberg, F., Jousselin, E., Bronstein, J. L., Patel, A., Yokoyama, J., & Rasplus, J. Y. (2001). Pollination mode in fig wasps: the predictive power of correlated traits. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1472), 1113-1121.
- Knorr, G., Butzin, M., Micheels, A., & Lohmann, G. (2011). A warm Miocene climate at low atmospheric CO<sub>2</sub> levels. *Geophysical Research Letters*, 38(20).
- Kozak, K. H. (2017). What drives variation in plethodontid salamander species richness over space and time?. *Herpetologica*, 73(3), 220-228.
- Kreft, H., & Jetz, W. (2007). Global patterns and determinants of vascular plant diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(14), 5925-5930.
- Leather, S. R. (2017). “Ecological Armageddon”-more evidence for the drastic decline in insect numbers. *Annals of Applied Biology*, 172(1), 1-3.
- Leese, F. & Held, C. 2011. Analyzing intraspecific genetic variation: a practical guide using mitochondrial DNA and microsatellites. In book: *Phylogeography and Population Genetics in Crustacea*. Chap.1. *Taylor and Francis*. pp. 3-30
- Legendre, P., Desdevises, Y., & Bazin, E. (2002). A statistical test for host-parasite coevolution. *Systematic biology*, 51(2), 217-234.
- Lengyel, S., Gove, A. D., Latimer, A. M., Majer, J. D., & Dunn, R. R. (2009). Ants sow the seeds of global diversification in flowering plants. *PLoS One*, 4(5), e5480.
- Lohse, K., & Ross, L. (2015). What haplodiploids can teach us about hybridization and speciation. *Molecular ecology*, 24(20), 5075-5077.
- Machado, A. F. P., Rønsted, N., Bruun-Lund, S., Pereira, R. A. S., & de Queiroz, L. P. (2018). Atlantic forests to the all Americas: Biogeographical history and divergence times of Neotropical *Ficus* (Moraceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 122, 46-58.

- Machado, C. A., Jouselin, E., Kjellberg, F., Compton, S. G., & Herre, E. A. (2001). Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1468), 685-694.
- Machado, C.A., Allen, E., McCafferty, S., Bermingham, E. 1996. Molecular phylogenies of fig pollinating wasps and the implication for the origin and evolution of the fig-fig wasp mutualism. *J. of Biogeogr.* 23(4): 531-542
- Machado, C.A., Robbins, N., Gilbert, M.T.P., Allen, E. (2005). Critical review of host specificity and its coevolutionary implications in the fig/fig-wasp mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci* 102(1): 6558-6565
- Mackay, K. D., & Gross, C. L. (2019, April). Climate Change Threatens a Fig-Frugivore Mutualism at its Drier, Western Range Margin. In *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* (Vol. 141).
- Mackay, K. D., Gross, C. L., & Rossetto, M. (2018). Small populations of fig trees offer a keystone food resource and conservation benefits for declining insectivorous birds. *Global ecology and conservation*, 14.
- Mata-Silva, V., DeSantis, D. L., Garcia-Padilla, E., Johnson, J. D., & Wilson, L. D. (2019). The endemic herpetofauna of Central America: a casualty of anthropocentrism. *Amphibian & Reptile Conservation*, 13(1), 1-64.
- McKey, D. (1989). Population biology of figs: applications for conservation. *Experientia*, 45(7), 661-673.
- Mitchell, R. J., Irwin, R. E., Flanagan, R. J., & Karron, J. D. (2009). Ecology and evolution of plant–pollinator interactions. *Annals of botany*, 103(9), 1355-1363.
- Moe, A. M., & Weiblen, G. D. (2010). Molecular divergence in allopatric Ceratosolen (Agaonidae) pollinators of geographically widespread *Ficus* (Moraceae) species. *Annals of the Entomological Society of America*, 103(6), 1025-1037.
- Molbo, D., Machado, C. A., Sevenster, J. G., Keller, L., & Herre, E. A. (2003). Cryptic species of fig-pollinating wasps: implications for the evolution of the fig–wasp mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 5867-5872.
- Montes, C., Cardona, A., Jaramillo, C., Pardo, A., Silva, J. C., Valencia, V. & Niño, H. (2015). Middle Miocene closure of the Central American seaway. *Science*, 348(6231), 226-229
- Neeman, G. & Galil, J. (1978). Seed set in the ‘male syconia’ of the common fig *Ficus carica* L. (Caprificus). *New Phytol.* 81(2): 375-380
- Nylander, J.A.A., Olsson, U., Alström, P., Sanmartín, I., 2008. Accounting for phylogenetic uncertainty in biogeography: a Bayesian approach to Dispersal-vicariance Analysis of the thrushes (Aves: Turdus). *Systematic Biology* 57, 257– 268
- Nyman, T., Vikberg, V., Smith, D. R., & Boevé, J. L. (2010). How common is ecological speciation in plant-feeding insects? A Higher Nematinae perspective. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 266.
- O’Dea, A., Lessios, H. A., Coates, A. G., Eytan, R. I., Restrepo-Moreno, S. A., Cione, A. L., ... & Stallard, R. F. (2016). Formation of the Isthmus of Panama. *Science advances*, 2(8), e1600883.
- Ollerton, J., Alarcón, R., Waser, N. M., Price, M. V., Watts, S., Cranmer, L., & Rotenberry, J. (2009). A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of botany*, 103(9), 1471-1480.

