



Universidad
del Atlántico

CÓDIGO: FOR-DO-109

VERSIÓN: 0

FECHA: 03/06/2020

**AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES PARA LA CONSULTA, LA
REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL, Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL
TEXTO COMPLETO**

Puerto Colombia, 16 de Junio de 2020

Señores

DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS

Universidad del Atlántico

Asunto: Autorización Trabajo de Grado

Cordial saludo,

Yo, **MARIAUXI GONZÁLEZ MOLINA**, identificado(a) con **C.C. No. 1.140.891.737** de **BARRANQUILLA**, autor(a) del trabajo de grado titulado "**VARIACIÓN GENÉTICA DE DELTOCHILUM GUILDINGII (WESTWOOD, 1835); (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE: SCARABAEINAE), EN TRES FRAGMENTOS DE BOSQUE SECO TROPICAL, EN EL CARIBE COLOMBIANO**" presentado y aprobado en el año **2020** como requisito para optar al título Profesional de **BIÓLOGA**; autorizo al Departamento de Bibliotecas de la Universidad del Atlántico para que, con fines académicos, la producción académica, literaria, intelectual de la Universidad del Atlántico sea divulgada a nivel nacional e internacional a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios del Departamento de Bibliotecas de la Universidad del Atlántico pueden consultar el contenido de este trabajo de grado en la página Web institucional, en el Repositorio Digital y en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad del Atlántico.
- Permitir consulta, reproducción y citación a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato CD-ROM o digital desde Internet, Intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

Esto de conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Atentamente,

Firma *Mariauxi González Molina*
MARIAUXI GONZÁLEZ MOLINA

C.C. No. 1.140.891.737 de BARRANQUILLA

DECLARACIÓN DE AUSENCIA DE PLAGIO EN TRABAJO ACADÉMICO PARA GRADO

Este documento debe ser diligenciado de manera clara y completa, sin tachaduras o enmendaduras y las firmas consignadas deben corresponder al (los) autor (es) identificado en el mismo.

Puerto Colombia, **16 de Junio de 2020**

Una vez obtenido el visto bueno del director del trabajo y los evaluadores, presento al **Departamento de Bibliotecas** el resultado académico de mi formación profesional o posgradual. Asimismo, declaro y entiendo lo siguiente:

- El trabajo académico es original y se realizó sin violar o usurpar derechos de autor de terceros, en consecuencia, la obra es de mi exclusiva autoría y detento la titularidad sobre la misma.
- Asumo total responsabilidad por el contenido del trabajo académico.
- Eximo a la Universidad del Atlántico, quien actúa como un tercero de buena fe, contra cualquier daño o perjuicio originado en la reclamación de los derechos de este documento, por parte de terceros.
- Las fuentes citadas han sido debidamente referenciadas en el mismo.
- El (los) autor (es) declara (n) que conoce (n) lo consignado en el trabajo académico debido a que contribuyeron en su elaboración y aprobaron esta versión adjunta.

Título del trabajo académico:	“VARIACIÓN GENÉTICA DE DELTOCHILUM GUILDINGII (WESTWOOD, 1835); (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE: SCARABAEINAE), EN TRES FRAGMENTOS DE BOSQUE SECO TROPICAL, EN EL CARIBE COLOMBIANO”
Programa académico:	BIOLOGÍA

Firma de Autor 1:							
Nombres y Apellidos:	MARIAUXI GONZÁLEZ MOLINA						
Documento de Identificación:	CC	X	CE		PA	Número:	1.140.891.737
Nacionalidad:					Lugar de residencia:		
Dirección de residencia:							
Teléfono:					Celular:		



FORMULARIO DESCRIPTIVO DEL TRABAJO DE GRADO

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO DE GRADO	VARIACIÓN GENÉTICA DE <i>DELTOCHILUM GUILDINGII</i> (WESTWOOD, 1835); (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE: SCARABAEINAE), EN TRES FRAGMENTOS DE BOSQUE SECO TROPICAL, EN EL CARIBE COLOMBIANO
AUTOR(A) (ES)	MARIAUXI GONZÁLEZ MOLINA
DIRECTOR (A)	NEIS JOSÉ MARTÍNEZ HERNÁNDEZ
CO-DIRECTOR (A)	-
JURADOS	KARINA ISABEL CASTELLANOS ROMERO ROGER HUMBERTO VALLE MOLINARES
TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR ALTÍTULO DE	BIÓLOGA
PROGRAMA	BIOLOGÍA
PREGRADO / POSTGRADO	PREGRADO
FACULTAD	CIENCIAS BÁSICAS
SEDE INSTITUCIONAL	SEDE NORTE
AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO	2020
NÚMERO DE PÁGINAS	94
TIPO DE ILUSTRACIONES	FLUJOGRAMAS, MAPAS, FOTOGRAFÍAS
MATERIAL ANEXO (VÍDEO, AUDIO, MULTIMEDIA O PRODUCCIÓN ELECTRÓNICA)	(NO APLICA)
PREMIO O RECONOMIENTO	APOYO ECONOMICO RECIBIDO EN LA PRIMERA CONVOCATORIA INTERNA PARA APOYO AL DESARROLLO DE TRABAJOS DE GRADO EN INVESTIGACIÓN FORMATIVA NIVEL PREGRADO Y POSGRADO DEL 2018, MERITORIA, LAUREADA



**VARIACIÓN GENÉTICA DE *Deltochilum guildingii* (WESTWOOD, 1835);
(COLEOPTERA: SCARABAEIDAE: SCARABAEINAE), EN TRES
FRAGMENTOS DE BOSQUE SECO TROPICAL, EN EL CARIBE COLOMBIANO**

MARIAUXI GONZÁLEZ MOLINA

**UNIVERSIDAD DEL ATLÁNTICO
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
BARRANQUILLA, ATLÁNTICO
2020**



**VARIACIÓN GENÉTICA DE *Deltochilum guildingii* (WESTWOOD, 1835);
(COLEOPTERA: SCARABAEIDAE: SCARABAEINAE), EN TRES
FRAGMENTOS DE BOSQUE SECO TROPICAL, EN EL CARIBE COLOMBIANO**

**PROYECTO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE BIÓLOGO
PRESENTADO POR:**

MARIAUXI GONZÁLEZ MOLINA

Director:

NEIS JOSÉ MARTÍNEZ HERNÁNDEZ MS.c.

**Docente asociado. Grupo de Investigación Biodiversidad del Caribe colombiano
Programa de Biología Facultad de Ciencias Básicas. Universidad del Atlántico
Universidad del Atlántico. Barranquilla.**

**UNIVERSIDAD DEL ATLÁNTICO
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
BARRANQUILLA, ATLÁNTICO
2020**

NOTA DE ACEPTACIÓN

APROBADO

DIRECTOR

Neis Martínez Hernández

JURADOS

Karina Isabel Castellanos Romero

Roger Humberto Valle Molinares

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios, y al siguiente grupo maravilloso de personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta investigación: A mis hermosos motores en la vida y sustento en todo, mi madre Yini Molina Vergara, a mi abuelita Tarcila Vergara, a mi estrellita en el cielo Luis Vicente Molina y a mis tíos: Martha Molina, Luis Molina y Armando Bula. A mi gran mentor académico Neis Martínez Hernández, quien me brindó la maravillosa oportunidad de trabajar en este proyecto y potencializó mi crecimiento personal e intelectual con su guía, apoyo y su alta confianza en mí. Gracias a la valiosa ayuda del doctor Juvenal Yosa Reyes y Roberto Carlos Pestana Nobles del laboratorio de Simulación Molecular y Bioinformática de la Universidad Simón Bolívar para el procesamiento de las secuencias genéticas. A quienes me brindaron un apoyo emocional incondicional durante esta etapa como mis grandes amigos: José Daniel Sarmiento Roa, Armando Bula, Stephany Bula, Elvira Martínez, Kaitú Carrillo.

Agradezco a la Universidad del Atlántico por la financiación recibida y a la Primera Convocatoria interna para apoyo al desarrollo de trabajos de grado en investigación formativa nivel pregrado y posgrado 2018 de la misma institución, a Parques Nacionales Naturales de Colombia y CARSUCRE por los permisos otorgados de recolección de especímenes. A la convocatoria 727 COLCIENCIAS de 2015- Doctorado Nacional, por el apoyo otorgado al proyecto titulado “Efectos ecológicos y genéticos de la fragmentación del bosque seco tropical (BST) en la comunidad de escarabajos copro-necrófagos (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) en el Caribe colombiano” del estudiante de doctorado Neis José Martínez Hernández en Ciencias-Biología de la Universidad Nacional-Sede Bogotá y beneficiario de la convocatoria. Agradezco a la empresa prestadora de servicios Australian Genomic Research Facility (AGRF) por los protocolos moleculares realizados.

Gracias por el apoyo recibido en campo y en los procesos propios de la investigación a mis compañeros del semillero “Artrópodos del Caribe colombiano: Neoptera”: Kevin Caballero, Luis Osorio, a Jorge Rangel y Sandy García por su constante disposición a ayudarme y valiosas asesorías.

CONTENIDO

RESUMEN	pág 7
ABSTRACT	8
1.INTRODUCCIÓN	11
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 Generalidades de la subfamilia Scarabaeinae	14
2.2 El género <i>Deltochilum</i> Eschscholtz, 1822	15
2.3 Diagnósis de <i>Deltochilum guildingii</i> (Westwood, 1835)	16
2.4 Biología de la especie <i>D. guildingii</i>	17
2.5 Relación entre los escarabajos coprófagos y las modificaciones del hábitat en el ecosistema	18
2.6 Genética de poblaciones y conservación de especies	20
2.6.1 Origen y consecuencias de la fragmentación de poblaciones en el <i>pool</i> genético	20
2.6.2 La diversidad genética como herramienta para la conservación de especies y ecosistemas	22
2.6.3 Polimorfismos de Nucleótido Simple “SNPs” como marcadores moleculares	23
2.7 RAD-seq: Secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción y su derivado ddradseq	25
2.8 Estimadores de diversidad genética para estudios poblacionales	27
3. ANTECEDENTES	30
3.1 Antecedentes de aplicaciones de marcadores moleculares en estudios de diversidad genética	30
3.2 Utilización de RAD-seq en estudios aplicados a insectos	32
4. PREGUNTA PROBLEMA	35

5. HIPÓTESIS	35
6. OBJETIVOS	35
6.1 Objetivo general	35
6.2 Objetivos específicos	35
7.MATERIALES Y MÉTODOS	36
7.1 Procedencia del material biológico. Descripción de las estaciones	37
7.1.2 Diseño muestral para la captura de especímenes	39
7.2. Fase de laboratorio	40
7.2.1. Protocolo Molecular	40
7.2.1.2 Extracción y cuantificación del ADN	40
7.2.3 Digestión con enzimas de restricción y secuenciación de etiquetas genómicas (RADs)	40
7.2.4 Análisis bioinformático para interpretación de resultados	42
8. RESULTADOS	46
8.1 Filtrado de calidad de las lecturas	46
8.2 Optimización de parámetros del software <i>Stacks</i>	46
8.3 Índices de diversidad genética dentro de cada localidad	49
8.4 Índices de diferenciación genética entre localidades	50
9. DISCUSIÓN	54
10. CONCLUSIONES	60
11. RECOMENDACIONES	61
12. BIBLIOGRAFÍA	62
13. ANEXOS	90

VARIACIÓN GENÉTICA DE *Deltochilum guildingii* (WESTWOOD, 1835); (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE: SCARABAEINAE), EN TRES FRAGMENTOS DE BOSQUE SECO TROPICAL, EN EL CARIBE COLOMBIANO

RESUMEN

La investigación sobre la variación genética que ocurre en cada organismo, es crucial para la conservación de la biodiversidad, porque permite identificar cuales son prioridades de conservación en áreas remanentes como los actuales fragmentos de bosque seco tropical (BST) en el Caribe colombiano. Uno de estos taxones es la especie de escarabajo coprófago *Deltochilum guildingii*, categorizado por IAvH en 2016 como prioridad de conservación; debido a un conjunto de factores como aspectos ecológicos y etológicos que le confieren importancia económica y funcional dentro de los ecosistemas por ser una activa recicladora de nutrientes, en sinergia con su singularidad genética. Teniendo en cuenta lo anterior, se analizó la diversidad genética de poblaciones naturales de *D. guildingii* en tres fragmentos de BST del Caribe colombiano (RCM: Reserva Campesina La Montaña, SFFC: Santuario de Flora y Fauna Los Colorados y EBPC: Estación Biológica Primatológica de Colosó) mediante marcadores moleculares como SNPs, con el fin de estimar el grado de variación genética dentro y entre localidades geográficas. Para esto se determinaron los principales índices de diversidad genética como diversidad nucleotídica, F_{IS} , F_{ST} , Heterocigosidad observada y esperada en las poblaciones evaluadas; así como la estructura genética entre localidades empleando Análisis de Componentes Principales (ACP) y coeficientes de diferenciación interpoblacional (F_{ST} y análogos). Se determinó que con 1.202 SNPs encontrados, el SFFC se constituye como un reservorio importante de la diversidad genética de la especie *D. guildingii* por poseer los mejores valores de los índices genéticos como mayor heterocigosidad observada (0,203), menor coeficiente de endogamia (0,169) y el mayor número de alelos privados (63); además que se hace urgente maximizar los esfuerzos de conservación de la RCM, por su alto aporte al *pool* genético del taxón, a pesar de su nivel de intervención antropogénica y baja extensión (47 hectáreas). Adicionalmente, se encontró que EBPC merece atención aparte como área de reserva protegida por poseer los valores de heterocigosidad observada menores y mayor coeficiente de endogamia, indicando menores valores de diversidad en esa localidad; sugiriendo que puede ser susceptible a mediano y largo de plazo de erosión genética. A pesar de las particularidades de cada localidad geográfica los diferentes estimadores genéticos (F_{ST} , Φ , D_{est}) en conjunto con análisis de ACP mostraron que la diferenciación y estructura genética entre las localidades de BST evaluadas es baja, considerándose como una sola población, comportándose como una posible metapoblación.

Palabras clave: Diversidad genética, *Deltochilum guildingii*, SNPs, ddradseq.

ABSTRACT

The research on the genetic variation that occurs in each organism is crucial for the conservation of biodiversity, because it allows to identify what are conservation priorities in remaining areas such as the current fragments of tropical dry forest (TDF) in the colombian Caribbean. One of these taxa is the species of dung beetle *Deltochilum guildingii*, categorized by IAvH in 2016 as a conservation priority; due to a set of factors such as ecological and ethological aspects that confer economic and functional importance within ecosystems for being an active recycler of nutrients, in synergy with its genetic uniqueness. Taking into account the above, the genetic diversity of natural populations of *D. guildingii* was analyzed in three fragments (RCM: Reseva Campesina La Montaña, SFFC: Santuario de Flora y Fauna Los Colorados and EBPC: Estación Biológica Primatológica de Colosó) of the colombian Caribbean, using molecular markers such as SNPs, in order to estimate the degree of genetic variation within and between geographic sites. For this, the main indexes of genetic diversity were determined, such as nucleotidic diversity, FIS, FST, Heterozygosity observed and expected in the evaluated localities; as well as the genetic structure between geographical sites using Principal Component Analysis (PCA) and inter-population differentiation coefficients (FST and the analogues). It was determined that with 1.202 SNPs, the SFFC constitutes an important reservoir of the genetic diversity of the *D. guildingii* species because it possesses the best values of the genetic indexes such as greater observed heterozygosity (0,203), lower inbreeding coefficient (0,169) and the greatest number of private alleles (63); also that it is urgent to maximize the conservation efforts of the RCM, for its high contribution to the genetic *pool* of the taxon despite its level of anthropogenic intervention and low extension (47 hectares). In addition, it was found that EBPC deserves separate attention as a protected reserve area for having the lowest observed heterozygosity values and the highest inbreeding coefficient, indicating lower genetic diversity values in that locality, suggesting that it may be susceptible to genetic erosion in the medium and long term. Despite the particularities of each geographic location, the different genetic estimators (FST, Φ , Dest) together with analysis of PCA, showed that the differentiation and genetic structure between the TDF locations evaluated is low, considered as a single population, behaving as possible metapopulation.

Key words: Genetic diversity, *Deltochilum guildingii*, SNPs, ddradseq

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de caracteres morfológicos diagnósticos del género *Deltochilum* Eschscholtz, 1822 y del subgénero *Hybomidium* Shipp 1897.

Figura 2. Morfología de *D. guildingii*

Figura 3. Distribución de *D. guildingii* en América con énfasis en Colombia.

Figura 4. Esquema general de protocolo ddradseq

Figura 5. Localidades de BST en el Caribe colombiano escogidas para el presente estudio.

Figura 6. Características de zonas de vida de las localidades de estudio.

Figura 7. Modelo de trampa de caída utilizada durante el desarrollo del proyecto.

Figura 8. Descripción del flujo de trabajo de las muestras en esta investigación.

Figura 9. Gel de electroforesis con las distintas combinaciones enzimáticas evaluadas (A) y electroferograma de la mejor combinación enzimática para doble digestión de las muestras (B).

Figura 10. Variación de los valores del parámetro M (A) y distribución porcentual de SNPs por *locus* para *D. guildingii* en las muestras evaluadas (B).

Figura 11. Comparación de estimadores de diferenciación genética entre localidades geográficas basado en F_{ST} (A), así como las comparaciones pareadas del estimador Φ (B) y del estimador $Dest$ (C).

Figura 12. Árbol de vecino más cercano (VMC) para visualización de las distancias genéticas resumido por localidades (A) y extendido con todos los individuos (B) de *D. guildingii*.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores de parámetros de *Stacks* utilizados en análisis poblacionales

Tabla 2. Variación de los estimadores de diversidad genética de *D. guildingii* a partir de todos los sitios y los sitios variantes.

1.INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas tropicales como el Bosque Seco (BST), han venido disminuyendo su cobertura en el Neotrópico y específicamente en Colombia (Alvarado-Solano y Otero-Ospina, 2015; Echeverría-Londoño *et al.*, 2016; González-M *et al.*, 2018), por una serie de actividades intensivas como ganadería, agricultura e incremento de límites urbanos (Pizano y García, 2014; Rosero-Toro *et al.*, 2018), que han ido modificando elementos del ecosistema y causando efectos en la fauna y flora (Kattan *et al.*, 2019). Además, lo anterior genera interrupción de la continuidad de las áreas naturales y se crean paisajes fragmentados (Portillo-Quintero *et al.*, 2015); así como alteración en los ciclos biogeoquímicos y los procesos ecológicos por influir en la composición y diversidad de especies, debido a cambios acelerados en el uso del suelo (Díaz *et al.*, 2013).

Sin embargo, el nivel de protección de este ecosistema es bajo porque solo está incluido el 5,1% en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SINAP) (Portillo-Quintero y Sánchez-Azofeifa 2010), aunque todavía se desconoce mucha información sobre su biodiversidad (Bocanegra-González *et al.*, 2019). Por otro lado, los monitoreos de biodiversidad en el BST en el Caribe colombiano, se han enfocado en análisis tradicionales de diversidad (Carvajal-Cogollo y Urbina-Cardona, 2008; Fontalvo-Rodríguez y Domínguez-Haydar, 2009), dejando a un lado el componente de la diversidad genética. Esta diversidad es fundamental para la persistencia de las especies en el tiempo, porque determina el rendimiento ecológico para responder ante cambios ambientales y la capacidad de resiliencia de las especies en los ecosistemas (Schaberg *et al.*, 2008), en términos generales incide en la capacidad de adaptación de los taxones (Frankham *et al.*, 2002; Bernatchez, 2016).

La genética de las especies está afectada por cuestiones demográficas sensibles a variaciones en el ecosistema donde se encuentran, cuando se generan cambios abruptos en las condiciones locales, se incrementa el efecto borde en muchos taxones (Wang *et al.*, 2002). Además, de acuerdo a la capacidad de vuelo (dispersión), se ha concluido que, las áreas fragmentadas actúan como barreras para grupos de insectos, generando efectos en la diversidad genética de ciertas especies (Díaz *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012; Barnes *et al.*, 2014).