- Page, R.D.M., Clayton, D.H., Paterson, A.M. (1996). Lice and cospeciation: a response to Barker. *Int. J. Parasitol.* 26: 213-218
- Pederneiras, L. C., Gaglioti, A. L., Romaniuc-Neto, S., & Mansano, V. D. F. (2018). The role of biogeographical barriers and bridges in determining divergent lineages in *Ficus* (Moraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 187(4), 594-613.
- Pemberton, C. E. (1921). The fig wasp in its relation to the development of fertile seed in the Moreton Bay fig. Hawaii. *Plant. Rec.*, 24, 297-319.
- Percy, D.M., Page, R.D.M., Cronk, Q.C.B. (2004). Plant-insect interactions: double-dating associated insect and plant lineages reveals asynchronous radiations. *Syst. Biol.* 53, 120-127
- Proffit, M., & Johnson, S. D. (2009). Specificity of the signal emitted by figs to attract their pollinating wasps: comparison of volatile organic compounds emitted by receptive syconia of *Ficus sur* and *F. sycomorus* in Southern Africa. *South African Journal of Botany*, 75(4), 771-777.
- Proffit, M., Chen, C., Soler, C., Bessière, J. M., Schatz, B., & Hossaert-McKey, M. (2009). Can chemical signals, responsible for mutualistic partner encounter, promote the specific exploitation of nursery pollination mutualisms?—The case of figs and fig wasps. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131(1), 46-57.
- Raguso, R. A. (2008). Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 39, 549-569.
- Ramírez-B. W. 1970. Host specificity of fig wasp (Agaonidae). *Evolution* 24:680-691.
- Ramírez-Benavides, W. (2016). A living fossil *Tetrapus* fig wasp (Hymenoptera: Agaoninae) developing in extant Neotropical fig species (Moraceae: *Ficus*, section *Pharmacosycea*). *Revista de Biología tropical*, 64(4), 1721-1735.
- Ramos, S. E., & Schiestl, F. P. (2019). Rapid plant evolution driven by the interaction of pollination and herbivory. *Science*, 364(6436), 193-196.
- Rasplus, J.Y. & Cruaud, A. (2016). How to collect, prepare and sequence figs and fig wasps. *INRA-CBGP*
- Renoult, J.P., Kjellberg, F., Grout, C., Santoni, S., Khadari, B. (2009). Cyto-nuclear discordance in the phylogeny of *Ficus* section *Galoglychia* and host shifts in plant-pollinator associations. *BMC Evol. Biol.* 9:248
- Robertson, D. R., Christy, J. H., Collin, R., Cooke, R. G., D'Croz, L., Kaufmann, K. W. & Torchin, M. E. (2009). The Smithsonian Tropical Research Institute: marine research, education, and conservation in Panama. *Smithsonian Contributions to the Marine Sciences*.
- Rodriguez, P. A., Escudero-Martinez, C., & Bos, J. I. (2017). An aphid effector targets trafficking protein VPS52 in a host-specific manner to promote virulence. *Plant physiology*, 173(3), 1892-1903.
- Ronsted, N., Weiblen, G.D., Cook, J.M, Salamin, N., Machado, C.A., Savolainen, V. (2005). 60 million years of co-divergence in the fig-wasp symbiosis. *Proc. Biol. Sci.* 272(1581): 2593-2599
- Rosas-Guerrero, V., Aguilar, R., Martén-Rodríguez, S., Ashworth, L., Lopezaraiza-Mikel, M., Bastida, J. M., & Quesada, M. (2014). A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators?. *Ecology letters*, 17(3), 388-400.
- Rundle, H. D., & Nosil, P. (2005). Ecological speciation. *Ecology letters*, 8(3), 336-352.

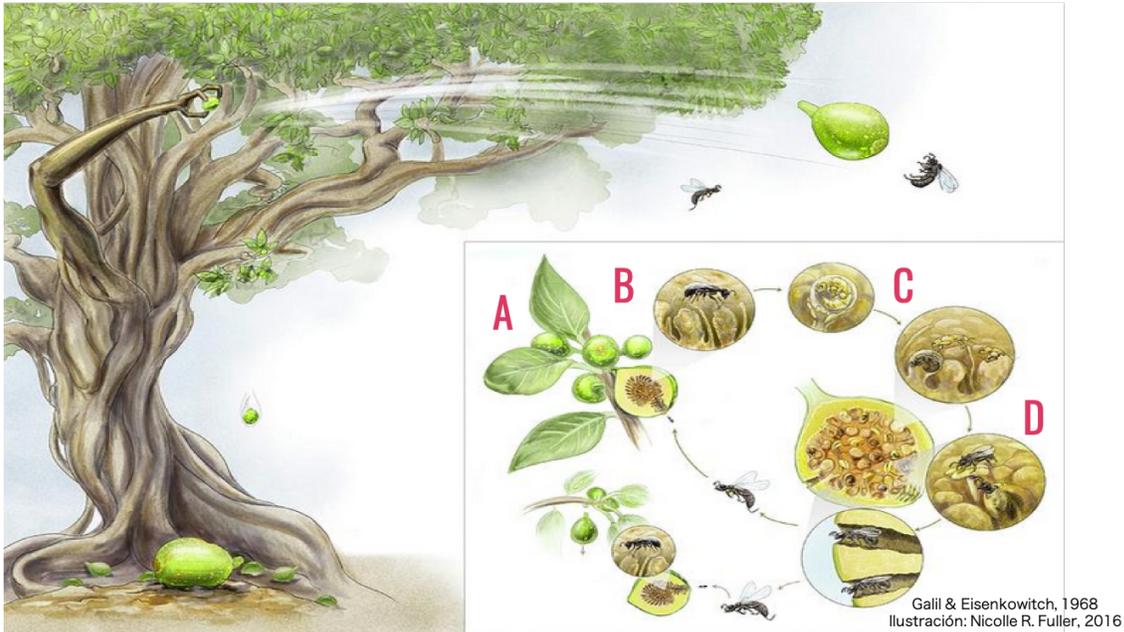
- Sakamoto, H., Suzuki, R., Nishizawa, N., Matsuda, T., & Gotoh, T. (2018). Effects of Wolbachia/Cardinium Infection on the Mitochondrial Phylogeny of Oligonychus castaneae (Acari: Tetranychidae). *Journal of economic entomology*, 112(2), 883-893.
- Santiago-Valentin, E., & Olmstead, R. G. (2004). Historical biogeography of Caribbean plants: introduction to current knowledge and possibilities from a phylogenetic perspective. *Taxon*, 53(2), 299-319.
- Sasakawa, K., & Kon, Y. (2018). Learning-induced host preference in male parasitoid wasps as a potential driver of ecological speciation. *Journal of evolutionary biology*, 31(11), 1750-1755.
- Satler, J. D., Herre, E. A., Jandér, K. C., Eaton, D. A., Machado, C. A., Heath, T. A., & Nason, J. D. (2018). Inferring Processes of Coevolutionary Diversification in a Community of Panamanian Strangler Figs and Associated Pollinating Wasps. bioRxiv.
- Schiffler, G. (2002). Fig wasps (Hymenoptera: Agaonidae) associated to *Ficus mexiae* Standl (Moraceae) in Lavras, Minas Gerais, Brazil. *J. Neotrop. Entomol.* 31(4): 653-655
- Sheppard, C. A., & Oliver, R. A. (2004). Yucca Moths and Yucca Plants: Discovery of “the Most Wonderful Case of Fertilisation”. *American Entomologist*, 50(1), 32-46.
- Shoemaker, D. D., Katju, V., & Jaenike, J. (1999). Wolbachia and the evolution of reproductive isolation between *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria*. *Evolution*, 53(4), 1157-1164.
- Slater, B. J. (2014). Fossil Focus: Arthropod–plant interactions. *Palaeontology Online*, 4, 1-17.
- Smith, M. A., Bertrand, C., Crosby, K., Eveleigh, E. S., Fernandez-Triana, J., Fisher, B. L., & Hreck, J. (2012). Wolbachia and DNA barcoding insects: patterns, potential, and problems. *PloS one*, 7(5), e36514.
- Stork, N. E. (2018). How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth?. *Annual review of entomology*, 63, 31-45.
- Streicher, J. W., Crawford, A. J., & Edwards, C. W. (2009). Multilocus molecular phylogenetic analysis of the montane Craugastor podiciferus species complex (Anura: Craugastoridae) in Isthmian Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(3), 620-630.
- Su, Z. H., Iino, H., Nakamura, K., Serrato, A., Oyama, K. (2008). Breakdown of the one-to-one rule in Mexican fig-wasp associations inferred by molecular phylogenetic analysis. *Symbiosis* 45: 73-81
- Sun, X. J., Xiao, J. H., Cook, J. M., Feng, G., & Huang, D. W. (2011). Comparisons of host mitochondrial, nuclear and endosymbiont bacterial genes reveal cryptic fig wasp species and the effects of Wolbachia on host mtDNA evolution and diversity. *BMC evolutionary biology*, 11(1), 86.
- Sutton, T. L., DeGabriel, J. L., Riegler, M., & Cook, J. M. (2018). A temperate pollinator with high thermal tolerance is still susceptible to heat events predicted under future climate change. *Ecological entomology*, 43(4), 506-512.
- Szöllösi, G. J., & Daubin, V. (2012). Modeling gene family evolution and reconciling phylogenetic discord. In *Evolutionary genomics* (pp. 29-51). Humana Press.
- Tarachai, Y., Compton, G.C., Trisonthi, C. (2008). The benefits of pollination for a fig wasp. *Symbiosis* 45: 29-32
- Thomé, O.W. (1885). Flora von Deutschland, Osterreich un der Schweiz. Gera, Germany. Visitado el 15 de Octubre del 2018 <http://biolib.mpipz.mpg.de/thome/index.html>