Dentro de los insectos hay un grupo de escarabajos coprófagos de la subfamilia Scarabaeinae que tienen efectos ecológicos importantes en los ecosistemas (Schowalter *et al.*, 2018), debido a que brindan múltiples servicios ambientales; ya que incrementan la productividad de los suelos y ejercen control biológico al aprovechar el excremento como alimento y sitio de reproducción (Bergstrom *et al.*, 1976; Braga *et al.*, 2013; Milotić *et al.*, 2018). Incluso hay especies pertenecientes a este grupo que se han propuesto como indicadores de conservación y como elemento clave a la hora de establecer áreas protegidas

(Davis, 2001; McGeoch *et al.*, 2002; Nichols *et al.*, 2007; Otavo *et al.*, 2013; Bicknell *et al.*, 2014).

Aunque en Colombia se han iniciado esfuerzos para la conservación de áreas naturales declarando zonas de reserva o áreas protegidas (Aguilera-Díaz, 2013), se debe profundizar en sus criterios de representatividad ecológica (Castaño-Villa *et al.*, 2005) y evitar el aislamiento entre fragmentos porque, este disminuye la posibilidad de supervivencia de los organismos (Arellano y Rangel 2010) debido a la escasa conectividad entre zonas naturales, ya que el movimiento de las especies se limita por su sensibilidad a los bordes y la calidad de la matriz (Meyer *et al.*, 2008). Particularmente en el Caribe colombiano, los remanentes de bosque se han fragmentado al punto de generar parches aislados con distintos tamaños y baja conectividad (Acevedo, 2016; Mesa *et al.*, 2016), lo cual ha incidido en la reducción de la abundancia de ciertos escarabajos coprófagos en este ecosistema (Jiménez-Ferbans *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Solís *et al.*, 2011; González-Alvarado y Medina, 2015; Noriega *et al.*, 2016; Rangel-Acosta y Martínez-Hernández, 2017; Amell-Caez *et al.*, 2019; Rangel-Acosta *et al.*, 2020). Lo anterior puede generar aislamiento entre poblaciones de especies de BST y a su vez comprometer la persistencia de estas a largo plazo, debido a que dichas poblaciones generalmente muestran los efectos negativos de la endogamia y se puede incrementar su riesgo de extinción (Frankham *et al.*, 2010; Müller y Juškauskas, 2018).

Para profundizar en la diversidad genética de las especies se requieren taxones focales como el escarabajo coprófago *Deltochilum guildingii* (Westwood, 1851). De acuerdo a su biología, es una especie altamente sensible a la transformación de su hábitat, ya que los cambios en el medio afectan algunos rasgos como su biomasa y abundancia porque generalmente poseen un grado de asociación con características del bosque (da Silva y Hernández, 2015). También tiene importancia económica y ecológica por su gran tamaño, es clave en el reciclaje de nutrientes en el BST e interviene en la fertilidad de los suelos (IAvH, 2016). Además, fue categorizada como prioridad de conservación, destacando su posible singularidad genética; por lo que para hacer planes efectivos de manejo que permitan la conservación y aprovechamiento de los servicios ecosistémicos que brinda esta especie, se debe incluir la evaluación de su actual *pool* genético (IAvH, 2016). Lo anterior es importante, ya que la conservación a gran escala donde se involucra todo el ecosistema va ligada a la genética de poblaciones de especies claves (Hughes *et al.*, 1997; Bowen, 1999; Luck *et al.*, 2003; Holliday *et al.*, 2017). Adicionalmente, la correcta implementación de esfuerzos efectivos de conservación para especies catalogadas con algún grado de prioridad como *D. guildingii*, dependerá en gran medida del conocimiento de los patrones de diversidad genética que presente e incluso se puede lograr la detección de unidades de conservación independientes intraespecíficamente (Avise *et al.*, 1987; Moritz, 1994, 2002; Coates *et al.*, 2018); porque el factor genético es uno de los niveles jerárquicos para diseñar planes de manejo (Salwasser, 1990).

Algunos estudios moleculares en Scarabaeinae han evaluado el componente filogeográfico en zonas claves de transición para aumentar el entendimiento de la ecología y biogeografía de diversas especies, al punto de detectar diferenciación entre muestras de especies coprófagas introducidas en el Nuevo mundo con respecto a sus orígenes africanos (Whipple *et al.*, 2012; Halffter y Morrone, 2017). Otros estudios se han enfocado en calcular la diversidad genética para cuantificar haplotipos y lograr esclarecer hipótesis de especies crípticas en zonas de Brasil (Maldaner *et al.*, 2019), mientras en Colombia este tipo de estudios no se han realizado; razón por la cual se requiere empezar con datos a nivel local, porque cada ecosistema tiene sus singularidades geográficas.

Teniendo en cuenta lo anterior, uno de los requisitos para conservar la especie *D. guildingii*, es conocer el estado genético de las poblaciones en remanentes de BST en el Caribe colombiano, para lo cual se debe evaluar el grado de variación genética intra e interpoblacional, que a su vez permita entender el contexto evolutivo de esta especie. Los resultados de esta investigación sirven para monitorear cambios en las poblaciones protegidas y para contribuir a la política nacional de biodiversidad descrita en el Plan Nacional de Biodiversidad, e identificar zonas necesarias de conservación por presentar especies singulares y genotipos en riesgo de extinción (Álvarez-Davila *et al.*, 2019).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de la subfamilia Scarabaeinae

Dentro del vasto mundo de los escarabajos se distingue la subfamilia Scarabaeinae conocidos coloquialmente como coprófagos debido a su asociación con excremento de vertebrados, en especial de mamíferos (Halffter y Edmonds, 1982; Hanski, 1983); razón por la cual se ha demostrado que, cambios en la ecología de estos grupos de vertebrados, por ejemplo en aspectos como biomasa, pueden alterar al gremio trófico de los escarabajos coprófagos de dicha subfamilia, lo que lleva a maximizar el papel de este grupo de insectos, como un taxón útil en actividades de inventario de biodiversidad y monitoreo del estado poblacional de otras especies (Spector, 2006; Vulinec *et al.*, 2006).

Este grupo diverso tiene una morfología corporal variable, donde hay individuos con cuerpo globoso, rectangular y/o aplanado, entre otros, pero en el que se han encontrado características físicas en la cabeza como el volumen del pronoto y área de las patas que han sido denominadas rasgos funcionales, porque responden a una diversidad de hábitos alimenticios (Griffiths *et al.*, 2016; Pessôa *et al.*, 2017), ya que existen modificaciones dentro de las diferentes especies de acuerdo al comportamiento de manipular y trasladar el recurso, su función en el ecosistema y las condiciones ambientales donde se encuentren (Bui *et al.*, 2020). Las patas delanteras varían en forma, generalmente son aplanadas dorso-ventralmente con proyecciones o dentículos, algunas pueden carecer de artejos y en otras pueden estar reducidas en comparación con las demás extremidades cuando son usadas para extraer y dar forma a fragmentos del recurso; por otra parte, la cabeza exhibe forma plana o de pala, participando en la penetración y fragmentación del excremento (Cultid *et al.*, 2012).

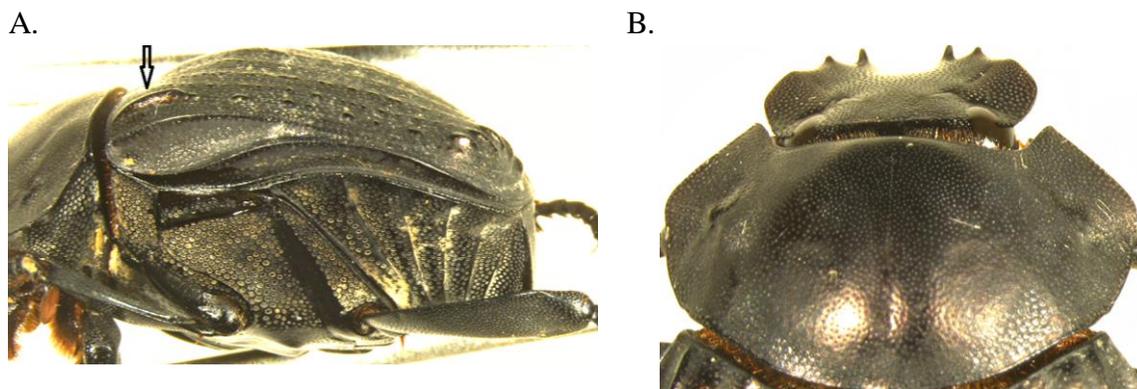
Dependiendo de los hábitos de relocalización de la bosta se ha propuesto una clasificación no taxonómica en cavadores o paracópridos, que hacen túneles con diferentes profundidades por debajo del excremento, los endocópridos o residentes, que separan una porción del excremento y construyen su nido dentro o inmediatamente por debajo de la deposición y el tercer grupo son los telecópridos o rodadores, que forman bolas de excremento y lo mueven con sus patas traseras, para finalmente enterrar a cierta distancia de la bosta (Halffter *et al.*, 1966; Halffter *et al.*, 1982; Aguilar-Garavito y Ramírez, 2015).

2.2 El género *Deltochilum* Eschscholtz, 1822

El género *Deltochilum* Eschscholtz, 1822 es uno de los grupos más diversos del Nuevo mundo dentro de la tribu Deltochilini con 108 especies válidas, de las cuales la mayoría se encuentran principalmente en las regiones tropicales, subtropicales de América e incluso templadas de este continente (Genier, 2012; Molano y Parrales, 2015; Tarasov y Dimitrov, 2016; González-Alvarado *et al.*, 2019). Existen especies de diferentes tamaños entre los 10 y 35 mm las cuales en su mayoría presentan hábitos rodadores y su dieta en las regiones tropicales es principalmente coprófaga con algunos casos reportados de aprovechamiento de carroña (Howen y Young, 1981; Vaz de Mello, 1999; Medina *et al.*, 2002; González *et al.*, 2009).

Dentro de las sinapomorfías que distinguen a este género se encuentra la presencia de dos o cuatro dientes clipeales, élitros con carinas en diferentes disposiciones presentes normalmente en las interestrías tres a siete y con presencia de una o dos carinas humerales (Fig. 1A); en él están incluidos los 8 subgéneros conocidos como: *Aganhyboma* Kolbe 1893, *Calhyboma* Kolbe 1893, *Hybomidium* Shipp 1897, *Parahyboma* Paulian 1938, *Euhyboma* Kolbe 1893, *Rubrohyboma* Paulian 1938, *Deltohyboma* Lane 1946 y *Deltochilum s. str.* (González *et al.*, 2009; González-Alvarado *et al.*, 2019).

Las especies del subgénero *Hybomidium* Shipp 1897, son de gran tamaño y su diagnosis radica en la presencia de cuatro dientes en el clipeo, donde los dientes mediales son más prominentes que los laterales (Fig.1B). Los tubérculos apicales están presentes desde la tercera a la séptima interestría (Fig. 1C) destacándose ciertos rasgos a nivel de la séptima y novena interestría elitral, ya que estas tienen una carina corta basal que ocupa más de 1/6 de la longitud del élitro y una larga carina basal que no excede la mitad de la longitud del primer par de alas, respectivamente (González-Alvarado y Vaz de Mello, 2014). En vista ventral el metaesterno posee dos tubérculos a cada lado de la línea longitudinal medial (Fig.1D).



C.



D.



Figura 1. Ubicación de caracteres diagnósticos del género *Deltochilum* Eschscholtz, 1822 y del subgénero *Hybomidium* Shipp 1897. A. Carinas elitrales B. Dientes clipeales C. Tubérculos apicales del élitro. D. Tubérculos del metaesterno.

2.3 Diagnósis de *Deltochilum guildingii* (Westwood, 1835)

Según la reciente compilación y síntesis taxonómica de esta especie por González-Alvarado y Vaz de Mello (2014), dentro de los caracteres morfológicos que describen al grupo se destacan algunos como la variación en color que va desde cobrizo a negro (Fig 2A y 2B), puntuaciones cefálicas de menor tamaño entre los dientes mediales y a nivel del disco elitral dichas puntuaciones aumentan su tamaño hacia los márgenes posteriores y laterales. Por otra parte, el pronoto anterior forma un ángulo agudo, a diferencia del margen pronotal entre los ángulos anteriores y mediales-laterales que forma uno casi recto y del margen entre el ángulo medial-lateral y posterior que es redondeado. A nivel de genitalia se observan puntuaciones variables en densidad ubicadas en el pigidio (Fig 2E y 2F).

Dentro de los caracteres diagnósticos de la especie están la presencia del ángulo del pronoto lateral medial de forma redondeada (Fig 2C), además de estrías profundas e interestrías con callos interestriales en su tercio central, donde estos últimos son más grandes que las puntuaciones interestriales, pero las puntuaciones estriales y las interestriales tienen aproximadamente el mismo tamaño (Fig. 2D) (González –Alvarado y Vaz de Mello, 2014). Presenta dimorfismo sexual, distinguible en la tibia de las patas anteriores y posteriores de los machos, ya que en las primeras presenta un diente mayor en posición más apical que en hembras y exhibe una curvatura que abarca más de la mitad de la longitud del cuerpo, respectivamente. Además, los machos poseen un pequeño tubérculo en la superficie ventral del fémur medio acompañado de protuberancias en el disco elitral (González –Alvarado y Vaz de Mello, 2014).

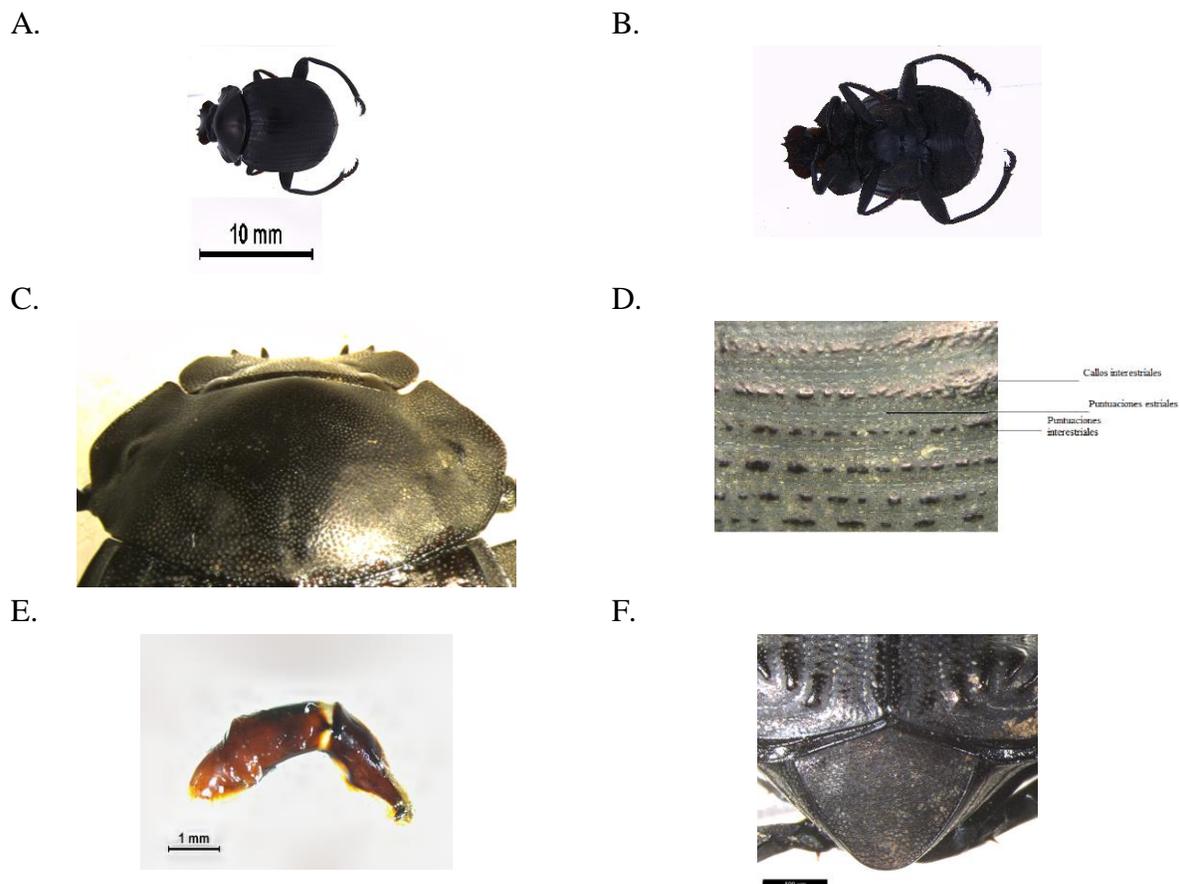


Figura 2. Morfología de *D. guildingii* A. Ejemplar de la especie en vista dorsal B. Vista ventral. C. Ángulo pronotal medial lateral y puntuaciones del disco elitral. D. Escultura elitral. E. Edeago. F. Puntuaciones pigdiales.

2.4 Biología de la especie *D. guildingii*

La especie pertenece a la familia Scarabaeidae y a la subfamilia Scarabaeinae, se caracteriza por ser de gran tamaño. En cuanto a su coloración tiende a presentar tonalidades crípticas oscuras y pertenece al gremio de los rodadores, ya que forma y rueda, bolas de excremento que posteriormente entierra (Howen y Young, 1981), por lo que se desempeña como una activa recicladora de nutrientes y ayuda en la dispersión secundaria de semillas; también exhibe vuelo lento y amplia distribución (Huerta *et al.*, 2013; IAvH, 2016).

Según lo descrito por (González –Alvarado y Vaz de Mello, 2014), la especie se encuentra distribuida en bosques de Sudamérica en Brasil, Venezuela e incluso Panamá (Howden y Gill, 1987), mientras que, en Colombia, se ha reportado en los departamentos de Bolívar, Cesar, Magdalena, Meta, Antioquia, Cundinamarca, Atlántico y Guajira (Amézquita *et al.*,

1999; Medina *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 2012; González-Alvarado y Medina, 2015; Rangel-Acosta *et al.*, 2016a; Medina *et al.*, 2018) (Fig.3).

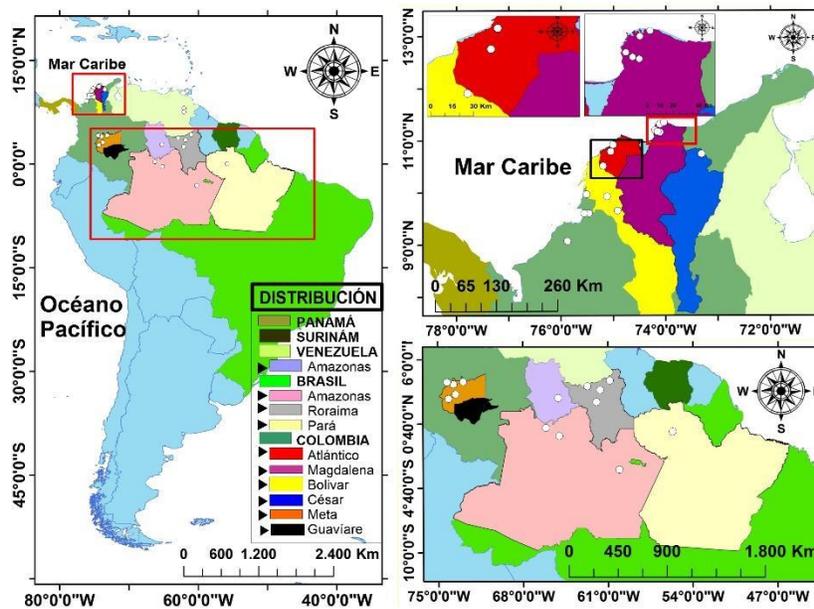


Figura 3. Distribución de *D. guildingii* en América con énfasis en Colombia.

2.5 Relación entre los escarabajos coprófagos y las modificaciones del hábitat en el ecosistema

El bosque seco tropical (BST) es un tipo de ecosistema con una climatología cálida anual (Pennington *et al.*, 2009), en Colombia originalmente estaba distribuido ampliamente a lo largo de 80.000 km² en seis regiones del país, con una variedad notoria de vegetación (Díaz *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2012). Este ecosistema alberga una gran diversidad y cumple múltiples funciones ecológicas como la estabilización de los suelos, el reciclaje de nutrientes, la regulación hídrica e incluso control climático al controlar emisiones de carbono (IAvH, 2011; Balvanera *et al.*, 2012). La mayor extensión de BST se encontraba en la planicie Caribe con 735.514 ha, pero precisamente por su alta fertilidad se convirtió en centro de prácticas antropogénicas las cuales conllevaron a transformaciones ecosistémicas con fines de utilidades económicas cuantificadas en un 53% (Sampedro *et al.*, 2014). Gracias a esto se han formado parches inmersos dentro de zonas agrícolas y ha disminuido la calidad de la matriz por procesos erosivos y de aridización (Pizano y García, 2014; Acevedo, 2016). Las anteriores situaciones han conllevado a que este ecosistema tenga un alto grado de amenazas por degradación excesiva (Miles *et al.*, 2006).