- Thompson, J.N. (2005). The geographic mosaic of coevolution. *The University of Chicago Press*. USA. ISBN 0-226-79762-7
- Thomson, J. D., Herre, E. A., Hamrick, J. L., & Stone, J. L. (1991). Genetic mosaics in strangler fig trees: implications for tropical conservation. *Science*, 254(5035), 1214-1216.
- Tiffney, B.H. (1985). The Eocene North Atlantic land bridge: its importance in tertiary and modern phytogeography of the northern hemisphere. *Journal of the Arnold Arboretum*. 66:243-273.
- Timberlake, PH. 1921. Notes on the Hawaiian Bees of the Genus *Megachile* (Hymenoptera). *Proc Hawaiian Entomol Soc* 04(03): 551-557.
- Van Goor, J., Piatscheck, F., Houston, D. D., & Nason, J. D. (2018). Figs, pollinators, and parasites: a longitudinal study of the effects of nematode infection on fig wasp fitness. *Acta Oecologica*, 90, 140-150.
- Virgilio, M., Backeljau, T., Nevado, B., & De Meyer, M. (2010). Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC bioinformatics*, 11(1), 206.
- Wachi, N., Kusumi, J., Tzeng, H. Y., & Su, Z. H. (2016). Genome-wide sequence data suggest the possibility of pollinator sharing by host shift in dioecious figs (Moraceae, *Ficus*). *Molecular ecology*, 25(22), 5732-5746.
- Wadge, G. 1994. The Lesser Antilles, in Caribbean geology: an introduction. S. K. Donovan and T. A. Jackson, eds. Kingston, Jamaica: UWI Publishers Association.
- Wang, G., Compton, S. G., & Chen, J. (2012). The mechanism of pollinator specificity between two sympatric fig varieties: a combination of olfactory signals and contact cues. *Annals of botany*, 111(2), 173-181.
- Waser, N. M., Chittka, L., Price, M. V., Williams, N. M., & Ollerton, J. (1996). Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77(4), 1043-1060.
- Wegner, W., Wörner, G., Harmon, R. S., & Jicha, B. R. (2011). Magmatic history and evolution of the Central American Land Bridge in Panama since Cretaceous times. *Bulletin*, 123(3-4), 703-724.
- Wiebes, J.T. (1964). Fig wasp from Israel *Ficus sycomorus* and related East African species (Hymenoptera, Chalcidoidea: Agaonidae). *Entomol. Ber.* 24: 187-191
- Wiebes, J.T. (1986). Agaoniade (Hymenoptera, Chalcidoidea) and *Ficus* (Moraceae): fig wasps and their figs, I. *Proc. C. Entomol.* 89(3): 335-355.
- Wiebes, J.T. (1995). The New World Agaoninae (pollinators of figs). Netherlands.
- Xia, X. (2018). DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1550-1552.
- Xiao, J. H., Wang, N. X., Murphy, R. W., Cook, J., Jia, L. Y., & Huang, D. W. (2012). *Wolbachia* infection and dramatic intraspecific mitochondrial DNA divergence in a fig wasp. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 66(6), 1907-1916
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., ... & Chen, S. (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS one*, 5(10), e13102.
- Yoder, J. B., & Nuismer, S. L. (2010). When does coevolution promote diversification?. *The American Naturalist*, 176(6), 802-817.
- Yu, Y., Harris, A. J., & He, X. (2010). S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): a tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(2), 848-850.

- Yu, Y., Harris, A. J., Blair, C., & He, X. (2015). RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. *Molecular phylogenetics and evolution*, 87, 46-49.
- Zamora-Camacho, A., Espindola, V. H., Pacheco, J. F., Espindola, J. M., & Godinez, M. L. (2010). Crustal thickness at the Tuxtla Volcanic Field (Veracruz, Mexico) from receiver functions. *Physics of the Earth and Planetary Interiors*, 182(1-2), 1-9
- Zeng, J., Yu, H., & Kjellberg, F. (2018). Transcriptome analysis of genes involved in the response of a pollinator fig wasp to volatile organic compounds from its host figs. *Acta Oecologica*, 90, 91-98.
- Zhang, A.B. & Sota, T. (2007). Nuclear gene sequences resolve species phylogeny and mitochondrial introgression in *Leptocarabus* beetles showing trans-species polymorphisms. *Mol. Phyl. Evol.* 45:534-546

## Anexos

**Anexo 1.** Ciclo de vida y acoplamiento del mutualismo entre higueras y sus avispas polinizadoras de acuerdo con Galil & Eisenkowitch 1968.

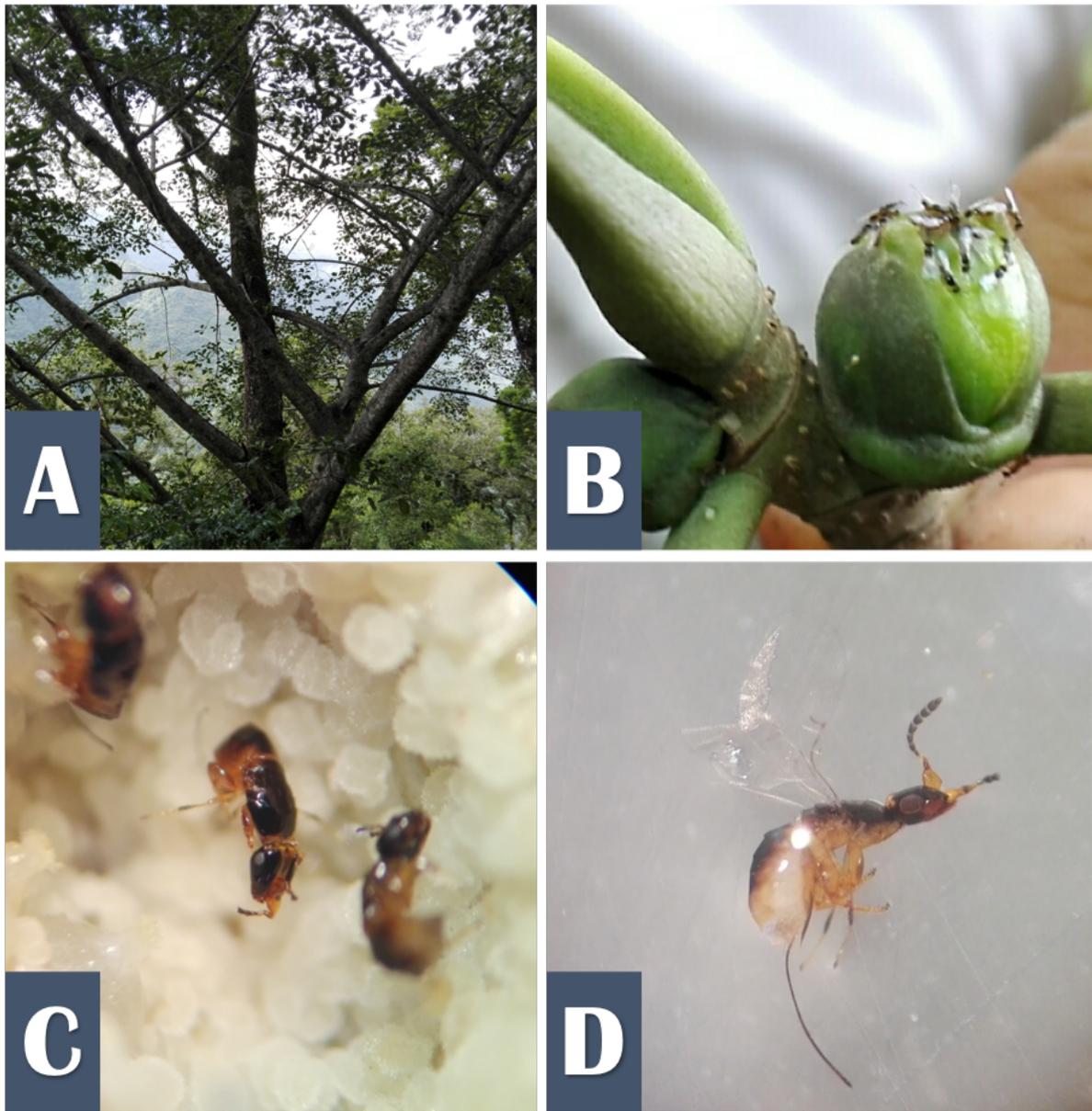


**Fase A** (pre-femenina): la inflorescencia se desarrolla hasta alcanzar la madurez, los estigmas de las flores son receptivos. **Fase B** (femenina): los óvulos están desarrollados, los estigmas son receptivos, las brácteas del ostiolo se descomprimen, lo que facilita la entrada de las avispas, éstas polinizan y/u oviponen las flores pistiladas. **Fase C** (interfloral): las larvas y semillas se desarrollan hasta madurar o convertirse en imagos. **Fase D** masculina: las flores masculinas maduran y el polen queda expuesto en los estambres. Emergen las avispas macho y fecundan a las hembras que aún se encuentran en las agallas. Los machos cavan un túnel en la pared del sicono, por el que saldrán posteriormente las hembras, las cuales ya fertilizadas emergen de las agallas, éstas colectan polen y abandonan el sicono en búsqueda de un sicono en fase B. **Fase E** (post-floral): El sicono madura completamente, se torna suave y atractivo para animales frugívoros, quienes realizarán la dispersión de las semillas.

**Anexo 2.** Lista de epítetos o sinonimias dentro del complejo *F. aurea*. Hasta el momento se consideran entidades taxonómicas informales de acuerdo con Berg (2007):