La dinámica de transformación de los ecosistemas, ha generado una disminución en la disponibilidad de alimentos, así como de sitios de reproducción para muchos grupos de animales afectando negativamente a la diversidad taxonómica y funcional (Nichols *et al.*, 2009). En el Caribe colombiano inicialmente se tenían registros altos de riqueza de especies de escarabajos coprófagos entre 35 a 32 (IAvH, 2009; Solís *et al.*, 2011) y otros registros más recientes muestran menores valores que oscilan entre 8, 11 y 23 (Martínez *et al.*, 2010; Rangel *et al.*, 2016a; Rangel *et al.*, 2016b; Rangel-Acosta y Martínez-Hernández, 2020).

El posible origen de las disminuciones reportadas puede estar asociado a que los escarabajos coprófagos son sensibles a la fragmentación y transformación de los hábitats, por sus requerimientos de dietas y su dependencia de heces procedentes de grandes mamíferos principalmente primates (Cambefort, 1991; Cultid *et al.*, 2012). Sumado a lo anterior, está la baja capacidad de dispersión de la mayoría de las especies y el requerimiento de grandes extensiones de bosque conservado para el mantenimiento de sus poblaciones (Halfpter y Halfpter, 1989; Offerman *et al.*, 1995).

Las comunidades de escarabajos coprófagos se organizan en tres gremios tróficos conocidos como paracópridos, telecópridos y endocópridos (Hanski y Cambefort, 1991). Todos estos tienen un papel ecológico importante porque definen el componente productivo del suelo al participar en el reciclaje de nutrientes (Sitters *et al.*, 2014) como activos descomponedores de excedentes metabólicos, principalmente de heces de mamíferos. Lo anterior favorece el mantenimiento de la fertilidad y aireación del suelo (bioturbación), gracias a la remoción y enterramiento de recursos, mineralización de la materia orgánica, dispersión secundaria de semillas y control de parásitos (Vulinec, 2002; Bang *et al.*, 2005; Nichols *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2010; Giraldo *et al.*, 2011; Manning *et al.*, 2016). Esta actividad también incrementa la concentración foliar de nutrientes en plántulas tropicales (Santos-Heredia *et al.*, 2016) y en ambientes ganaderos remueven las bostas de excremento evitando que se contamine el forraje para ganado por acumulación de excremento y contribuyen a la reducción de pérdida de nitrógeno (Doube, 2018).

Dentro de estos escarabajos se encuentran especies con diferentes grados de sensibilidad a perturbaciones del medio y de importancia funcional (Spector, 2006), por lo que su seguimiento también daría información de la presencia de otros taxones. Gracias al gradiente de sensibilidad y los servicios que prestan, se ha escogido a esta comunidad como un punto de referencia para realizar estudios de monitoreo de biodiversidad, funciones ecológicas y de evaluación de la eficiencia de áreas restauradas (Audino *et al.*, 2014; González-Tokman *et al.*, 2018). Además, se han tenido en cuenta en la toma de decisiones a nivel local y regional, cuando se analizan diversos gradientes de disturbio en los ecosistemas, debido a que su capacidad como bioindicadores se ve incrementada por su precisa respuesta a modificaciones de su hábitat (Gardner *et al.*, 2008; Nichols *et al.*, 2008).

2.6. Genética de poblaciones y conservación de especies

2.6.1 Origen y consecuencias de la fragmentación de poblaciones en el *pool* genético

El término de metapoblación clásicamente desde su introducción por Levins (1969) involucró la heterogeneidad ambiental y su efecto en las especies, se puede entender como un conjunto de subpoblaciones que se instalan en fragmentos de hábitats adecuados (Keeling, 2002), las cuales constituyen una población local. Por otra parte, modificaciones posteriores del concepto la definen haciendo referencia a un conjunto de poblaciones locales estructuradas espacialmente, cuyo mantenimiento en el tiempo se debe a procesos de extinción y recolonización, donde dichas poblaciones tienen una limitada dispersión entre ellas (Pannell *et al.*, 1999). Esto último determina el rango geográfico que podrá ocupar dicha especie y es un rasgo de la historia de vida que afecta el *fitness* en paisajes heterogéneos (Diekmann *et al.*, 1998; Hanski, 1998; van Nouhuys, 2009).

El concepto de metapoblación es útil para entender los efectos de la fragmentación de un hábitat inicialmente continuo, sobre la biodiversidad; bien sea por cambio climático, intensificación agrícola y/o deforestación (Opdam, 1991); de esta manera es posible que una especie puede comportarse como metapoblación en algunos casos por causa de estas alteraciones. Lo anterior puede afectar procesos propios de metapoblación como expansión y contracción del rango (Anderson *et al.*, 2009) por cambios en la tasa de extinción y colonización (Ontiveros *et al.*, 2019). Al fragmentarse el paisaje y perder conectividad, las especies pueden extinguirse localmente por afectarse negativamente su capacidad de persistencia y expansión, dichos procesos tienen efectos más marcados en la dinámica de poblaciones pequeñas, donde se pueden eliminar aleatoriamente linajes genéticos o se puede limitar la diversidad genética debida a colonización de pocos individuos por efecto fundador (Boughton, 1999; van Nouhuys, 2016). Esta diversidad se refiere a la variación en las secuencias de ADN de diferentes individuos de una especie o población (Ellegren y Galtier, 2016).

Desafortunadamente las especies en hábitats fragmentados, aunque tengan características de metapoblaciones, generalmente muestran los efectos negativos de endogamia y se incrementa el riesgo de extinción (Frankham *et al.* 2010; Nonaka *et al.*, 2019). Esto puede presentarse, aunque se encuentre en abundancia alta, ya que su entorno se ha reducido y no está en condiciones adecuadas para su persistencia a largo plazo, como sucede en la llamada deuda de extinción (Rybicki y Hanski, 2013). Lo anterior queda evidenciado para escarabajos coprófagos, para los cuales se ha demostrado que, tras un esfuerzo de restauración ecológica, donde se evidencia recuperación de la cobertura vegetal, esta no implica una recuperación proporcional de las comunidades coprófagas (González-Tokman *et al.*, 2018).

Dentro de los factores clave que determinan la interacción de las especies y la dinámica local se encuentran el número de parches, la distancia entre ellos, la movilidad de la especie, el tamaño de la población local (Tromeur *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Estos factores se analizan en conjunto con otros componentes claves de los nuevos modelos de metapoblaciones como el grado de conectividad entre unidades de paisaje, modelos de dispersión espacial, cambio climático y se articulan con modelos más tradicionales como el Modelo de Nicho Ecológico. Esta combinación ha sido una herramienta para demostrar que algunas especies responden de mejor manera cuando la conectividad entre áreas es alta (Mestre *et al.*, 2015).

La manera como interaccionan las poblaciones de una especie es por medio de un término clave en genética de poblaciones conocido como, flujo génico, el cual implica transferencia exitosa de alelos de una población a otra (Ellstrand y Rieseberg, 2016). Por esto se ve involucrado en la determinación de la estructura poblacional, ya que sus patrones y niveles marcan hasta qué punto las poblaciones involucradas evolucionan independientemente; porque esta fuerza evolutiva puede marcar cohesión entre poblaciones de una misma especie, y su reducción entre poblaciones incrementa los procesos estocásticos por deriva génica (Slatkin, 1987; De-Lucas, 2009; Barker y Wilson, 2010).

Un método para cuantificar el flujo génico se hace a través de la estimación del número de migrantes efectivos Nm , el cual resulta del producto del tamaño poblacional por la tasa de migración (Larson *et al.*, 1984). Las estimaciones pueden venir de métodos directos o indirectos, donde en los primeros se realizan observaciones y experimentos como captura y recaptura, pero los datos obtenidos de ellos no pueden interpretarse a escala evolutiva sino como un registro de un determinado momento, ya que no tienen el poder de resolución para determinar si un migrante tuvo una reproducción exitosa (Whitlock y Mccauley, 1999; Piñero *et al.*, 2008b). En el caso de los métodos indirectos analizan la distribución alélica espacial y posteriormente se realizan inferencias de patrones de flujo génico entre poblaciones (Slatkin, 1985). Bajo tales supuestos se puede interpretar que un limitado flujo génico puede causar diferenciación entre poblaciones locales, dicha diferenciación entre subpoblaciones da información sobre el grado de conectividad y diversidad de ambientes en los que se encuentran (Piñero *et al.*, 2008a); esto promueve la adaptación local, acompañado del hecho de que la variabilidad genética dentro de estas disminuye con la estructura poblacional (Wade y McCauley, 1988; van Nouhuys, 2016).

Uno de los términos cruciales para realizar estudios espacio temporales en genética es la medida de diferenciación, entendida como estructura genética poblacional. Esta fue propuesta por Wright (1965), quien planteó que las poblaciones de una especie que se extienden en cierto rango geográfico, pueden estar divididas a su vez en subpoblaciones por diversos factores como heterogeneidad ecológica, comportamientos diferenciales o aislamiento geográfico; llevando a que se diferencien unas de otras según el flujo génico

existente entre ellas y el tamaño poblacional de cada una (Whitlock y McCauley, 1999). De esta forma, las poblaciones de tamaño pequeño y escaso flujo génico tenderían a diferenciarse más por procesos de deriva genética (Masel, 2011), que aquellas grandes y con mayores tasas de migración. Por esta razón, conocer la diferenciación poblacional implica analizar aspectos como dispersión de la especie, etología de apareamiento y delimitación poblacional (Hazlitt *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2016).

2.6.2. La diversidad genética como herramienta para la conservación de especies y ecosistemas

Los escarabajos coprófagos se han utilizado para determinar cambios en la diversidad entre fragmentos y hábitats adyacentes (Noriega *et al.*, 2007; Andresen, 2008; Jiménez-Ferbans *et al.*, 2008; Barraza *et al.*, 2010; Kohlmann *et al.*, 2010; Delgado-Gómez, 2012; Sullivan *et al.*, 2018; Tonelli *et al.*, 2019); sin embargo la mayoría de estos estudios se han centrado en determinar índices de diversidad y cuantificar abundancia con análisis tradicionales, mientras que la valoración de la dinámica de poblaciones y de la diversidad genética de las especies coprófagas de los fragmentos de BST no ha sido considerada en tales estudios. Este componente debe ser incorporado, ya que ayuda a determinar unidades de conservación acertadamente, considerando que no siempre hay homogeneidad genética en las poblaciones de las especies a raíz de una posible estructura poblacional (Coates *et al.*, 2018). Además, con los datos obtenidos se puede evidenciar si existe diferenciación genética por distancias geográficas, que a su vez da información del grado de flujo genético, riesgo de endogamia y/o erosión genética por disminución de los tamaños poblacionales que incrementan la deriva genética.

Los estudios que pretenden evaluar el grado de afectación del componente genético por procesos de intervención antropogénica en áreas naturales, se hacen relevantes cuando se habla de grupos de importancia económica y productiva como los escarabajos coprófagos de la subfamilia Scarabaeinae. Se esperaría que la actual condición de calidad disminuida de las matrices de BST no estén cumpliendo su rol de parches óptimos habitables y requieran enfoques de gestión integral para albergar a esta especie, considerando que a pesar de que se han declarado zonas de reserva para la protección del BST como Montes de María, Parques Naturales Tayrona, Santuario de Flora y Fauna los Colorados, Serranía de Coraza, reservas en el Atlántico (ALPEC, 2008; Aguilera-Díaz, 2013; Vargas-Zapata *et al.*, 2015), estudios recientes concluyen que la actual extensión del BST en el Caribe no excede las 430.000 hectáreas (FCDS, 2016). Bajo ese orden de ideas hay que tener presente que el conocimiento genético si bien no puede prevenir la pérdida de hábitat, sí puede ayudar en el diseño y manejo adecuado de estrategias de restauración de este.

En términos generales la pérdida de áreas naturales y la no inclusión del componente genético en planes de manejo, desencadena problemas como la fragmentación de poblaciones que podría representar una pérdida de integridad genética (Hiltsdorf y Krieger,

1998; Laikre *et al.*, 2005). Esto genera a su vez la interrupción del flujo génico, pérdida de variabilidad genética por disminución de heterocigosidad ventajosa a expensas de una disminución de expresión de alelos raros y homocigosis (Leonardi *et al.*, 2012). Lo anterior va acompañado de un incremento en los niveles de contaminación, los cuales pueden hacer disminuir la diversidad genética de las poblaciones comprometiendo la capacidad de adaptación a ambientes cambiantes como el BST (Franke y Fischer, 2013).

Otro de los problemas originados tras la fragmentación de poblaciones es la disminución del tamaño poblacional, que conlleva a estocasticidad demográfica y erosión genética (Luquet *et al.*, 2013). La erosión genética entendida como la pérdida de diversidad genética por deriva y endogamia, puede amenazar a las poblaciones donde las opciones de dispersión son limitadas (Moodley *et al.*, 2017). Particularmente la escasa conectividad entre áreas conlleva a que la movilidad de las especies quede restringida entre estos fragmentos por obstaculizar la dispersión (Ouborg *et al.*, 2006). Estudios han demostrado que la endogamia afecta negativamente ciertos rasgos relacionados con el *fitness* en algunas especies de escarabajos como la producción de huevos y la tasa de eclosión de estos (Müller y Juškauskas, 2018).

Específicamente los Scarabaeidae necesitan bosques con buena extensión para mantener correctamente las comunidades (Nichols *et al.*, 2008), por lo que se hace prioritario elaborar planes de manejo pertinentes, y la correcta implementación de esfuerzos efectivos para poblaciones de especies prioridades de conservación dependerá en gran medida de su variación genética (Dawson *et al.*, 2009; Allendorf *et al.*, 2010). Este componente genético es importante, debido a que permite complementar análisis más tradicionales como evaluación de riqueza y abundancia para el monitoreo de especies de insectos (Liu *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013; Machkour-M'Rabet *et al.*, 2014). Además, los datos genéticos permiten hacer inferencias sobre procesos históricos y actuales en el paisaje que modelan el intercambio de organismos (Feder *et al.*, 1994; Via *et al.*, 2000).

2.6.3. Polimorfismos de Nucleótido Simple “SNPs” como marcadores moleculares

Inicialmente los estudios de genética de poblaciones presentaban ciertas limitaciones tecnológicas y estadísticas por lo que trabajaban con un número reducido de marcadores moleculares mapeados en especies con genomas y secuencias de referencia conocidos preliminarmente (Seeb *et al.*, 2011). Sin embargo, gracias al avance significativo de un compendio de técnicas como la nueva generación de secuenciación (NGS), y un mayor poder bioinformático para analizar los datos; ahora se puede hacer uso de un número elevado de marcadores por muestra, en muchos organismos a costos económicos rentables (Nielsen *et al.*, 2011), empleando secuenciación masiva en paralelo, en el orden de cientos a cientos de miles de sitios polimórficos altamente informativos como un conjunto denominado “Polimorfismos de Nucleótido Simple” (SNPs) por sus siglas en inglés. Esto implica una resolución más elevada en el grado de mapeo de genomas en organismos no

modelos (Helyar *et al.*, 2011), que pueden ser herramientas muy útiles para ejecutar manejos de especies que carecen de genomas ensamblados (Wachi *et al.*, 2018) como *D. guildingii*.

Los SNPs son variaciones de la secuencia del material genético, que ocurren cuando un nucleótido en la secuencia del genoma es sustituido por otra base nucleotídica (Koopae y Koshkoiyeh, 2014). Pueden entenderse como una posición ortóloga variable a través de los genomas comparados, cuyo origen se encuentra en mutaciones que generan cambios diferenciales entre las bases de las secuencias cromosómicas o indels de una sola base, y se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma con una alta abundancia (Leaché y Oaks, 2017).

Por lo general son de naturaleza bialélica por lo que su genotipado es relativamente fácil (Freeland *et al.*, 2011; Hess *et al.*, 2011; Kirk y Freeland, 2011). Su modo de herencia es co-dominante y son heredables de forma estable (Vignal *et al.*, 2002). Además, ofrecen más información que una batería limitada de microsatélites, tienen alto rendimiento con posibilidades de modificación y personalización, tasas relativamente bajas de error, así como la comparación entre resultados de distintos laboratorios (Morin *et al.*, 2004; Leaché y Oaks, 2017). A nivel económico son rentables y son detectables por ensamblaje de *novo* y métodos de genotipificado por matrices y secuenciación (Brumfield *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2011; Ree y Hipp *et al.*, 2015). Estos marcadores son muy poderosos para evaluar estructura genética y en términos generales dan una visión muy completa a nivel genómico, lo que es fundamental en estudios donde el genoma se ve afectado diferencialmente entre regiones, al punto de encontrarse en este grupo de marcadores cerca del 90% de las diferencias entre individuos y adicionalmente son la opción más favorable para hacer estudios poblacionales debido que se constituyen en la mejor fuente de variación genética (Fröhlich *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta lo anterior, ellos aportan significativamente al entendimiento de la genómica de las especies no modelos (Elshire *et al.*, 2011; Torkamaneh *et al.*, 2018; Aguirre *et al.*, 2019); ya que suministrarán información nueva para grupos como los escarabajos coprófagos, donde los estudios en América del Sur son escasos a nivel de diversidad genética.

Gracias a estos sitios polimórficos y las ventajas asociadas a ellos, se han podido realizar estudios en distintos taxones de vertebrados e invertebrados, enfocados a investigar diversificaciones recientes, relaciones filogenéticas, estructuras filogeográficas, flujo génico (Emerson *et al.*, 2010; Hickerson *et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2017), entre otras aplicaciones, por su versatilidad y alto poder de resolución para estructura genética de poblaciones. Para lograr incorporarlos a las diferentes categorías de investigaciones se ha necesitado recurrir a distintos métodos para la detección y genotipificado de SNPs, pasando por diferentes plataformas de secuenciación, desde la tradicional Sanger hasta nuevos

enfoques por NGS (Vignal *et al.*, 2002; Seeb *et al.*, 2011). En este último se encuentra un set llamativo de herramientas basadas en enzimas de restricción llamadas RAD-seq, usando secuenciación Illumina que permite detectar cientos y miles de marcadores en muchos individuos a un costo razonable (Etter *et al.*, 2011).

2.7. RAD-seq: Secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción y su derivado ddradseq.

Uno de los avances más poderosos fue el desarrollo de la técnica de “Secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción” (RAD-seq), porque permitió el descubrimiento de miles de marcadores moleculares de manera relativamente sencilla y siendo accesible económicamente, por lo cual se aplicó a múltiples investigaciones en áreas como evolución y genética de poblaciones (Luikart *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2011). Esta metodología se basa en un enfoque de reducción de la complejidad del genoma en el que se emplean como herramientas, enzimas de restricción, las cuales provienen principalmente de bacterias, y tienen actividad endonucleasa porque cortan con frecuencia diferencial el ADN en secuencias específicas, por lo que cuentan con mucha aplicabilidad biotecnológica (Buckhout-White *et al.*, 2018). En especial son útiles para analizar *loci* en todo el genoma y aportan información de la variación poblacional (Avisé *et al.*, 1979). Para este método dichas enzimas se usan en combinación con NGS para obtener datos de secuencia que estén cerca a sitios de corte de endonucleasas de restricción tanto en regiones codificantes como no codificantes (Baird *et al.*, 2008; Van Tassell *et al.*, 2008). Las secuencias obtenidas por el corte si exhiben polimorfismos pueden usarse como marcadores genéticos llamados RADs y gracias a esto es un método útil para explorar a un nivel reducido un rango del genoma de un organismo de interés que oscila entre el 0,1 al 10% (Jungwirth, 2017).

Normalmente después de la digestión se ligan a los extremos de los fragmentos digeridos unas secuencias cortas de nucleótidos cuya longitud oscila entre 4 y 8 pb, que se añaden al comienzo y en las etapas finales de la técnica, conocidas como *barcodes* e *index* respectivamente; cuando se usan en conjunto reciben el nombre de *barcoding combinatorial* y ayudan a otorgar individualidades a las muestras porque favorecen que solo se secuencien las regiones diana de ADN genómico adyacentes a los sitios de corte y a su vez permiten analizar más muestras a menor costo (Andrews *et al.*, 2016; López de Heredia, 2016).

Una de las diferencias entre el RADseq original y su derivado conocido como RAD con doble digestión enzimática descrito por Peterson *et al.*, (2012) es que en este último se emplean dos enzimas, normalmente una de corte raro y otra de corte frecuente lo que contribuye de manera robusta a la reducción en el número de *loci* muestreados, aumento de la cobertura y de la eficacia en la detección de SNPs, sumado al hecho de que se puede optimizar para especies no modelos y permite entender la variación aleatoria en el genoma (Shirasawa *et al.*, 2016; Scheben *et al.*, 2017; Aguirre *et al.*, 2019). Otra de las diferencias relevantes es que en ddradseq hay un paso de selección de tamaño de corte en gel, que se

traduce en un mayor control de la fracción de regiones analizadas en la biblioteca final, generando solo un subconjunto en el que se encuentran únicamente los fragmentos que fueron cortados por ambas enzimas que tienen el tamaño fijado por el investigador (Peterson *et al.*, 2012); esta rigurosidad de selección de tamaño favorece el número de lecturas en los análisis sin necesidad de un genoma de referencia (Hohenlohe *et al.*, 2011; Kai *et al.*, 2014).

El ddradseq posee atributos que lo hacen aplicable a genomas complejos porque el número de *loci* pueden regularse por las enzimas y el rango de tamaño escogidos, lo que ayuda al incremento de la cobertura óptima en los análisis (Andrews *et al.*, 2016; Aguirre *et al.*, 2019). Adicionalmente tiene menores tasas de error que otras técnicas de digestión enzimática y cuenta con métodos para detectar duplicados de PCR (Schweyen *et al.*, 2014). Además, en combinación con la implementación del protocolo de secuenciación *single-end*, ayuda a incluir una cantidad significativa de variación informativa a un costo mas económico que la *paired-end* (Guillardín-Calvo *et al.*, 2019).

Sin duda la implementación de las técnicas RADseq y sus derivados han favorecido la exploración con alta profundidad de *loci* y han ayudado a la identificación veraz de miles de marcadores moleculares como SNPs (McAndrew y Napier, 2011) en especies no modelos y de aquellas que poseen genomas complejos. También han ayudado a realizar evaluaciones a nivel intra-poblacional o entre especies relacionadas, porque se conservan varios sitios de corte, conllevando a que se suelen compartir la mayoría de *loci* (Cariou *et al.*, 2013). El proceso general de trabajo se describe en Peterson *et al.*, (2012), y se ilustra en la figura 4.

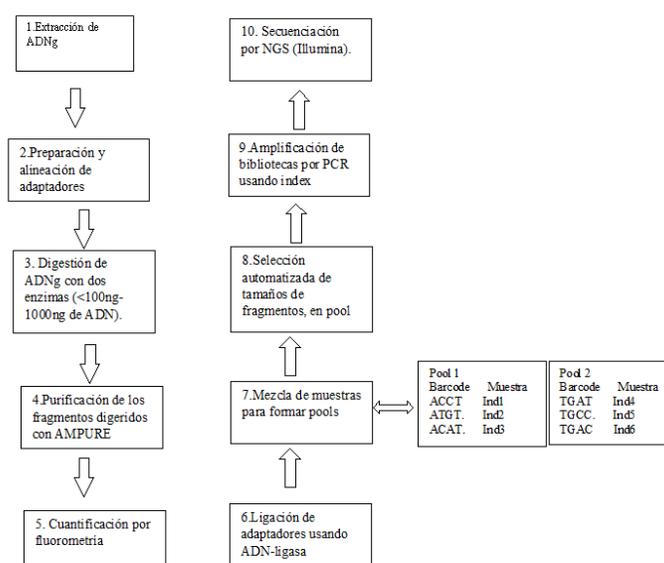


Figura 4. Esquema general de protocolo ddradseq (González-Molina y Martínez-Hernández, 2020).

2.8. Estimadores de diversidad genética para estudios poblacionales

La diversidad genética es el componente elemental de la biodiversidad, que se define como las variaciones heredables que ocurren entre los individuos de una población y entre las poblaciones de una especie (Piñero *et al.*, 2008a). A nivel de especie dicha variación se expresa como diferencias entre individuos y a nivel poblacional puede ser interpretada como diferencias en el fenotipo y frecuencias alélicas (Garg y Mishra, 2018). Los factores que influyen directamente la diversidad genética exhibida por un taxón son la tasa de mutación, el tamaño poblacional y aspectos demográficos y propios de su historia de vida (Singhal *et al.*, 2017).

Anteriormente se tenía rezagada la inclusión de estudios de diversidad genética cuando se desarrollaban actividades de conservación de la biodiversidad (Laikre *et al.*, 2009). En los últimos años se ha tomado conciencia de la vital importancia de conservar la diversidad genética en ecosistemas terrestres y acuáticos porque está involucrada en el rendimiento ecológico y en la capacidad de resiliencia de las especies ante ambientes fluctuantes (Schaberg *et al.*, 2008; Abu-Zaitoun *et al.*, 2018). La mencionada diversidad, es importante ya que actúa a diferentes escalas por involucrar la varianza de rasgos fenotípicos, bien sea a nivel individual como heterocigosidad, a nivel poblacional como diversidad genotípica y a nivel regional como adaptación local; estos aspectos de la diversidad genética modelan fuertemente su rol en el ecosistema (Engelhardt *et al.*, 2014), y los estimados de esta diversidad dan mucho soporte a las evaluaciones de biodiversidad para propósitos de conservación (Goodall-Copestake *et al.*, 2012). Se requieren que todas las escalas sean contempladas durante la ejecución de un proyecto de biodiversidad para que este sea efectivo (Bischoff *et al.*, 2010), en específico cuando se están alterando tanto las condiciones locales, al punto que se ha determinado que la degradación del hábitat y el cambio climático llevan a una reducción del flujo génico, del tamaño efectivo y la variación genética, lo que comprometería la capacidad de adaptación (Bernatchez, 2016).

Los usos potenciales del conocimiento de la diversidad genética y la determinación de la estructura genética de las poblaciones de una especie desde un enfoque espacio-temporal pueden facilitar la sostenibilidad a largo plazo de estas y su adecuada explotación, ya que los vacíos de información sobre dicha estructura durante un plan de gestión podrían conllevar a la subdivisión de la población disminuyendo su variación genética (Laikre *et al.*, 2005). Por esta razón, una de las aplicaciones directas de este conocimiento básico se da en la biología de la conservación proponiendo métodos que generen patrones de flujo génico; los cuales permitan mantener dicha variación, localizar genes implicados en adaptación a nuevas condiciones y minimizar a su vez los efectos de la deriva génica en la sobrevivencia de estas especies (Eguiarte *et al.*, 2013).

Para enriquecer el marco conceptual de genética de poblaciones se han desarrollado términos importantes como diversidad nucleotídica (π) y haplotípica. La primera se entiende como el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos o más secuencias escogidas aleatoriamente (Nei y Li, 1979; Hamilton, 2009) y la segunda como la probabilidad de que dos haplotipos (grupos de SNPs) elegidos al azar sean diferentes, respectivamente (Nei, 1987). La diversidad nucleotídica puede ser interpretada como heterocigosidad esperada y se basa en el conteo de i -ésimo alelo en la muestra (Hohenlohe *et al.*, 2010). Esta diversidad es dependiente de la historia de vida mientras que la haplotípica se refiere al escalamiento de la medida considerando la distancia entre haplotipos, que se calcula como el número de desajustes nucleotídicos entre estos. También se ha acompañado del descubrimiento de marcadores moleculares genéticos, en sentido estricto estos hacen referencia a segmentos de ADN situados en un *locus* específico del genoma y cuya herencia se puede rastrear (Botstein *et al.*, 1980). La combinación de ambos factores permite medir la diversidad a través de distintos índices de cuantificación y se establece el grado de diferenciación del ADN entre individuos. Dentro de estas métricas está el número de alelos por *locus* (N_A), número efectivo de alelos (N_E) (Kimura y Crow, 1964), número de alelos privados (N_P) (Barton y Slatkin 1986) y heterocigosidad (Barrandeguy y García, 2014).

Cuando se busca estudiar la diversidad genética total de una especie en estado natural deben considerarse los componentes intra e interpoblacional. Para calcular la variación intrapoblacional por lo general se estima la heterocigosidad esperada (Nei, 1978), ya que esta cuantifica la igualdad o equitatividad de las frecuencias alélicas en los *loci* sin arbitrariedades y puede ser calculada a partir de estas, partiendo de la premisa de que la población está en equilibrio de Hardy –Weinberg (HWE).

Cuando se contrasta la heterocigosidad observada (H_O) con la esperada (H_E) se puede determinar la estructura genética de las poblaciones, acompañado del empleo de los estadísticos basados en conceptos de Sewall Wright conocidos como estadísticos F (Wright, 1943; 1951) y sus análogos. Wright consideró que las poblaciones podían estar subdivididas por lo cual debían hacerse interpretaciones biológicas y tomar en cuenta el tipo de apareamiento entre individuos (Wright, 1965). De esta manera en genética se han establecido análisis donde se relacionan genes homólogos de un nivel de subpoblación y se comparan con cualquier nivel superior tales como el estudio de los genes de los individuos frente a los de la población total por medio del F_{IT} , la correlación entre los genes de los individuos y los de la subpoblación (F_{IS}), además de la correlación entre genes de la subpoblación con respecto a los de la población total (F_{ST}) (Weir, 2012).

La principal medida que se toma para cuantificar la estructura genética de las poblaciones es el estadístico F_{ST} , debido a que es un estimador directo de la varianza de las frecuencias alélicas entre poblaciones y a su vez da información sobre el grado de similitud genética entre los individuos de una misma población (Willing *et al.*, 2012). Valores muy altos de F_{ST} indican marcadas diferencias entre las frecuencias alélicas de poblaciones (Leng y Zhang, 2011).

La variabilidad genética interpoblacional y su culminación en estructura genética están relacionadas, pero no necesariamente de manera lineal con la distribución espacial de poblaciones que exhiben diferencias genéticas (González, 2011). Cabe destacar que no se establece una relación directa entre el componente espacial y la distribución de la variabilidad interpoblacional ya que otros factores pueden influir y afectar esta variable como aspectos geográficos y/o biológicos como la capacidad de migración de los taxones (Frankham *et al.*, 2010).

3. ANTECEDENTES

3.1. Antecedentes de aplicaciones de marcadores moleculares en estudios de diversidad genética

Los marcadores moleculares genéticos tienen como requisito que se transmitan según las leyes básicas de la herencia mendeliana, deben exhibir alta heredabilidad, independencia de condiciones ambientales, una gran capacidad para detectar índices de polimorfismo, ser fácilmente disponibles, fenotípicamente neutros y altamente reproducibles (Khan, 2015). Gracias a sus propiedades la aplicación de marcadores moleculares en estudios de diversidad genética en insectos ha ido en aumento en las últimas décadas (Arif *et al.*, 2011), en especial cuando se habla de casos donde se involucra la conservación de las especies con poblaciones fragmentadas y en peligro de extinción (Sielezniew *et al.*, 2012). Lo anterior, implica una comprensión de la variabilidad genética intra e interpoblacional, las cuales ayudan a entender detalladamente su dinámica y estructura metapoblacional (González, 2003; Kang *et al.*, 2012).

En los últimos años se ha despertado el interés en la valoración de las comunidades de escarabajos coprófagos por sus hábitos y sensibilidad a perturbaciones medioambientales, que permiten utilizarlos como herramienta en la caracterización biológica de ecosistemas y como grupo indicador para determinar diferencias entre hábitats y elementos del paisaje (Davis *et al.*, 2004; Spector, 2006). Esto cobra particular importancia en el desarrollo de planes de conservación y monitoreo enfocados a procesos de restauración ecológica desarrollado en Colombia por el IAvH (2016).

La expansión de los diferentes marcadores genéticos para su estudio en insectos, se ha desarrollado gracias al avance de técnicas y equipos en biología molecular como hibridación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Erlich y Arnheim, 1992) y secuenciación con las últimas tecnologías (Fumagalli *et al.*, 2013). Esto ayudó a incrementar la variedad desarrollada de marcadores moleculares de primera, segunda y tercera generación; en particular su escogencia y amplia aplicación en estudios de diversidad genética ha dependido mucho de la pregunta específica de investigación, del tiempo requerido en su ejecución y de su costo.

Una de las técnicas de marcadores moleculares foco de investigación han sido los llamados microsatélites, que corresponden a secuencias cortas de uno a seis pares de bases nucleotídicas que se repiten en tándem un elevado número de veces; son altamente variables, entre y dentro de individuos, destacando que la variación se manifiesta normalmente como diferencias en la longitud entre los distintos alelos del mismo *locus* (Selkoe y Toonen, 2006).

Particularmente en escarabajos, los esfuerzos se han centrado en obtener altas tasas de éxito en el aislamiento y caracterización de estas repeticiones en su genoma, como los estudios de Sembène *et al.* (2008) enfocados en demostrar el flujo de genes entre poblaciones del escarabajo fitófago *Caryedon serratus*. Manjeri *et al.*, (2011) consiguieron la identificación de un promedio de 62% de *loci* polimórficos a partir de microsatélites para el entendimiento de la estructura genética de seis poblaciones de *Oryctes rhinoceros*, buscando mitigar su propagación, ya que es una fuerte plaga en los cultivos forestales tropicales. Otros por su parte ya han hecho estudios de diversidad genética asociada a fecundidad y poliandria como el descrito por Rafter *et al.*, (2018).

Por otro lado, algunos han recurrido al empleo de polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) como el análisis genético de una especie europea de escarabajo curculiónido (Yadav *et al.*, 2017). Otros se han enfocado en escarabajos propios de regiones cafeteras y diferentes investigaciones se han realizado con especies invasoras plagas como *Lissorhoptus oryzoophilus* en China y Brasil (Kazachkova *et al.*, 2008; Gil *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017) y la secuenciación de genes mitocondriales como ATP6 con Raqsec en *Staphylinus erythropterus* Linné, 1758 (Giska *et al.*, 2015). Por su parte, estudios separados se han centrado en la variabilidad genética en los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de especies utilizadas como control de plagas, tal es el caso de un conjunto de especies de escarabajos de pulgas del género *Aphthona*, tras 15 años de su introducción en localidades norteamericanas (Roehrdanz *et al.*, 2011). Otras investigaciones destacadas se han centrado en estudios aplicados a escarabajos longicornios, encontrándose que la variabilidad genética de poblaciones reintroducidas fue menor con respecto a las fuentes de origen, y sentó las bases para la conservación de la especie *Cerambyx cerdo* (Drag y Cizek 2015).

Para el caso de estudios de diversidad genética en escarabajos coprófagos de la subfamilia Scarabaeinae se resaltan los realizados por Sole (2005), para el aislamiento de marcadores microsatélites dirigidos al género *Scarabeus*. Este se realizó, bajo la combinación de protocolos enriquecidos como FIASCO, con la intervención de hibridación selectiva, obteniendo una optimización y estandarización del método para el género en cuestión, con la consecución de cuatro *loci* potencialmente polimórficos. Además, se destaca el estudio realizado por Whipple (2011), quien describió la ecología de los escarabajos coprófagos y analizó la variación genética de *Digitonthophagus gazella* mediante AFLP, encontrando que genéticamente las poblaciones evaluadas de Puerto Rico y África son distintas y que se encuentran en aislamiento genético.

Recientes estudios demostraron como se afectaba la diversidad genética de *Canthon (Peltecanthon) staigi*, encontrando que la menor heterocigosidad esperada estuvo en áreas con alto grado de disturbio y menor extensión en superficie (Ferreira-Neto *et al.*, 2017).

Esto es preocupante, ya que la heterocigosidad se ha relacionado con aspectos claves en el *fitness* como resistencia y reproducción (Danzmann *et al.*, 1988; Schmeller *et al.*, 2007).

Por otra parte, también se ha demostrado en *Bolitophagus reticulatus* (Knutsen *et al.*, 2000) y *Carabus problematicus* (Gaublomme *et al.*, 2013), los efectos de la drástica diferenciación entre poblaciones (Keyghobadi, 2007), producto de la disminución del flujo génico, desencadenada a su vez por la fragmentación de las áreas en las que estas se encontraban.

3.2. Utilización de RAD-seq en estudios aplicados a insectos

Las NGS son herramientas valiosas para evaluar especies no modelos, pero han tenido ciertas limitaciones por la falta de protocolos estandarizados. La alternativa que ha brindado el RAD-seq ha sido notoria porque se pueden abordar investigaciones orientadas a establecer flujo génico, estructura poblacional, migración, filogeografía, identificación de parentesco, etc (Mitchell-Olds *et al.*, 2008; Hohenlohe *et al.*, 2010; Stapley *et al.*, 2010).

Particularmente ha sido especialmente atractivo para insectos porque es aplicable cuando no hay genomas de referencia y por su alta capacidad de flexibilidad a diferentes tipos de investigación (Wachi *et al.*, 2018); la aplicación de este protocolo se documentó en las especies de mariposas *Heliconius melpomene aglaope* y *H. m. amaryllis*, cuando el fin de interés era evaluar las bases genéticas de la adaptación, encontrando por análisis de asociación por mapeo que el factor evolutivo determinante en el mantenimiento de las zonas de hibridación era la selección en el patrón de coloración de dichas mariposas (Nadeau *et al.*, 2014). Otros taxones de lepidópteros han sido explorados genéticamente como el grupo neotropical *Adelphas*, lográndose la reconstrucción filogenética de dicho taxón y de su género hermano; gracias a dicho esfuerzo se pudo encontrar una asociación ecológica con familias de plantas tóxicas y corroborarse un patrón mimético convergente en las alas distribuido a lo largo de todo el género (Ebel *et al.*, 2015).

Otro de los grupos donde pudo resolverse una pregunta de investigación fue con la especie de ortóptero llamada *Teleogryllus oceanicus*, en donde se analizó el rasgo denominado “*flatwing*” en poblaciones de distintas islas hawaianas y se evaluó una posible introgresión (Pascoal *et al.*, 2014), aplicando RAD-seq para la detección de SNPs que se encontraran en desequilibrio de ligamiento con el fenotipo “*flatwing*” en cada población, obteniendo un total de 7.226 marcadores moleculares de ese tipo y demostrando que los datos genéticos asociados a dicho fenotipo son distintos entre las islas evaluadas (Pascoal *et al.*, 2014). Además, gracias al RAD-seq, se pudo esclarecer la filogenia de *Wyeomyia smithii*, mosquitos hospedadores de plantas (Emerson *et al.*, 2010).

Por otro lado, el rol de dicho protocolo fue importante para determinar la divergencia genómica entre poblaciones de una especie del orden Phasmatodea, denominada *Timema cristinae*, que se adaptan a plantas hospedadoras distintas y las cuales fueron sometidas a especiación paralela. Se llegaron a obtener 4.391.556 SNPs, los cuales tuvieron un papel crucial para determinar divergencia genómica paralela entre poblaciones, encontrándose un exceso de genes codificantes con funciones específicas (Soria-Carrasco *et al.*, 2014). Existen estudios en otros taxones donde se ha buscado dilucidar las bases del mutualismo obligado cuando están involucrados procesos de especiación utilizando datos de genoma completo, como el realizado por Wachi *et al.*, (2016), para el cual se hicieron análisis en cuatro especies de avispa del género *Blastophaga* en Japón y Taiwán.

Uno de los estudios bandera con ddRAD-seq donde se pudo identificar diversidad genética, evaluar estructura poblacional y establecer la historia demográfica, fue el realizado por Fouet *et al.*, (2017), en la especie de mosquito *Anopheles moucheti*, la cual actúa como vector de la Malaria en el área de Camerún. De esta manera se encontraron unos buenos estimadores de diversidad genética y sitios polimórficos que según los investigadores incrementan la probabilidad de mantenimiento y capacidad de cambio ante las presiones selectivas por tratamiento médico. Otro estudio a nivel de genómica de poblaciones fue realizado en un grupo de himenópteros para evaluar la posible base genética de los patrones de coloración en una especie de abeja con un amplio espectro fenotípico combinando RNA-seq y ddRAD-seq (Lozier *et al.*, 2016). Por este medio se logró encontrar sets de 7.248 SNPs con la técnica de doble digestión, determinándose divergencia genómica amplia entre los principales linajes, que se encuentra soportada por una diferenciación neutral que radica en la historia poblacional y deriva aleatoria en las poblaciones evaluadas de *Bombus bifarius* en Estados Unidos.