- *Ficus aurea* Nutt. (1846) 4, t. 43, nom. cons. — Type: *Blodgett s.n.* (holo BM; iso NY), USA, Florida, Key West.
- *Ficus ciliolosa* Link (1822) 450, nom. rej. prop. — Type: Hort. Bot. Berol. (holo B; iso NY), origin unknown.
- *Ficus aurea* Nutt. var. *latifolia* Nutt. (1846) 4. — Type: *Blodgett s.n.* (holo BM), USA, Florida, Key West.
- *Ficus venusta* Kunth & C.D. Bouché (1847) 16. — *Urostigma venustum* (Kunth & C.D. Bouché) Miq. (1847) 538. — Type: Hort. Bot. Berol., origen desconocido (holo B; iso U).
- *Urostigma tecolutense* Liebm. (1851) 324. — *Ficus tecolutensis* (Liebm.) Miq. (1867) 299. — Type: *Liebmann 14335* (holo C; iso B; iso fragments F, GH, K), Mexico, Veracruz, Río Tecoluta, Sepillo.
- *Ficus dimidiata* Griseb. (1859) 151. — Type: *Wullschlaegel 1368* (holo GOET), Jamaica, Manchester.
- *Urostigma warczewiczii* Miq. (1862) 410. — *Ficus warczewiczii* (Miq.) Miq. (1867) 298. — Type: *Warzewicz s.n.* (holo U), Guatemala, sin localidad.
- *Ficus tuerckheimii* Standl. (1917) 13. — Type: *Pittier 16149* (holo US; iso B, NY), Costa Rica, La Fortuna, Volcan de Irazú, 1575 m.
- *Ficus isophlebia* Standl. (1917) 14. — Type: *Pittier 2821* (holo US), Panama, Chiriqui, cerca de David.
- *Ficus jimenezii* Standl. (1917) 14. — Type: *Tonduz & O. Jiménez 17536* (holo US; iso GH), Costa Rica, cerca de San José.
- *Ficus cookii* Standl. (1917) 15. — Type: *Cook 73* (holo US), Mexico, Chiapas, San Vicente.
- *Ficus lundellii* Standl. (1935) 54. — Type: *Lundell 3406* (holo F; iso MICH, S, US), Guatemala, Peten, La Libertad.
- *Ficus cabusana* Standl. & Steyerm. (1940) 226. — Type: *Steyermark 37583* (holo F), Guatemala, San Marcos, Río Cabús, Potrero Matasán, Finca ‘El Porvenir’, 1000–1300 m.
- *Ficus laterisyce* W.C. Burger (1973) 426. — Type: *Lent 2972* (holo F; iso U, US), Costa Rica, Cartago, Río Pejibaye, 2 km SW de Taus.
- *Ficus mayana* Lundell (1975) 157. — Type: *Lundell & Contreras 19266* (holo LL; iso BM, K, F, S), Guatemala, Petén, La Cumbre.
- *Ficus rigidula* Lundell (1975) 159. — Type: *Breedlove 9568* (holo LL), Mexico, Chiapas, cerca de Tuxtla Gutierrez, 600 m.
- *Ficus rzedowskiana* (2003) — Type: Carvajal & Cuevas-Figueroa, México, Veracruz, San Andrés Tuxtla, Polvorín, 5.7 km W de San Andrés Tuxtla

**Anexo 3.** Imágenes de avispas e higueras en el proceso de obtención de muestras.



**Fig. 20.** A. Copa de un individuo de *F. aurea* en la localidad de Neblinas, Querétaro. B. Avispas hembras polinizadoras aglomeradas alrededor del ostiolo en el sicono. C. Tres hembras de *Pegoscapus* sp. al interior del higo, se observan las flores en etapa receptiva para la polinización. D. Hembra adulta vista al microscopio estereoscópico, se observa su coloración de la parte ventral color ámbar, así como algunos huevecillos en el abdomen.

#### **Anexo 4.** Protocolo de extracción de ADN para avispas de la familia Agaonidae

Se utilizó el kit de extracción Invitrogen PureLink Genomic DNA de la marca ThermoFisher Scientific. Se siguió el protocolo de fábrica con diversas modificaciones para conseguir la mayor cantidad de ADN a partir de un único individuo de avispa. El primer paso fue reducir a la mitad todos los volúmenes de los reactivos que se indican en el mismo. Se enumeran los pasos seguidos como procedimiento:

1. Con ayuda de pinzas de relojero, retirar la avispa del tubo con etanol 100% en el que está almacenada, y colocarla delicadamente sobre un papel secante por un minuto para eliminar el alcohol de la muestra.