Para el caso particular de escarabajos se destaca el trabajo en filogenómica realizado por Cruaud *et al.*, (2014), en el que queda soportado el empleo de datos RAD-seq para inferir filogenias de eucariotas, tras lograr esclarecer las relaciones entre 18 especies de escarabajos del género *Carabus*. A su vez también dentro de dicho género se exploraron las relaciones entre 32 taxones, distribuidos entre especies pertenecientes al subgénero *Ohomopterus*, con el fin de observar los cambios en los umbrales para determinar ortología y el grado de resolución filogenética que se obtenía (Takahashi *et al.*, 2014). Hay otros reportes de estudios que estuvieron enfocados en detectar variaciones crípticas a nivel genético de la plaga xilófaga de *Xylosandrus crassiusculus*, a lo largo de 12 localidades distribuidas entre Asia, Norte y Centro América y Oceanía. Gracias al descubrimiento de 1.365 SNPs, en términos generales hallaron altos valores de homocigosidad y del coeficiente de endogamia, con otros hallazgos interesantes como la posible especiación críptica entre las poblaciones muy divergentes de Japón con respecto a las del resto del continente asiático (Storer *et al.*, 2017).

Particularmente para escarabajos coprófagos se destaca el realizado en Nueva Guinea por Lam (2017) en el que se estudió la especie *Exocelina manokorienses*. Se encontraron resultados interesantes como una cantidad moderada de variación entre poblaciones, al punto de detectarse subdivisión genética en un transecto de 100km; acompañado de valores de FST que tendieron a ser grandes ($>0,1$), y que permitieron el agrupamiento en dos grupos genéticos distintos que tenían correspondencia geográfica en posiciones orientales y occidentales.

4. PREGUNTA PROBLEMA

Con el fin de contribuir a la generación de conocimiento se planteó la siguiente pregunta de investigación ¿Cómo es la diversidad genética de *D. guildingii* dentro y entre localidades en distintos fragmentos de BST (RCM: Reserva Campesina La Montaña, SFFC: Santuario de Flora y Fauna de Los Colorados y EBPC: Estación Biológica Primatológica de Colosó) en el Caribe colombiano?

5. HIPÓTESIS

Las poblaciones de *D. guildingii* analizadas en los tres fragmentos son genéticamente distintas y existe una estructura genética en el espacio geográfico, debido a la heterogeneidad que presenta el BST en el Caribe colombiano.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Analizar la variación genética de las poblaciones naturales de *D. guildingii* en tres fragmentos de BST (RCM: Reserva Campesina La Montaña, SFFC: Santuario de Flora y Fauna de Los Colorados y EBPC: Estación Biológica Primatológica de Colosó) en el Caribe colombiano.

6.2 Específicos.

Estimar la variación genética intrapoblacional de *D. guildingii* en el área de estudio.

Determinar el grado de diferenciación genética interpoblacional de *D. guildingii* en el área de estudio.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

La recolecta de individuos se realizó en tres fragmentos de Bosque Seco Tropical (BST) en el Caribe colombiano (Fig. 5), con los permisos correspondientes de recolección de especímenes por las autoridades competentes. El primer fragmento se encuentra localizado en la Reserva Campesina La Montaña (RCM), departamento del Atlántico a una altitud que oscila entre 177 y 250 m (Rangel-Acosta *et al.*, 2016a). La segunda localidad es el Santuario de Flora y Fauna de Los Colorados (SFFC), departamento de Bolívar y presenta una altitud que oscila entre los 180 y 440 m (Parque Nacionales Naturales, 2005). El tercer fragmento es la Estación Biológica Primatológica de Colosó (EBPC), departamento de Sucre y presenta una altitud entre 203 y 207 m. La distancia geográfica entre RCM y SFFC es 99,51 Km y entre RCM y EBPC es de 135,86 Km; mientras que la distancia entre esta última y SFFC es 53,74 Km. Las localidades seleccionadas están dentro de la categoría Zonobioma de Bosque Seco Tropical y de acuerdo a su integridad ecológica puede estar disminuyendo la conectividad entre fragmentos (Mesa *et al.*, 2016). Su régimen térmico corresponde a temperaturas superiores a 24°C por lo que exhiben un clima cálido-seco y tienen un periodo bi-estacional de lluvias marcado entre abril o mayo hasta octubre o noviembre, con promedio anual de 900 a 1.200 mm de precipitación (Holdridge *et al.*, 1967; Galván-Guevara y Sierra, 2009; Rangel-Acosta *et al.*, 2018). Con respecto a las características bióticas su vegetación es higrotropofítica (Hernández *et al.*, 1992; Pizano y García 2014) donde se encuentra el BST con especies caducifolias (Rangel y Carvajal, 2012; Aguilera *et al.*, 2013).

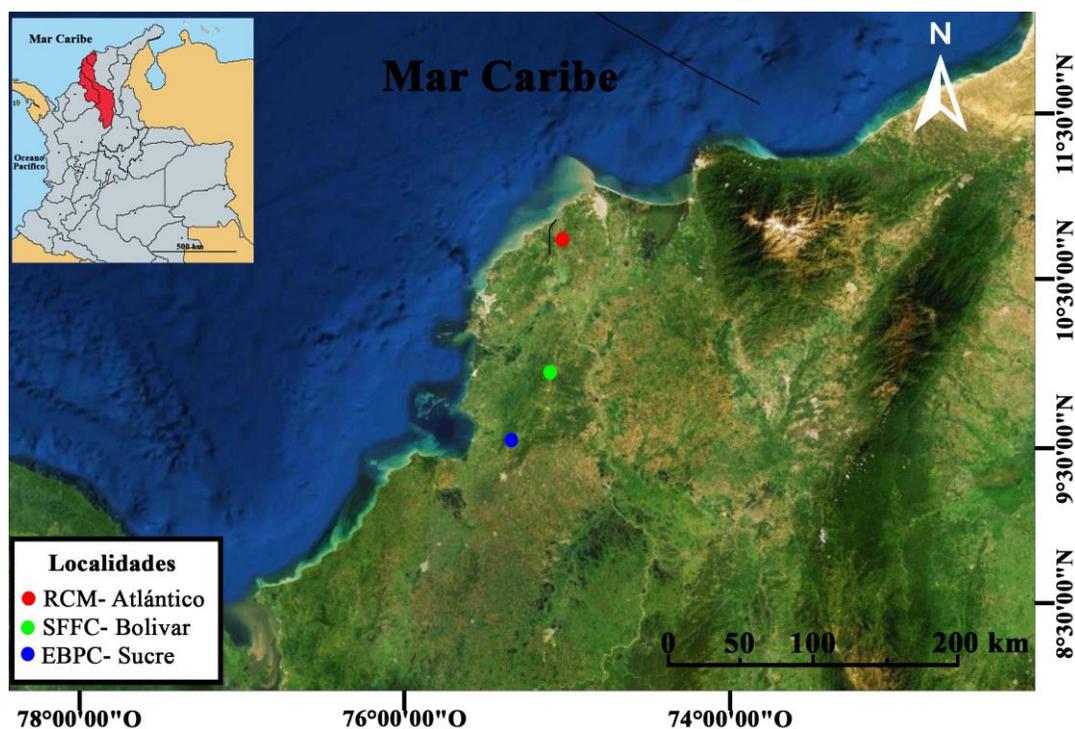


Figura 5. Localidades de BST en el Caribe colombiano escogidas para el presente estudio.

7.1. Procedencia del material biológico. Descripción de las estaciones

Estación Biológica Primatológica de Colosó (EBPC), Sucre

La Estación Biológica “Los Primates”, está ubicada en el municipio de Colosó en el departamento de Sucre (9°31'47.24"N, 75°21'5.81"O). Hace parte de la subregión Montes de María, que es una geofoma de origen miocénico, cuyas características geológicas muestran una procedencia de rocas, mantos de arcilla, y cáliz correspondiente al Cretáceo Superior y Eoceno-Mioceno (IGAC, 1969); particularmente dicha estación se encuentra en la estribación de la Serranía de Coraza-Montes de María (Galván-Guevara y Sierra, 2009).

En esta localidad pueden distinguirse dos tipos principales de vegetación denominadas bosque higrotropofítico y vegetación riparia (Barbosa *et al.*, 1988; Galván-Guevara y Sierra, 2009); y a lo largo de la zona se encuentran predominantemente las familias de plantas, Capparaceae, Fabaceae y Rubiaceae (Herazo-Vitola *et al.*, 2017) (Fig. 6A).

Reserva Campesina “La Montaña” (RCM), Atlántico.

Se encuentra ubicada entre los municipios de Usiacurí y Juan de Acosta (10°46'02,6" N, 75°02'34" O), tiene una extensión aproximada de 365 hectáreas (ha) pero solo 47 corresponden a BST bajo la categoría de zona de reserva campesina (García-Atencia y Martínez-Hernández, 2015), donde la vegetación silvestre se encuentra mayormente representada por la familia Fabaceae (Fig. 6B). Su temperatura promedio oscila entre los 27°C y 31°C (Arteaga *et al.*, 2014). En sus cercanías se realizan prácticas antropogénicas como ganadería (Vargas-Zapata *et al.*, 2015), acompañadas de cultivos agrícolas de maíz y yuca, lo que genera erosión en sus terrenos.

Santuario de Flora y Fauna “Los Colorados” (SFFC), Bolívar.

Se encuentra ubicado en el extremo septentrional de los Montes de María, en el municipio de San Juan Nepomuceno, perteneciente al departamento de Bolívar (9°51'33", 75°06'38"O) con una extensión de 1.000 hectáreas y tiene elevaciones desde los 180 hasta los 440 msnm (Pasquis, 2016). Está enmarcado dentro de la subregión formada por el Río Magdalena, el Canal de Dique y los Montes de María, con temperatura promedio anual de 28°C y un clima cálido (Parques Nacionales Naturales, 2005). Es el relicto más representativo de Bosque Seco Tropical de los Montes de María por su relativo buen estado y continuidad geográfica (Botero-Cruz, 2010; Aguilera-Díaz, 2013), se caracteriza por BST primario y secundario (Fig. 6C), pero además presenta formaciones vegetales de bosque transicional a húmedo, bosque de galería y bajos (Bermúdez-Wilches, 2012). Sus suelos son considerados de bajo o moderadamente evolucionados, con buen drenaje y sus terrenos son plegados y fallados, cuyas unidades geomorfológicas son principalmente escarpes montañosos, cuevas, valle en sinclinal, entre otros (Jiménez *et al.*, 2018).

A.



B.



C.



Figura. 6. Características de zonas de vida de las localidades de estudio. A. Vegetación de la localidad EBPC. B. Vegetación de la localidad RCM. C. Vegetación de la localidad SFFC.

7.1.2. Diseño muestral para la captura de especímenes

En cada localidad se ubicaron cuatro (4) transectos separados entre sí por 500 m, aplicando un muestreo estratificado con el fin de abarcar la heterogeneidad de cada sitio. Por transecto se instalaron cinco trampas *pitfall* modificadas sin líquido letal (Obrist y Duelli, 1996; Császár *et al.*, 2018), para un total de 20 trampas por localidad. Las trampas fueron distanciadas 100 m una de la otra para que no existiera interferencia entre ellas, siguiendo lo sugerido por da Silva y Hernández (2015). Cada trampa consistió en un vaso plástico de 32 onzas enterrado a ras de suelo con un embudo en su abertura, que permitió el ingreso de organismos, pero impidió su salida, otorgando el beneficio de poder liberar otros taxones que no estuvieran bajo estudio y disminuir la pérdida de individuos en las áreas. El atrayente utilizado fue una mezcla de excremento humano y vísceras (hígado) cuyo peso aproximado fue de 80 g, envuelto en gasa que colgaba de una varilla metálica en forma de L invertida (Fig. 7). Las trampas permanecieron en campo 48 horas y fueron re-cebadas y revisadas cada 24 horas.



Figura 7. Modelo de trampa de caída utilizada durante el desarrollo del proyecto.

7.2. Fase de laboratorio

El material de *Deltochilum* fue separado y almacenado en alcohol al 96% dentro de bolsas Whirl Pak ®(Deltalab) para su traslado, con el fin de transportarlo e identificarlo taxonómicamente en el laboratorio de la Universidad del Atlántico, empleando la clave del género propuesta por González-Alvarado y Vaz de Mello (2014). Una vez confirmada la especie, se escogieron 10 individuos por localidad para los análisis genéticos en función del número de trampa y otros tres individuos adicionales (uno de cada localidad geográfica) para ser usados en las fases siguientes de estandarización del protocolo ddradseq. Posteriormente, cada individuo fue fotografiado en un estereoscopio Leica (M150) con el fin de tener material para foto-taxonomía adicional antes de ser sometido a análisis moleculares. A continuación, se separaron cuatro patas de cada individuo (dos medias y dos posteriores) y fueron transferidas a crioviales de 2 mL que contenían alcohol a la misma concentración del almacenamiento inicial, cada tubo tenía un ID distintivo con el objetivo de tener individualizadas las 33 muestras seleccionadas, en 33 tubos diferentes.

7.2.1. Protocolo Molecular

Para la fase experimental que implicó la ejecución de protocolos moleculares, se utilizaron los servicios ofertados por la empresa Australian Genomic Research Facility (AGRF) en Australia. En sus instalaciones se realizó la extracción de ADN, preparación de librerías genómicas para doble digestión enzimática y posterior secuenciación del material genético.

7.2.1.2 Extracción y cuantificación del ADN

El ADN genómico fue extraído de muestras tisulares (Wachi *et al.*, 2018) procedentes de los fémures, empleando el kit NucleoSpin® 96 Tissue bajo la modalidad de centrifugación. Lo anterior, con el fin de obtener material de alto peso molecular para cada individuo, a partir de 20 mg de tejido por muestra provenientes de las cuatro patas de cada ejemplar, siguiendo todas las especificaciones del fabricante. Las condiciones específicas de extracción y cuantificación se describen en el manual de uso “*Genomic DNA from tissue*” (Macherey-Nagel, 2017). Después que se extrajo el ADNg, se realizó un control de calidad cuantificándose la cantidad de ADN usando Quantifluor y la visualización de los subsets de muestras se hizo por medio de Genomic DNA ScreenTape.

7.2.3 Digestión con enzimas de restricción y secuenciación de etiquetas genómicas (RADs)

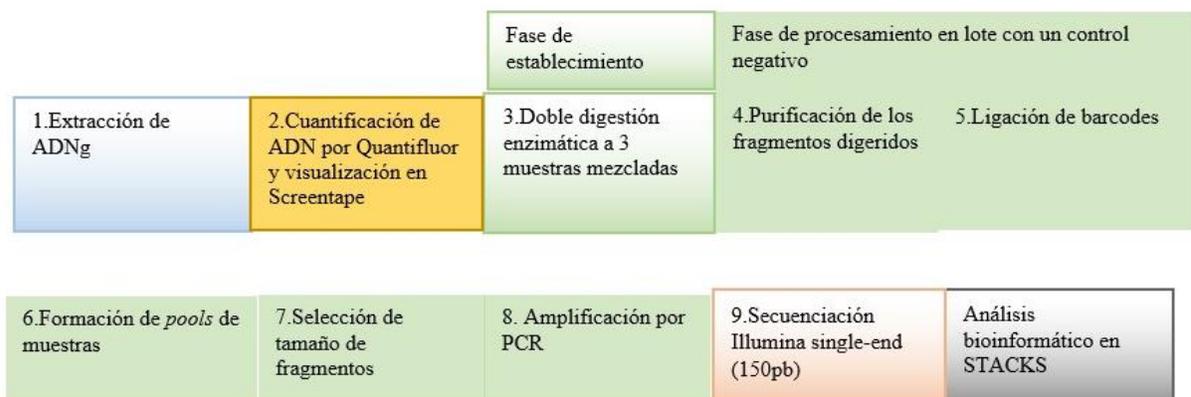
La empresa prestadora de servicios (AGRF) procesó en dos fases diferentes las muestras, denominadas fase de establecimiento y de procesamiento en lotes, respectivamente. Para la primera se requirió hacer un *pool* de las tres muestras procedentes de cada una de las tres localidades en estudio y quedaron 30 viales disponibles para los estudios poblacionales siguientes. El fin del *pool* fue probar ocho combinaciones enzimáticas (PstI/MspI;

PstI/MseI; PstI/NlaIII; PstI/HpyCH4IV; EcoRI/MspI; EcoRI/MseI; EcoRI/NlaIII; EcoRI/HpyCH4IV) y seleccionar por medio de TapeStation (Agilent Technologies) el par de enzimas que fuera la combinación más óptima para la generación de *loci* (etiquetas RADs) con menos secuencias repetitivas, para posteriormente aplicarla a la totalidad de las 30 muestras escogidas.

En la segunda fase, se realizó el procesamiento de todas las muestras siguiendo el protocolo de Peterson *et al.*, (2012) (Fig. 8A), manteniendo un control negativo (para mas detalles ver la referencia). En resumen, esto implicó la digestión enzimática con la combinación de endonucleasas previamente seleccionada, posterior ligación de secuencias cortas de nucleótidos (*barcodes*) a los extremos adhesivos generados tras el clivaje, purificación basada en perlas magnéticas (SPRI, Beckman *coulter*) usando 1.5 uL de perlas por 1 uL de muestra. Seguidamente se hizo un *pool* de muestras en función de su *barcode* para formar grupos multiplexados y se llevó a cabo una selección amplia de tamaño con *Blue Pippin* (Sage Science), cuyos fragmentos diana debían estar en el rango objetivo de 280-375 pb. Después se añadieron secuencias cortas conocidas como “índices de multiplexación” y se procedió a realizar amplificación por PCR bajo las siguientes condiciones: 98°C por 1:30 minutos, seguido de 11 ciclos de: 98°C por 10 segundos (s), 63°C por 20s, 72°C por 20s y una fase de extensión final a 72°C por 7 minutos y por último se mantuvo a 10°C.

Finalmente se procedió a la secuenciación de las librerías constituidas por el subconjunto de fragmentos que estaban en el rango de tamaño objetivo (280-375 pb), usando un equipo *Illumina NextSeq 500* (Illumina Inc., EE. UU) con el modo *HIGHOutput* (30 µL), que empleó secuenciación por síntesis para generar datos de 150 pb del tipo *single-end*. Las secuencias fueron generadas por el *pipeline* de *Illumina bcl2fastq 2.20.0.422*. El procesamiento de las muestras en este estudio se resume en la figura 8.

A.



B.

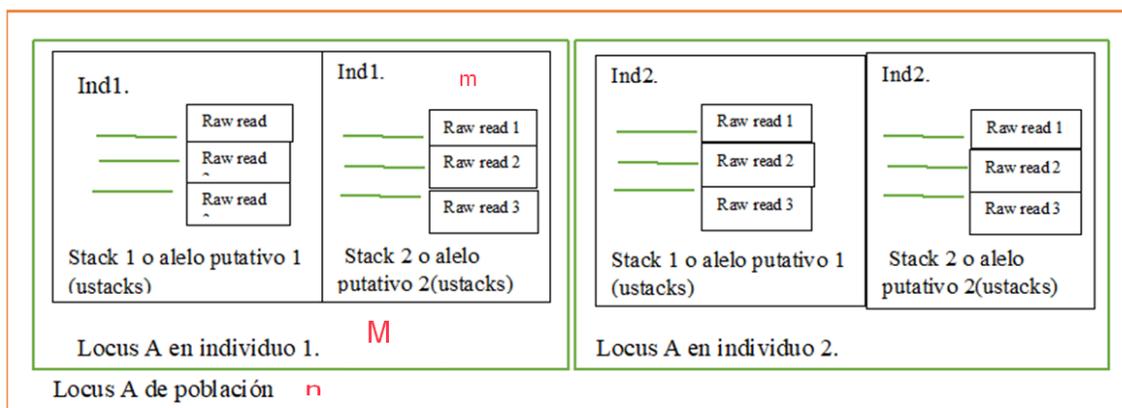


Figura 8. Descripción del flujo de trabajo de las muestras en esta investigación (A) y Construcción de alelos y *loci* en *Stacks* (B). González-Molina y Martínez-Hernández, 2020.

7.2.4 Análisis bioinformático para interpretación de resultados.

Se siguió el protocolo propuesto Rochette y Catchen (2017). Previo al descubrimiento y llamado de SNPs, inicialmente se organizaron los mapas de poblaciones que constaban de dos columnas, una con el nombre de la muestra y otra con el acrónimo de la localidad geográfica a la que pertenecían. Se utilizó el módulo de filtrado de lecturas de baja calidad denominado *process_radtags* del *pipeline* de *STACKS* v1.48 (Catchen *et al.*, 2013) empleando los archivos desmultiplexados en formato fastq.gz de cada muestra, indicando que se filtraron las lecturas ambiguas y de baja calidad (-c y -q). De esta manera, se depuraron secuencias teniendo en cuenta el puntaje de Phred33 bajo un umbral de 20; las lecturas que tenían puntajes menores a dicho umbral se descartaron, ya que este filtro otorgó un 99% de precisión en las llamadas de base (Maroso *et al.*, 2018). El ensamblaje de *loci* ddRAD fue de *novo* (sin realizarse alineación previa a un genoma de referencia), para cada individuo de cada localidad y los datos obtenidos fueron tratados como marcadores genómicos aleatorios.

Según el procedimiento se evaluaron las muestras que tenían mejor número lecturas retenidas y se incluyeron dentro de un grupo prueba para hacer la optimización de los tres principales parámetros del programa (M, m, n). Estos indicaban el número de desajustes nucleotídicos que se permitirían entre “*stacks*”, el número de lecturas requeridas para la creación de un “*stack*” y la designación de los desajustes entre *loci* aceptados al construir el catálogo (Catchen *et al.*, 2011) (Fig. 8B). Lo anterior se realizó ejecutando el programa *denovomap*, donde se agruparon automáticamente tres módulos independientes del *pipeline* llamados *ustacks*, *cstacks* y *sstacks*. El primero de estos, se empleó para realizar el apilamiento de las lecturas para la obtención de alelos y *loci* consenso, ya que agrupa lecturas en bruto (*raw reads*) usando un algoritmo *hashing* para formar *stacks* o alelos

putativos. Posteriormente los *stacks* se descompusieron en secuencias cortas de longitud k con el fin de encontrar alelos coincidentes. Finalmente, se realizó el llamado de SNPs empleando un algoritmo de máxima probabilidad para llamar a genotipos diploides en cada posición nucleotídica (Catchen *et al.*, 2013). *Cstacks* se usó para crear un catálogo de población donde se incluyeran alelos y *loci* presentes en la mayoría de individuos evaluados para facilitar el análisis entre muestras e identificar las variaciones; mientras que *sstacks* sirvió para enfrentar cada individuo contra el catálogo para evaluar si tenía coincidencias nucleotídicas, es decir posiciones compartidas con otras muestras o *loci* únicos (Catchen *et al.*, 2011, 2013; Lozier *et al.*, 2016).

La optimización de parámetros se hizo siguiendo las recomendaciones de Mastretta-Yanes *et al.*, (2014), Paris *et al.*, (2017) y Rochette *et al.*, (2017), para evaluar la sensibilidad del set de datos a dichos parámetros porque cada objeto de estudio tiene una arquitectura genómica y métodos de preparación de librerías diferentes. Para este trabajo se siguió el protocolo de Rochette *et al.*, (2017) fijándose a $m=3$, porque logra maximizar el número de *loci* compartidos detectados, aumenta la probabilidad de detectar *loci* heterocigotos presumiblemente raros y reduce las posibilidades de crear *loci* erróneos (Storer *et al.*, 2017). Además, se igualó a $M=n$ porque se estaban trabajando con agrupaciones de individuos intraespecíficos, donde el valor de esta igualdad osciló entre uno y nueve. Para escoger la combinación de parámetros mas acorde para este estudio se siguió lo propuesto por Paris *et al.*, (2017) con la regla del r.80, donde se seleccionó el M que daba la mayor cantidad de *loci* polimórficos compartidos en el 80% de las muestras evaluadas. Lo anterior, con el fin de extraer información sobre la distribución de SNPs por *locus*, *loci* totales, polimórficos y número de SNPs totales para cada combinación de parámetros. Posteriormente se visualizó gráficamente en excel para encontrar el valor asintótico y ver donde se estabilizaron las proporciones de SNPs usando el paquete *ggplot2* (Wickham, 2011) en R.

Después de la elección, se aplicaron los parámetros optimizados a cada muestra, corriéndose los módulos independientes de *ustacks*, *cstacks* y *sstacks* como lo sugieren Mastretta-Yanes *et al.*, (2014) y Paris *et al.*, (2017). Se tabuló la cobertura por *locus* promedio para todas las muestras, mientras que por localidad geográfica se escogió el 60% de las muestras, que correspondían a las de coberturas más altas, con el fin de incluirlas en el catálogo de población.

Posteriormente se ejecutó el módulo *rxstacks* para reescribir los archivos originales de cada muestra con el fin de aplicar filtros para eliminar *loci* problemáticos que se ensamblaron diferentemente en más del 10% de las muestras (*conf_lim* 0,10) y de esta manera descartar haplotipos poco probables (*prune_haplo*). Esto con el fin de mejorar las probabilidades de las llamadas de genotipos, usando el modelo de llamada de SNPs.

Posteriormente se aplicó el módulo de poblaciones para calcular los estadísticos característicos de genética de poblaciones, especificando que el porcentaje mínimo de individuos dentro de una población en las que debía estar presente un *locus* era 60% (-r 0,6); con el fin de disminuir el sesgo por falsos positivos y SNPs menos informativos. La mínima frecuencia del alelo menor permitida fue 0,05 (min_maf=0,05) y la máxima heterocigosidad observada fue del 80% (max_obs_het=0,80), con el objetivo de disminuir los artefactos, regiones repetitivas (secuencias parálogas) y *loci* con alelos altamente divergentes. El mínimo número de poblaciones en las que debía estar presente un *locus* para ser procesado fue 3 (-p) y se activó el cálculo de estimadores basados en haplotipos (*fstats*) para hacer comparaciones interpopulacionales, así como su respectiva corrección por el *p_value* (0,05) según lo sugerido por Bian *et al.*, (2016) y los genotipos se exportaron en formatos *genepop*. El resumen de los parámetros a utilizar para el módulo de poblaciones se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Valores de parámetros de *Stacks* utilizados en análisis poblacionales. **Abreviaturas.** **m:** Diferencias nucleotídicas permitidas para formar un *stacks* dentro de un *locus*. **M:** Diferencias permitidas entre *stacks* del mismo *locus*. **r:** Porcentaje de individuos dentro de una población en el que debía estar un *locus*. **p:** Número de poblaciones en las que debía estar un *locus*. **Min-maf:** Frecuencia mínima del alelo menor. **Max-het:** Máxima heterocigosidad admitida.

Parámetro	Valor
m	3
M	8
r	0,6
p	3
Min-maf	0,05
Max-het	0,80

Las métricas evaluadas por localidad considerando posiciones variantes fueron: Número de alelos privados, Heterocigosidad observada y esperada, diversidad a nivel nucleotídico (π), el coeficiente FIS (Hartl y Clark, 1997) para identificar muestras o poblaciones con tendencia a la reducción de heterocigosidad.

Considerando todas las posiciones:

Número de sitios polimórficos, porcentaje de *loci* polimórficos, π , FIS. Se calcularon los estimadores de diversidad genética basados en haplotipos por *locus*, es decir agrupando SNPs del mismo *locus* RAD (Φ , Dest)

Para el componente interpopulacional se utilizaron paquetes dentro de R Studio versión 3.6.0 (Team R, 2015). Inicialmente se calculó el número de *loci* que se desviaban del equilibrio de Hardy-Weinberg con la función (*hw.test*) del paquete *pegas* (Paradis, 2010). Además, se

aplicaron pruebas para determinar si existía estructura genética y una posible subdivisión críptica empleando *hierfstat* (Goudet, 2005). También, se calculó la distancia genética de Nei (Nei, 1973) entre localidades por medio de la función *pairwise.fst* del paquete *adegenet* (Jombart, 2008; Jombart y Ahmed 2011) y se graficó usando el método de Vecino más cercano (VMC) con el paquete *ape* (Paradis *et al.*, 2019); mientras que se complementó con una Red de Expansión Mínima (REM) basada en genotipos multilocus en el paquete *poppr* (Kamvar *et al.*, 2014; Kamvar *et al.*, 2015).

Adicionalmente, se corroboró con un análisis de componentes principales (ACP) ejecutado en el paquete *adegenet* empleando la función *dudi.pca*, incluida para identificar ejes continuos de variación genética donde estuvieran variables lineales no correlacionadas (componentes principales) que correspondieran a las mejores combinaciones de SNPs por muestra que explicaran óptimamente la diversidad genética retenida en los principales componentes y evaluar las agrupaciones que se formaran gráficamente.

8. RESULTADOS

La menor cantidad de ADN genómico extraído fue 61,90 ng en la RCM y la mayor 797,99 ng en SFFC respectivamente, por lo que las cantidades fueron suficientes para todas las muestras evaluadas considerando que el ddradseq es flexible con la cantidad inicial de material genético requerida y que incluso puede funcionar con valores menores a 100 ng por muestra, a diferencia de otros protocolos RADseq (Peterson *et al.*, 2012). La mejor combinación de enzimas para la fase de digestión fue EcoRI/HpyCH4IV, tal como se muestra en el gel, porque exhibe pocas bandas en la corrida electroforética y un perfil uniforme en el rango de selección de fragmentos con el tamaño objetivo (280-375 pb), al evaluar el electroferograma (Fig. 9A y Fig. 9B).

8.1. Filtrado de calidad de las lecturas

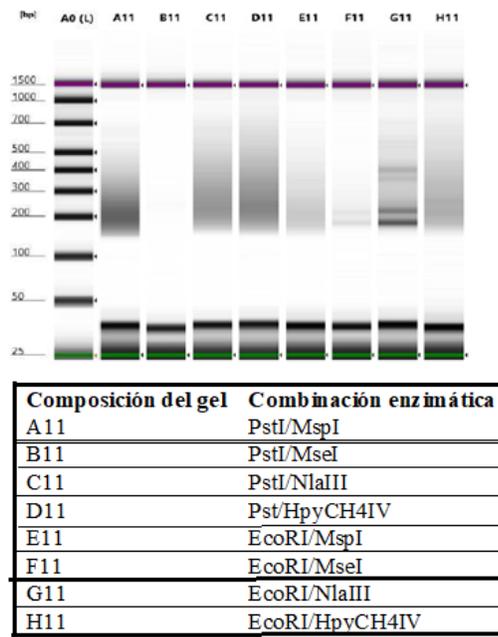
Con el umbral de 20 en el puntaje de calidad de Phred, se obtuvieron un total de 64.457.191 lecturas, que equivale a un 100% del porcentaje del tipo de lecturas; de las cuales el 97,80% correspondían a lecturas retenidas (63.040.004) y solo el 2,19% fueron lecturas de baja calidad (1.417.187). En todas las muestras la proporción de lecturas de baja calidad con respecto al número total de lecturas no llegó al 1%, por lo que se obtuvo una preparación de librerías genómicas de buena calidad que más tarde se corroboró con los análisis *downstream*. Las muestras con mejor número de lecturas retenidas provenían de la localidad de SFFC, seguidas de EBPC y por último RCM.

8.2. Optimización de parámetros del software *Stacks*

Usando M1, un valor que tiende a subestimar la cobertura de las muestras se obtuvieron valores mayores a lo sugerido por el protocolo (10x), la menor y la mayor cobertura del set de prueba fue 13,87 y 22,91x respectivamente.

Empleando el set de muestras prueba, la combinación más óptima de parámetros con $M=n$, fue m3 y M8, logrando descubrirse 104.877 SNPs putativos, 15.829 *loci* polimórficos y un total de 16.574 *loci* candidatos totales. Se determinó que el valor tiende a encontrar una asíntota en M8 (Fig. 10A). Además, en la representación gráfica de la distribución de SNPs por *locus*, se evidenció que M8 es suficiente para estabilizar la proporción de *loci* que contienen entre uno y siete SNPs (Fig.10B), porque las variaciones entre distintos valores de M son menores al 1% en la posición de siete SNPs.

A.



B.

Combinación enzimática: EcoRI/HpyCh4IV

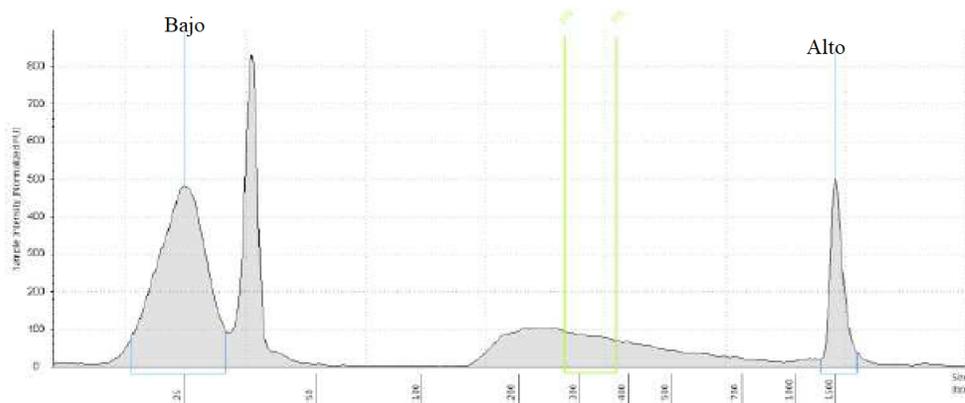
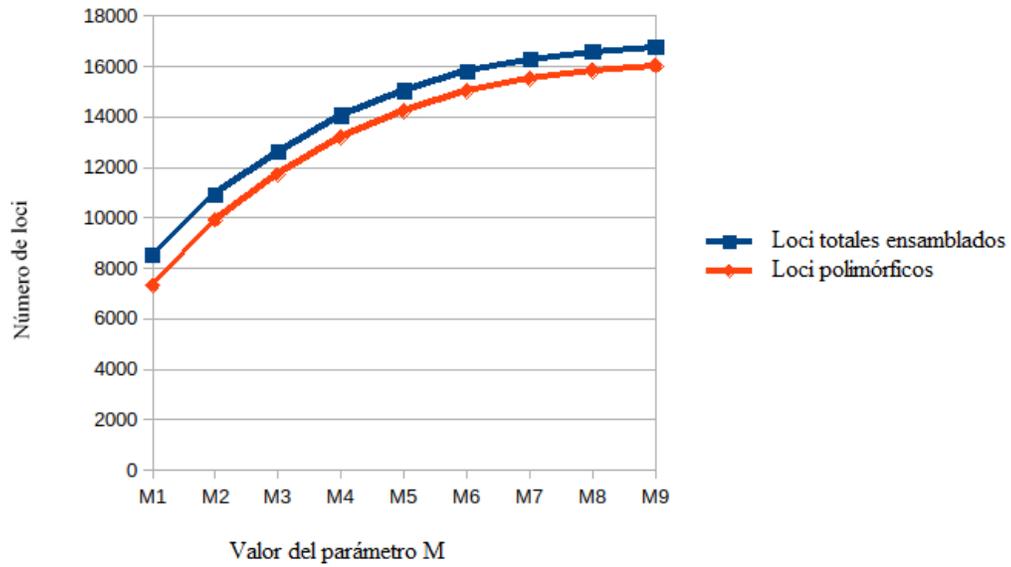


Figura 9. Gel de electroforesis con las distintas combinaciones enzimáticas evaluadas (A) y electroferograma de la mejor combinación enzimática para doble digestión de las muestras (B).

A.



B.

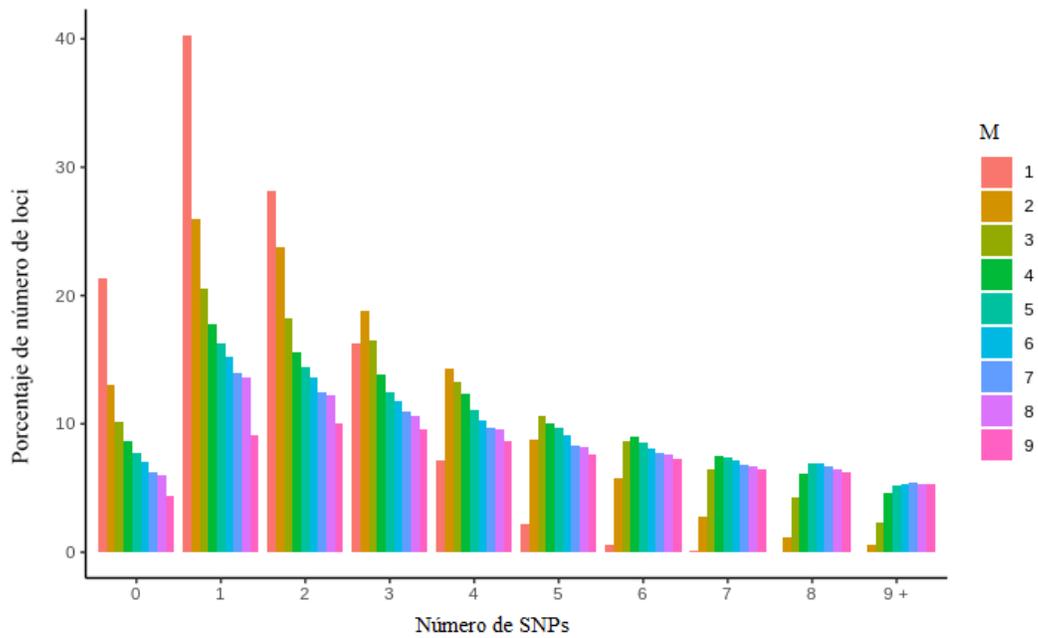


Figura 10. Variación de los valores del parámetro M (A) y distribución porcentual de SNPs por locus para *D. guildingii* en las muestras evaluadas (B).

8.3. Índices de diversidad genética dentro de cada localidad

Al considerar las tres localidades juntas se encontraron 580 *loci* de los cuales solo 386 eran polimórficos después de los filtrados poblacionales. Teniendo en cuenta el número de sitios polimórficos, el mayor valor (960) se presentó en el SFFC y el menor (880) en la EBPC (Tabla. 2). Para el porcentaje de *loci* polimórficos propios de cada localidad, el mayor porcentaje (1,182%) se registró en SFFC, al igual que los valores más altos de heterocigosidad observada (0,0030) y el menor FIS (0,0025). Caso contrario se presentó; en la EBPC, donde se registró el menor valor de *loci* polimórficos (1,083%) y heterocigosidad observada (0,0025) y el mayor FIS (0,0033). (Tabla 2). La frecuencia del alelo más frecuente fue alta en los tres casos (0,9) y los valores de diversidad nucleotídica fueron similares.

Tabla 2. Variación de los estimadores de diversidad genética de *D. guildingii* a partir de todos los sitios y los sitios variantes. **Abreviaturas: Promedio de individuos:** Número promedio de individuos examinados por *locus* en esa localidad. **P:** Frecuencia promedio del alelo más frecuente. **Het obs:** Heterocigosidad observada, **Het esp:** Heterocigosidad esperada, **π :** Diversidad nucleotídica, **FIS:** Coeficiente de endogamia. Entre paréntesis se detalla el error estándar.

Estimadores nucleotídicos a partir de todos los sitios	Localidad		
	RCM	EBPC	SFFC
Número de sitios polimórficos	957	880	960
Porcentaje de <i>loci</i> polimórficos	1,178	1,083	1,182
Número de individuos	7,15 (0,0033)	6,19(0,0015)	7,64 (0,0038)
P	0,997 (0,0001)	0,998 (0,0001)	0,997 (0,0001)
Het obs	0,0028 (0,0001)	0,0025 (0,0001)	0,0030 (0,0001)
Het esp	0,0035 (0,0001)	0,0035 (0,0001)	0,0036 (0,0001)
Π	0,0038 (0,0001)	0,0038 (0,0001)	0,0039 (0,0001)
FIS	0,0027 (0,0033)	0,0033 (0,0015)	0,0025 (0,0038)
Estimadores nucleotídicos a partir de sitios variantes			
Número de alelos privados	57 (0,026)	58(0,010)	63(0,029)
Promedio de individuos	7,08	6,13	7,54
P	0,831 (0,004)	0,833 (0,004)	0,828 (0,004)
Het obs	0,194(0,0057)	0,167(0,0054)	0,203(0,005)
Het esp	0,242(0,0048)	0,236(0,0051)	0,245(0,0048)
Π	0,261(0,0052)	0,257(0,0055)	0,263(0,0052)
FIS	0,184(0,0265)	0,226(0,0104)	0,169(0,0293)
Diversidad haplotípica	0,809	0,793	0,815

Considerando todas las posiciones variantes, es decir aquellas que fueron polimórficas en una o más localidades se obtuvieron 1.202 SNPs. El mayor número de alelos privados se registró en el SFFC (63) y el menor en la RCM (57), pero la diferencia de este último fue de solo un alelo con respecto a EBPC (Tabla. 2). También se determinó que, en las tres localidades, la heterocigosidad observada fue menor a la esperada, presentándose el valor mas alto en el SFFC (0,203) y el menor en EBPC (0,167). Un patrón similar se evidencia con los estimadores de diversidad nucleotídica (π) que se correlaciona con una tendencia opuesta del coeficiente FIS. En todos los sitios se apreció que la frecuencia del alelo más frecuente fue bastante alta, casi cercana a 1 (0,8). Por otro lado, teniendo en cuenta los valores del estimador haplotípico, el mayor valor de diversidad haplotípica (0,815) se registró en el SFFC y el menor (0,793) en EBPC (Tabla 2).