#### **Fase de Lisis Celular**

2. En un tubo eppendorf de centrifuga añadir 90 µl de Buffer “Genomic Digestion” proporcionado en el kit.
3. Con ayuda de las pinzas nuevamente, introducir en este tubo a la avispa, una vez seca de etanol.
4. Tomar un micropistilo esterilizado (si no se cuenta con autoclave, se puede sumergir unos minutos en alcohol y posteriormente pasarlo rápidamente por una flama, se puede usar mechero o encendedor. Dejar enfriar unos instantes) y macerar vigorosamente la avispa, hasta reducir lo más posible las partículas. Se debe tener cuidado de que la muestra se quede en la solución y no en el micropistilo. Este paso se realiza de esta manera para romper lo más posible el exoesqueleto y dejar expuesta la mayor cantidad de tejidos internos.
5. Añadir 10 µl de Proteinasa K y se mezclar 5 segundos en el Vórtex.
6. Dejar incubar el lisado por un tiempo ideal de 90 minutos a una temperatura de 55oC y con agitación de 300 rpm. (Un lapso entre 60-90 minutos ofrece buenos resultados. Dejar la muestra por más tiempo (hasta 24hrs) no demostró diferencias en la cantidad de ADN obtenido al final del procedimiento).
7. Idealmente, cada 20 minutos mezclar la muestra en el Vórtex por 3 segundos. Al hacer esto, fijarse en que los restos particulados o tejidos no se queden adheridos a las paredes del tubo eppendorf, deben quedar suspendidos en la solución).
8. Una vez concluida la incubación, si se observan aún restos particulados, se debe centrifugar por 3 minutos a 12,000 rpm. Los restos quedarán en el fondo, con mucho cuidado y con ayuda de una micropipeta, se deben eliminar estas partículas observables.
9. Mezclar en vórtex por 3 segundos el lisado. Añadir 10 µl de RNAsa (que provee el kit) y mezclar en Vórtex brevemente (3 segundos). La mezcla con vórtex a lo largo del procedimiento debe ser siempre breve ya que esto genera un daño mecánico para el ADN que se pretende obtener.
10. Dejar incubar/reposar la muestra por 8 minutos a temperatura ambiente.

11. Añadir 100 µl de la solución “PureLink Genomic Lysis/Binding” provista en el kit y mezclar en vórtex por 3 segundos. En esta parte se deberían comenzar a observar precipitados blancos, estos corresponden a diferentes sales. Dichas sales son las que se purificarán en los pasos subsecuentes.
12. Incubar por 3 minutos.
13. Añadir 100 µl de etanol frío al 100% (o bien al 96%) y mezclar en Vórtex por 3 segundos. Dejar incubar por 1 minuto. Se recomienda tener un frasco de etanol en el refrigerador siempre para este paso.

#### **Fase de Unión a Columnas de sílica (Binding)**

13. Tomar una columna de sílica del kit. Abrirla y con una micropipeta, añadir el lisado que se ha preparado anteriormente. El volumen del lisado que se forma es de aproximadamente de 320 µl por muestra.
14. Centrifugar la columna a 10,000 g por 1 minuto y a temperatura ambiente.
15. Desechar el tubo de colecta y colocar uno nuevo en la columna.

#### **Fase de Lavado**

16. Añadir 250 µl de buffer de lavado 1 (“Wash buffer 1”) propio del kit.
17. Centrifugar la columna a 10 000 g por 1 minuto. Desechar el tubo de colecta y colocar uno nuevo.
18. Añadir 250 µl de buffer de lavado 2 (“Wash buffer 2”) propio del kit.
19. Centrifugar la columna a 12 000 rpm por 2 minutos. Desechar el tubo de colecta.

#### **Fase de Elución**

20. Colocar la columna en un microtubo eppendorf nuevo (que actuará como el tubo de colecta final, por lo que es importante etiquetarlo muy bien).
21. Añadir en la columna 25 µl de “Buffer de elución” previamente calentado en un bloque térmico a 55oC por 5 minutos. Es importante calentar un poco el buffer de elución ya que favorecerá el desprendimiento del ADN de la columna.
22. Incubar por 5-7 minutos.
23. Centrifugar la columna a 12 000 rpm por 1 minuto. En este punto el tubo eppendorf ya contendrá ADN puro.
24. Realizar una segunda elución: Repitieron pasos 21-23. De esta forma el volumen final obtenido es de 50 µl. Si se desea concentrar aún más la cantidad de ADN obtenido, se puede reducir hasta 30 µl de volumen final, centrifugando con 15 µl cada vez.
25. Verificar el etiquetado de los tubos.

### **Medición de concentración y parámetros de pureza**

La concentración y pureza del ADN obtenido en la solución se puede cuantificar utilizando un espectrofotómetro, en este caso se utilizó NanoDrop™. En promedio, las concentraciones obtenidas son muy bajas (1.8 – 8 ng/ µl). De las muestras de las que se logra obtener una concentración mayor a 2.0 ng/ µl y en las cuales se observaron valores de pureza adecuados, se pueden someter al procedimiento de amplificación de un gen por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, PCR.