8.4. Índices de diferenciación genética entre localidades

El valor del estimador F_{ST} general para las tres localidades consideradas en conjunto fue 0,012. Teniendo en cuenta los cálculos del mismo estimador para obtener el grado de diferenciación genética entre las localidades a partir de datos nucleotídicos, el mayor valor se determinó entre EBPC-SFFC (0,062), y el menor entre RCM-SFFC (0,050) y la representación gráfica de esto mostró al sitio EBPC mas separado (Fig. 11A). Por otro lado, los valores de estimadores de diferenciación interpoblacional basados en haplotipos entre pares de localidades geográficas, mostraron que el mayor valor de Φ se registró entre EBPC-SFFC con 0,040, seguido por RCM-EBPC ($\Phi= 0,029$) y por último RCM-SFFC con un valor de $\Phi=0,018$ (Fig. 11B); mientras que con el estimador Dest para el mismo orden de pares se tuvo valores de 0,053, 0,049 y 0,033 (Fig. 11C). De manera visual se determinó con las gráficas de ambos estimadores que el par EBPC-SFFC basado en Φ presentó diferenciación, mientras que las comparaciones RCM-EBPC y RCM-SFFC no presentaron este comportamiento debido a que los intervalos se solapan (Fig. 11 B, C).

Se encontraron 142 *loci* que se desviaban del equilibrio de Hardy-Weinberg con un *p-value* (0.0001). Por otra parte, las relaciones se visualizaron con un árbol de vecino más cercano general que agrupaba por localidad y estaba basado en similitudes de las secuencias genéticas (Fig. 12A) mostrando que la mayor distancia entre ramas fue 0,03 para EBPC y SFFC; y un árbol extendido con las 30 terminales (número de individuos analizados) mostró una tendencia en el *pool* nucleotídico global, donde las secuencias provenientes de diferentes localidades quedaban mezcladas y se identificaron las asociaciones puntuales entre muestras de distintas localidades que son muy similares (A84 perteneciente a SFFC junto a A13 del RCM) (Fig. 12B).

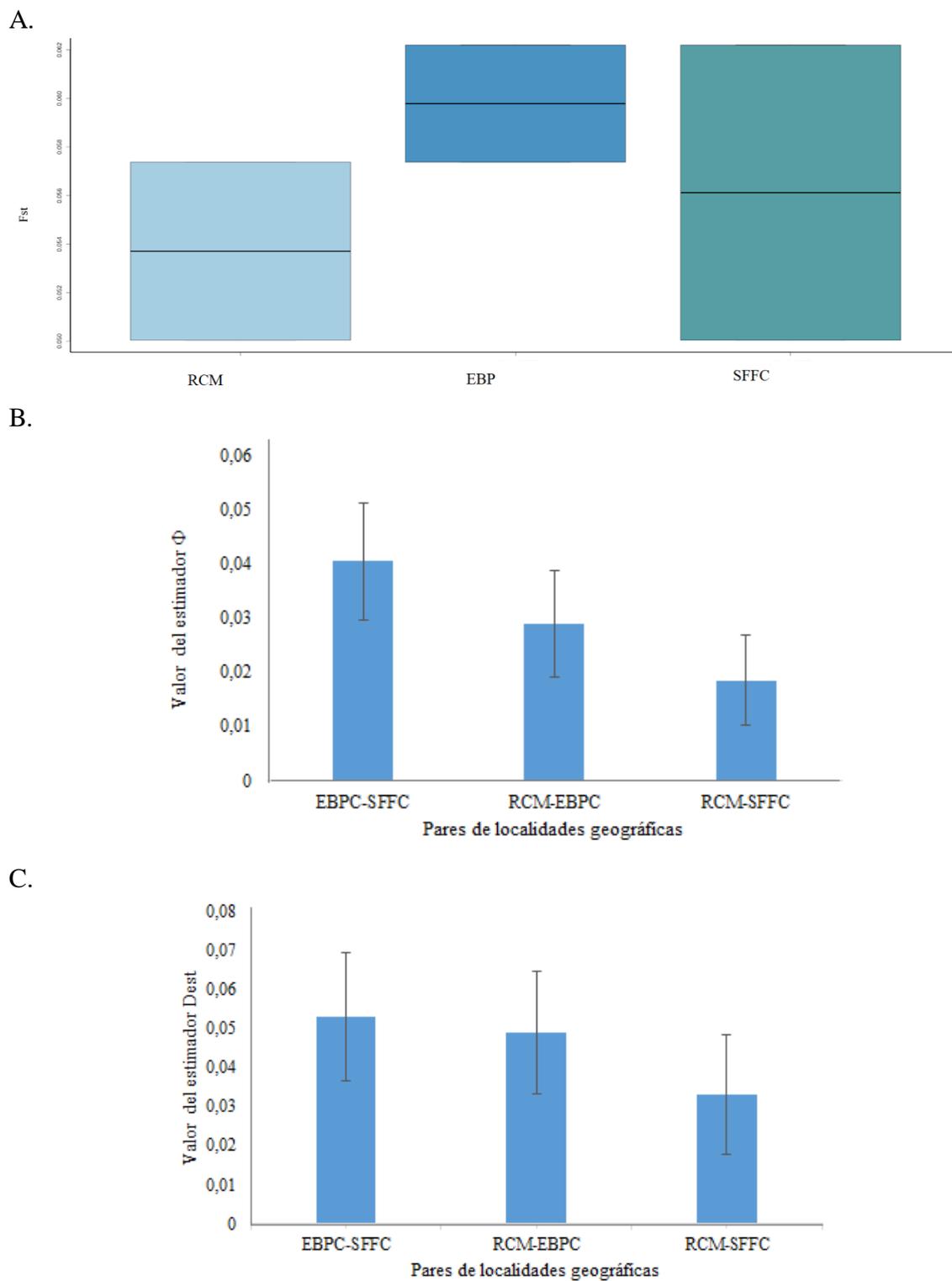
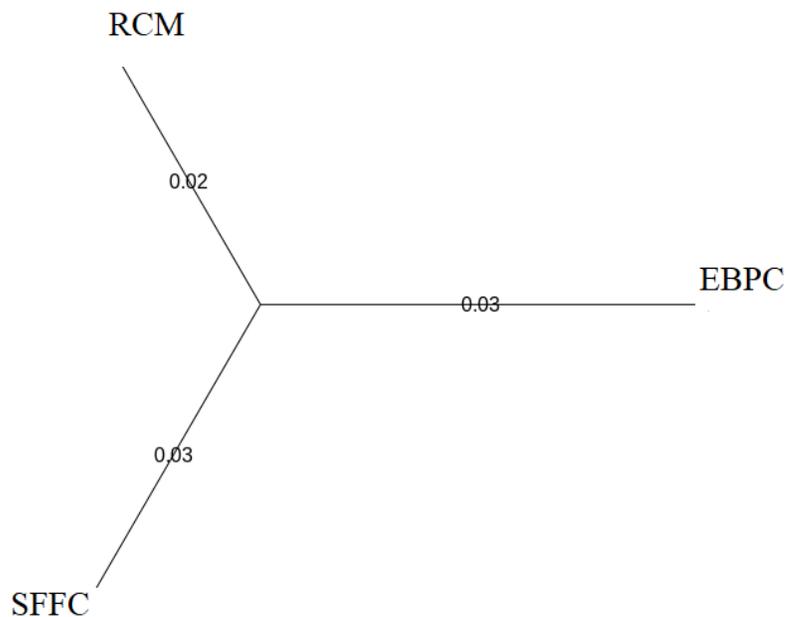


Figura 11. Comparación de estimadores de diferenciación genética entre localidades geográficas basado en F_{ST} (A), así como las comparaciones pareadas del estimador Φ (B) y del estimador $Dest$ (C).

A.



B.

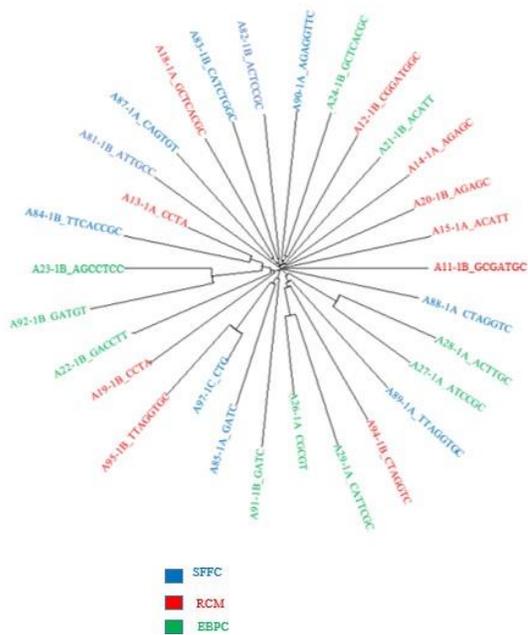
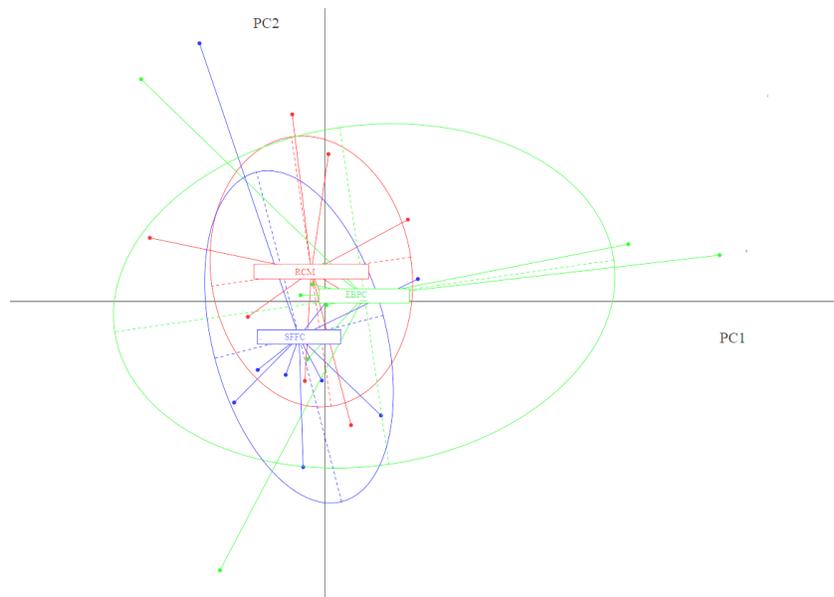


Figura 12. Árbol de vecino más cercano (VMC) para visualización de las distancias genéticas resumido por localidades (A) y extendido con todos los individuos (B) de *D. guildingii* en el área de estudio.

Los resultados anteriores fueron congruentes con el Análisis de Componentes Principales, donde se observó que la elipse de la localidad EBPC está ligeramente más separada; mientras que SFFC y RCM están más relacionados (Fig. 13A). Se determinó que la estructura genética de *D. guildingii* entre las localidades es baja, considerando el bajo porcentaje de varianza explicado en los dos primeros componentes (PC1= 6,56% y PC2= 6,13%). Lo anterior se confirmó con la red de expansión mínima, donde se observó que hay muy pocos genotipos multilocus compartidos entre el grupo de la derecha, específicamente solo tres genotipos del SFFC eran parecidos a cuatro de EBPC y a dos de RCM, mientras que la gran mayoría de genotipos (izquierda) están relacionados entre localidades (Fig.13B).

A.



B.

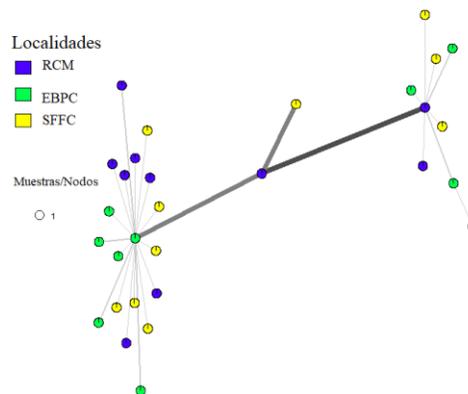


Figura 13. A Análisis de Componentes principales (ACP). B. Red de expansión mínima (REM).

9. DISCUSIÓN

La recuperación de la considerable densidad de marcadores moleculares (1.202) para la especie *D. guildingii* en la presente investigación, obedece a la combinación de factores como una adecuada reducción de la complejidad del genoma por medio de la identificación de *loci* que tuvieran un bajo número de secuencias repetitivas a partir de las técnicas de separación. También se debe al amplio tamaño de selección objetivo de ventana para generar más etiquetas RADs y por el número de individuos analizados, en este caso fue suficiente N=10, congruente a lo sugerido por Willing y colaboradores (2012). Adicionalmente, influyó la escogencia de las enzimas EcoRI/ Hpy4CHIV, las cuales exploraron robustamente el genoma debido a su frecuencia de sitios de corte de 6 y 4 pb respectivamente (Morgan y Xu, 2000; Peterson *et al.*, 2012; Lepais y Weir, 2014; Leache *et al.*, 2015). Lo anterior coincide con lo reportado por Kirschner *et al.*, (2016) y Shirasawa *et al.*, (2016), quienes expresaron que estas endonucleasas son útiles a la hora de hacer averiguaciones genómicas de alta profundidad en los taxones.

Además, se registró un efecto positivo de la configuración de los parámetros óptimos sobre el número de SNPs y de *loci*. El valor de M=8, está dentro del rango reportado por Paris *et al.*, (2017) y coincide con lo descrito por Lozier *et al.*, (2016); quienes plantean que los estudios que tienen por propósito detectar divergencia genómica requieren valores mas altos de M. Con lo obtenido en este trabajo, se exhorta a realizar las configuraciones en función del objetivo de investigación y las propiedades específicas de cada set de datos (Díaz-Arce *et al.*, 2016; Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2016). Gracias al incremento de M, se explicó el aumento del número de *loci* polimórficos en las muestras de *D. guildingii*; ya que se registró un pequeño número de *loci* que tenían una alta densidad de SNPs y de esta manera una alta diversidad haplotípica (Rochette y Catchen, 2017).

Teniendo en cuenta lo anterior se consideran bastante confiables los valores de los estimadores poblacionales encontrados en este estudio, porque fueron producto de un estricto filtro con el propósito de hacer inferencias válidas a partir de regiones compartidas entre un alto porcentaje de individuos de cada localidad. Además, el presente set de datos tuvo una baja formación de *contigs multilocus* (O'Leary *et al.*, 2018) y una cobertura promedio alta (14,16x). En este caso, cada posición nucleotídica fue intensamente inspeccionada, por lo que con este promedio se pudieron distinguir verdaderos polimorfismos de errores de secuenciación y fue suficiente para llamar acertadamente ambos alelos en cada sitio en las tres localidades de BST escogidas (Buerkle y Gompert 2013; Mastretta-Yanes *et al.*, 2015). Adicionalmente, se obtuvo un buen rendimiento de ensamblaje de *loci* mediante el enfoque *de novo* en Stacks; porque ayudó a entender la dinámica genómica de la especie (Catchen *et al.*, 2013). Además, se confirmó que este es un buen método para trabajar genética de escarabajos coprófagos; los cuales carecen en su mayoría de genomas ensamblados y que el uso de genomas de referencia puede hacer

perder información por disimilaridad entre las secuencias objetivos y el referente (Baker, 2012; Rochette y Catchen, 2017). A pesar de la densidad de marcadores, no se encontró una estructura genética relevante entre las muestras; lo cual coincide con Díaz-Arce y Rodríguez-Ezpeleta (2019); quienes especifican que, aunque se recupere un alto grado de SNPs y/o *loci* esto no está directamente relacionado con el grado de diferenciación genética detectada.

El bajo nivel de polimorfismo (1,1%) de *D. guildingii* en las tres localidades, está soportado por el escaso porcentaje de *loci* polimórficos cuando se consideran todas las posiciones en cada zona geográfica; así como el número de SNPs analizados (Fischer *et al.*, 2017), dichos valores son similares a lo reportado por Storer *et al.*, (2017). La disminución de la heterocigosidad observada con respecto a la heterocigosidad esperada en el registro genómico de *D. guildingii* para cada fragmento de BST, demuestra que todas las localidades tienen una deficiencia de heterocigotos ($FIS > 0$) (Frankham *et al.*, 2017); la cual es más marcada en la localidad sucreña (EBPC). Teniendo en cuenta el valor del coeficiente FIS obtenido, se sugiere que la especie *D. guildingii* pudo haber experimentado reducciones de sus tamaños poblacionales efectivos a nivel de localidad, debido a la pérdida de hábitat (Lacy, 1987; Kleinhans y Willows-Munro, 2019) producto de la intensa transformación del BST en esta zona del país (Mesa *et al.*, 2016). Lo anterior ha potencializado la reproducción no aleatoria entre grupos de individuos estrechamente relacionados en cada zona (Holzman *et al.*, 2009), por lo que se propone que a nivel genético puede tener registros de su sensibilidad a las transformaciones de hábitat previamente reportados para algunos Scarabaeinae (Gardner *et al.*, 2008).

Por otro lado, se sugiere que la alta frecuencia promedio del alelo más frecuente en cada localidad puede deberse a la fijación de variantes alélicas, lo cual también se puede atribuir a los efectos de la reducción poblacional. Al tener poblaciones más pequeñas, se incrementan los efectos de la deriva genética; la cual cambia las frecuencias alélicas conllevando a la fijación de alelos, que modela el grado de diversidad genética global encontrado (Ellegren y Galtier, 2016). Teniendo en cuenta los resultados genéticos de *D. guildingii* en EBPC, se puede decir que la población en este lugar estaría experimentando efectos más fuertes de endogamia y deriva genética, comprometiendo su diversidad (Motro y Thomson, 1982; Keller y Waller, 2002; Kekkonen *et al.*, 2012); porque a mediano y largo plazo la especie se vuelve vulnerable a la erosión genética por pérdida de sus ecotipos en el BST y aumentando su riesgo de extinción local (Wright, 1978; Hartl y Clark, 2007; Luquet *et al.*, 2013; Moodley *et al.*, 2017). En este caso, se habrá reducido la variación genómica necesaria para que opere la selección natural a pesar de que los niveles poblacionales se recuperen (Ledig, 1988; Millar *et al.*, 1990; Halfpeter y Ezcurra, 1992). Además, la ligera diferencia que presenta la frecuencia del alelo más frecuente en EBPC para este escarabajo coprófago con respecto a las otras localidades, puede estar ligado a que esta área presenta en sus alrededores actividades como la minería que amenazan las reservas departamentales

(Sampedro *et al.*, 2014); razón por la cual se deben incrementar los esfuerzos de conservación en la zona y en otras áreas circundantes; si se tiene en cuenta que Sucre tiene una baja representación de áreas protegidas a nivel nacional con apenas 16.339 hectáreas (RUNAP, 2018).

En relación al valor del estimador $FIS > 0$ obtenido para *D. guildingii*, este también brinda información sobre los sistemas de apareamiento de las especies (Cordeiro *et al.*, 2019); ya que estaría indicando un desequilibrio en las proporciones sexuales esperadas a la hora de la reproducción (1:1). Esto coincide con datos aún no publicados para la especie, donde se encontró una relación de 3 hembras por cada 2 machos (Martínez-Hernández, datos sin publicar). Además, se sugiere que las fuerzas microevolutivas están actuando para el set de datos evaluados, porque se encontraron 142 *loci* desviándose de HWE (Namipashaki *et al.*, 2015). Esto resulta interesante porque considerando la heterogeneidad del BST y su estado de amenaza (Miles *et al.*, 2006), la deriva genética puede estar afectando las poblaciones locales pequeñas de la especie por estocasticidad demográfica; ya sea por la disminución de microhábitats o reducción de fuentes de excremento usadas para alimento y reproducción, cambiando las tasas de supervivencia individual y las reproductivas de cada sexo (Harmon y Braude, 2010). Esto sugiere que los procesos macro a nivel ecológico relacionados con los sistemas de apareamiento tienen un soporte en el registro genómico como el detectado en *D. guildingii*, por tal razón se resalta el papel de la genética de la conservación como una herramienta complementaria a estudios ecológicos para expandir los conocimientos sobre la biología e historia natural de los taxones.

Los desequilibrios entre sexos anteriormente descritos, también pueden obedecer a una fuerza evolutiva asociada a selección sexual (Scholtz *et al.*, 2009); donde las hembras escogen activamente entre potenciales parejas a partir de atributos del macho a nivel comportamental o morfológicos como tamaño del cuerpo (Trivers, 1972; Emlen, 1997). Algunos autores sugieren la hipótesis de los buenos genes, donde los machos con buenas características genéticas son los que pueden desarrollar grandes atributos de calidad (Zahavi, 1975). Sumado a lo anterior, se han reportado grupos con competencia espermática entre machos después de la copulación y con selección crítica de la hembra en la escogencia de pareja (Parker, 1970; Thornhill, 1983; Simmons y Ridsdill-Smith, 2011). Es posible que en *D. guildingii*, la reproducción también sea diferencial, pero se requieren más análisis que confirmen la presencia de selección y cuantifiquen su intensidad; así como la determinación de los mecanismos reproductivos específicos en el grupo para establecer si puede existir una posible selección en contra de los heterocigotos. Por esta razón, se sugiere realizar pruebas para identificar *loci* bajo selección donde se incluyan tests de *outliers* basados en FST (Jones *et al.*, 2013).

Otra de las posibles causas para la reducción de los heterocigotos sería la presencia de alelos nulos (Lal *et al.*, 2016). Es decir, cambios en los sitios de corte de las enzimas de

restricción que impiden que se incluyan en el análisis por abandono de alelo (Davey *et al.*, 2011; Huang y Knowles, 2014) causados por alteraciones en los sitios de reconocimiento y frecuencias de corte de las enzimas de restricción (Gautier *et al.*, 2013). En los individuos evaluados en esta investigación, el abandono no puede evitarse, pero se mitigó su efecto ejerciendo estrictos filtros como la eliminación de datos que tuvieron un umbral muy bajo de lecturas y la identificación de loci con extremas variaciones de cobertura (Davey *et al.*, 2013; Cooke *et al.*, 2016).

Considerando todas las posiciones, los valores promedio de los estimadores FIS y heterocigosidad observada, fueron mayores a lo reportado para el escarabajo *Chelymormpha alternans* (Strickland *et al.*, 2019); mientras que la diversidad nucleotídica (0,0038) fue menor a lo reportado para *Staphylinus erythropterus* (Giska *et al.*, 2015) pero estuvo en el rango reportado por Leffler *et al.*, (2012) para artrópodos. Además, el rango de la heterocigosidad observada calculada a partir de sitios variantes (0,16-0,20), fue ligeramente inferior a lo descrito por Crossley *et al.*, (2019) para *Leptinotarsa decemlineata* (0,19 y 0,21). Los anteriores desajustes pueden deberse a diferencias en rasgos específicos de la historia natural de los taxones como la capacidad de dispersión, ya que algunas especies del género *Deltochilum* han mostrado una tasa de movimiento relativamente baja entre 0,5 y 0,6 km (da Silva *et al.*, 2015); específicamente en el caso de *D. guildingii*, se ha cuantificado la máxima distancia de 0,7 km (datos no publicados). Esta característica es fundamental, porque mostraría que las posibilidades de deterioro genético en *D. guildingii* son altas; ya que la erosión genética afecta fuertemente a los taxones donde las posibilidades de dispersión son limitadas (Moodley *et al.*, 2017). Esto pone de manifiesto la necesidad de abordar las interpretaciones a la luz de la biología de cada taxón, porque las capacidades de dispersión entre las especies a nivel histórico son distintas, lo cual es uno de los factores que modelará el intercambio de genes entre sitios. Otros aspectos que pueden influir son el contexto geográfico en el que se realizaron los muestreos, las variaciones en el protocolo molecular, así como en el método de ensamblaje y configuración de parámetros entre estudios.

En términos generales el SFFC se constituye como un reservorio relevante de la diversidad genética de *D. guildingii*, porque obtuvo los mejores valores de los estimadores como diversidad nucleotídica y haplotípica. Esto indica que entre sus individuos hay un número mas elevado de cambios puntuales en fracciones del genoma, así como un mayor grado de variación entre grupos de SNPs por locus (haplotipos) y un mayor número de alelos privados (63), lo que contribuye substancialmente al *pool* genético global. Lo anterior se explica porque es un fragmento con muchos atributos, ya que es considerado el relicto de BST mejor conservado en el Caribe colombiano, el cual posee una vasta extensión (1.000 hectáreas) y está enmarcado dentro de una ecorregión biológicamente muy diversa como los Montes de María (Colparques, 2020; Parques Nacionales Naturales, 2020). Con este estudio genético se corroboró la importancia biológica del SFFC, lo cual coincide con

estudios realizados para otros taxones basados en métodos tradicionales de monitoreo en este santuario (IGAC, 1969; Botero-Cruz, 2010). La baja diferencia entre el número de alelos privados entre RCM con EBPC y SFFC llama la atención de esta reserva atlanticense, por su baja extensión (47 hectáreas) y el alto nivel de intervención antropogénica que presenta; razón por la cual se deduce que es un reservorio importante de la diversidad genética de la especie que debe conservarse por la singularidad que aún exhibe a pesar de las presiones a las que está expuesta.

La comparación pareada de los estimadores nucleotídicos (F_{ST}) y haplotípicos (Φ y D_{est}) entre las localidades analizadas, demostró que los sitios tienden a tener frecuencias alélicas similares; por lo que el grado de diferenciación genética de *D. guildingii* entre los fragmentos de BST es bajo (Excoffier *et al.*, 1992; Jost, 2008; Bird *et al.*, 2011). La baja estructura genética identificada para *D. guildingii* en dichas localidades, puede obedecer a un flujo génico histórico que ha mantenido la cohesión genética entre las localidades en sinergia con un tiempo insuficiente para que las poblaciones locales diverjan significativamente. Lo anterior es válido si se tiene en cuenta, que la diferenciación está influenciada por rasgos de la historia de vida que han sucedido a lo largo de una gran escala temporal como el flujo génico, los sistemas de apareamiento, tamaño poblacional, tasas de migración y aspectos geográficos (Hanski y Gaggioti, 2004; Pan *et al.*, 2016). El valor del F_{ST} general calculado a partir de la distancia genética de Nei entre todas las localidades fue menor al reportado para la especie de curculiónido *Pityogenes chalcographus* (Schebeck *et al.*, 2019), (0,012 vs 0,034), destacándose que el nivel de diferenciación entre sitios geográficos es bajo para el presente estudio a diferencia de la estructura detectada en *P. chalcographus* para dos zonas de Europa. Adicionalmente se coincide con Ferreira-Neto *et al.* (2017) al expresar que, a pesar que la diferenciación genética para ciertas especies de escarabajos coprófagos sea baja, se puede sugerir que las presiones antropogénicas que modifican los ambientes naturales influyen en la pérdida de diversidad genética. Además, se corroboró, que las causas que incrementan la diferenciación entre localidades también aumentan las similitudes de individuos dentro de cada una, porque había tres pares de muestras en EBPC, que presentaban un mayor grado de afinidad nucleotídica entre sí (Holsinger y Weir 2009).

Considerando la alta heterogeneidad espacial que exhibe el BST, se propone desde un punto de vista contemporáneo y no histórico, que la especie *D. guildingii* se esté comportando como una metapoblación. Dicha dinámica metapoblacional puede ser transitoria originada por la irregularidad de hábitat, que se genera tras la fragmentación de áreas para ser explotadas por humanos (Antolin y Schoettle, 2001). Esto resulta inquietante porque cuando los taxones muestran esos indicios se incrementan los riesgos de extinción por deriva y endogamia (Frankham *et al.*, 2010), razón por la que se hace necesario determinar si es una dinámica metapoblacional estable en primera instancia; de esta manera en análisis futuros se debe tener en cuenta la dinámica de los parches a gran escala y los

cambios en el paisaje en el área de estudio (Wiens, 1997). Para determinar dicho aspecto, deberán aplicarse modelos específicos metapoblacionales, así como cuantificar las tasas de colonización, extinción y migración, tamaños poblacionales y contribuciones de carga genética (Whitlock, 2004).

La ligera separación en la variación genética de *D. guildingii* en la localidad EBPC de los otros dos fragmentos en todos los análisis, se puede atribuir a cambios abruptos en las áreas naturales por la serie de transformación que se ha venido generando por la minería y la agricultura (Rudas *et al.*, 2007); así como a la elevada heterogeneidad espacial reportada para el departamento de Sucre (Gauffre *et al.*, 2015; Amell-Caez *et al.*, 2019). Con los datos genéticos aportados aquí se refuerza lo planteado por Amell-Caez *et al.*, (2019), para fomentar la creación de más zonas de reserva en el territorio sucreño (EBPC) y específicamente en los fragmentos de BST de la ecorregión de los Montes de María. La leve diferenciación de EBPC con SFFC puede obedecer a procesos a escala fina como la autocorrelación espacial entre muestras procedentes de diferentes sitios de la compleja ecoregión Montes de María, ya que hay factores ecológicos que pueden variar a escalas microgeográficas y esto influye en los patrones de estructura genética dentro de esa región (Smouse *et al.*, 2008). Las similitudes entre RCM y SFFC pueden obedecer a influencias biogeográficas y/o posibles expansiones poblacionales, que llevaron a la colonización entre estos sitios, pero tales supuestos se escapan del alcance del presente estudio y pueden ser respondidos realizando investigaciones enfocadas a la filogeografía e historia demográfica de la especie.

10. CONCLUSIONES

Este trabajo representa una investigación pionera sobre diversidad genética de escarabajos coprófagos de la subfamilia Scarabaeinae para el BST del Caribe colombiano. Además, se demostró la importancia que tiene analizar la diversidad genética en los fragmentos de bosque en el área de estudio como sitios de conservación; si se tiene en cuenta que este ecosistema presenta pocas áreas protegidas en el sistema nacional y pueden albergar una porción significativa de las poblaciones de Scarabaeinae a nivel local y nacional.

Se concluye que, de las tres localidades, el SFFC es un reservorio importante de la diversidad genética de la especie bajo análisis, favorecido por sus atributos como un alto grado de conservación y extensión. Además, se enfatiza que se debe elevar el nivel de protección en la RCM por la singularidad genética que aún tiene, a pesar de las modificaciones antropogénicas que ha sufrido y por ser el fragmento de menor extensión. También se debe buscar maximizar el esfuerzo de conservación de los Montes de María mediante la declaración de más zonas de reserva, porque los cambios inducidos en las áreas naturales en territorio sucreño están incrementando el riesgo de erosión genética en la localidad de EBPC, por presentar los valores más bajos de diversidad genética.

En términos generales la especie tendió a una deficiencia de heterocigotos en la región genómica recuperada, sugiriendo que pueden estar disminuyéndose los tamaños poblacionales efectivos en los fragmentos de BST evaluados. Además, se encontró que las tres localidades tienen una baja estructura genética y se comportan como una sola población.

A nivel contemporáneo se propone que la especie *D. guildingii* puede estar exhibiendo un comportamiento de metapoblación a raíz de la heterogeneidad espacial en el BST, producida por la pérdida de áreas naturales en el Caribe colombiano.

11.RECOMENDACIONES.

Se recomienda hacer análisis a escala fina en la ecoregión Montes de María por su complejidad asociada, donde en la misma ecorregión se varíe la escala paisajística y evaluar el efecto en el comportamiento de los datos, usando métodos de autocorrelación espacial. También se recomienda realizar estudios de conectividad genética donde se incluyan composición y configuración del paisaje usando modelos como el aislamiento por resistencia.

Se recomienda para futuras investigaciones en otros grupos, ejercer filtros estrictos para hacer inferencias poblacionales válidas, ya que estos ayudan a disminuir los efectos de un posible abandono de alelo.

A futuro pueden incluirse más puntos de muestro y evaluar *loci* bajo selección asociados a factores ambientales específicos de cada localidad.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Abu-Zaitoun, S., Chandrasekhar, K., Assili, S., Shtaya, M., Jamous, R., Mallah, O., Nashef, K., Sela, H., Distelfeld, A y Alhajaj, N. 2018. Unlocking the genetic diversity within a Middle-East panel of durum wheat landraces for adaptation to semi-arid climate. *Agronomy*,8:10:233.
2. Acevedo, Álvaro. (Comp.). 2016. Materiales educativos sobre uso y conservación del bosque seco tropical en el Caribe colombiano: una guía para facilitadores. Bogotá: Tropenbos Internacional Colombia y Fondo Patrimonio Natural. 57 p.
3. Aguilar-Garavito, M. y Ramírez, W. 2015. Monitoreo a procesos de restauración ecológica, aplicado a ecosistemas terrestres. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá D.C., Colombia. 250 p.
4. Aguilera-Díaz, M. 2013. Montes de María: una subregión de economía campesina y empresarial. Documentos de trabajo sobre economía regional. Cartagena.195 p.
5. Aguirre, N., Filippi, C., Zaina, G., Rivas, J., Acuña, C., Villalba, P., García, M., González, S., Rivarola, M y Martínez, M. 2019. Optimizing ddRADseq in Non-Model Species: A Case Study in *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Agronomy*,9(9):484.
6. Allendorf, F., Hohenlohe, P y Luikart, G. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Review Genetic*, 11:697–709.
7. ALPEC.2008. Bosques Secos Tropicales en la región Caribe colombiana. [\(27/05/2018\)](http://www.alpec.org/bosques_secos.html)
8. Alvarado-Solano, D. y Otero-Ospina, J. 2015. Distribución espacial del bosque seco tropical en el Valle del Cauca, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 20(3): 141–153.
9. Álvarez-Davila, E., Ajiaco, R., Buitrago, L., González, M., Laverde, O., Ortiz Gallego, R., Plata, C., Rosselli, L., Sanjuan, T., Uribe, S. 2019. Estado de la biodiversidad en Colombia. IAvH. 55p.
10. Amell-Caez, Y., Decastro-Arrazola, I., Garcia, H., Monroy, J. y Noriega, J. 2019. Spatial diversity of dung beetle assemblages (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) in five ecoregions from Sucre, Colombian Caribbean coast. *Revista Colombiana De Entomología*,45(2): e7963.
11. Amézquita, S., Forsyth, A., Lopera, A y Camacho, A. 1999. Comparación de la composición y riqueza de especies de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) en remanentes de bosque de la Orinoquía Colombiana. *Acta Zoológica Mexicana (Nueva Serie)*,76:113-126.
12. Anderson, B., Akçakaya, H., Araújo, M., Fordham, D., Martinez-Meyer, E., Thuiller, W y Brook, B. 2009. Dynamics of range margins for metapopulations under climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*,276(1661):1415-1420.

13. Andresen, E. 2008. Short-term temporal variability in the abundance of tropical dung beetles. *Insect Conservation and Diversity*,1(2):120-124.
14. Andrews, K., Good, J., Miller, M., Luikart, G. y Hohenlohe, P. 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*,17(2):81.
15. Antolin, M y Schoettle, A. Fragments, extinction, and recolonization: the genetics of metapopulations.37-46. Joyce, D. y Simpson, J eds. *Proceedings of the Twenty-Seventh Meeting of the Canadian Tree Improvement Association: Genetic resource management: Building strategies for the new millennium*.2001. Sault Ste. Marie, Ontario.Natural Resources Canada, Canadian Forest Service.
16. Arellano, P. y Rangel, J. 2010. Fragmentación y estado de conservación en páramos de Colombia. Rangel-Ch (Ed). *Colombia Diversidad Biótica X: Cambios global (natural) y climático (antrópico) en el páramo colombiano*. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 556 p.
17. Arif, I., Khan, H., Bahkali, A., Al Homaidan, A., Al Farhan, A., Al Sadoon, M., y Shobrak, M. 2011. DNA marker technology for wildlife conservation, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18: 219–225.
18. Arteaga, L., De la Parra, A., Medellín, M., Martínez-Hernández.2014. Mantidofauna (Insecta: Mantodea) en fragmentos de bosque seco tropical (bs-t) en el departamento del Atlántico (Colombia). *Boletín Científico Centro de Museo de Historia Natural* 18(2):243-262.
19. Audino, L., Louzada, J. y Comita, L. 2014. Dung beetles as indicators of tropical forest restoration success: Is it possible to recover species and functional diversity? *Biological Conservation*,169:248-257.
20. Avise, J., Lansman, R. y Shade, R. 1979. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics*, May,92(1):279-295.
21. Avise, J., Arnold, J., Ball, R., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J., Reeb, C y Saunders, N. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics
22. Baird, N., Etter, P., Atwood, T., Currey, M., Shiver, A., Lewis, Z., Selker, E., Cresko, W. y Johnson, E .2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PloS One*,3(10): e3376.
23. Baker, M. 2012. De novo genome assembly: what every biologist should know. *Nature Methods*,9(4):333-337.
24. Balvanera, P., Uriarte, M., Almeida-Leñero, L., Altesor, A., DeClerck, F., Gardner, T., Hall, J., Lara, A., Laterra, P y Peña-Claros, M. 2012. Ecosystem services research in Latin America: The state of the art. *Ecosystem Services*,2:56-70.

25. Bang, H., Lee, J., Kwon, O., Na, Y., Jang, Y., Kim, W. 2005. Effects of paracoprid dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) on the growth of pasture herbage and on the underlying soil. *Applied Soil Ecology*, 29: 165–171.
26. Barbosa, C.; Fajardo-Patiño, A.; Giraldo, H.; Rodríguez, J. 1988. Proyecto sobre Evaluación del hábitat y Status del mono tití de cabeza blanca, *Saguinus oedipus* en Colombia. Unpublished Final Report of Status of Cottontop Tamarin in Colombia Project, INDERENA, Bogotá.
27. Barker, M yWilson, R. 2010. Cohesion, gene flow, and the nature of species. *The Journal of Philosophy*,107(2):61-79.
28. Barnes, A., Emberson, R., Chapman, H., Krell, F. y Didham, R.2014. Matrix habitat restoration alters dung beetle species responses across tropical forest edges. *Biological Conservation*,170:28-37.
29. Barrandeguy, M. y García, M. 2014. Quantifying genetic diversity: the starting point for population genetic studies using molecular markers. *Journal of Genetics*,93(2):587-589.
30. Barraza, J., Montes, J., Martínez, N y Deloya, C.2010. Ensamblaje de escarabajos coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) del bosque tropical seco, Bahía Concha, Santa Marta (Colombia). *Revista Colombiana de Entomología*, 36(2):285-291.
31. Barton, N y Slatkin, M. 1986. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*,56(3):409.
32. Batista, P., Janes, J., Boone, C., Murray, B y Sperling, F. 2016. Adaptive and neutral markers both show continent-wide population structure of mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*). *Ecology and Evolution*,6(17):6292-6300.
33. Bergstrom, B., Maki, L y Werner, B. 1976. Small dung beetles as biological control agents: laboratory studies of beetle action on trichostrongylid eggs in sheep and cattle feces. *Proceedings*, 43:171-174.
34. Bermúdez-Wilches, L. 2012.Capital Social y Gobernanza En Mosaicos De Áreas Protegidas: El Caso Del Santuario De Flora y Fauna Los Colorados.Pontificia Universidad Javeriana.Bogotá:115 p.
35. Bernatchez, L. 2016. On the maintenance of genetic variation and adaptation to environmental change: considerations from population genomics in Fishes. *Journal of Fish Biology*,89(6):2519-2556.
36. Bian, L., Su, Y y Gaffney, P. 2016. Development of SNP markers for analysis of population structure in white perch (*Morone americana*) using double digest restriction site-associated DNA sequencing. *Conservation Genetics Resources*,8(4):403-406.
37. Bicknell, J., Phelps, S., Davies, R., Mann, D., Struebig, M. y Davies, Z. 2014. Dung beetles as indicators for rapid impact assessments: evaluating best practice forestry in the neotropics. *Ecological Indicators*,43:154-161.
38. Bird, C., Karl, S., Smouse, P. y Toonen, R. 2011. Detecting and measuring genetic differentiation. *Phylogeography and Population Genetics in Crustacea*,19(3): 1-55.

39. Bischoff, A., Steinger, T. y Müller-Schärer, H. 2010. The importance of plant provenance and genotypic diversity of seed material used for ecological restoration. *Restoration Ecology*,18(3):338-348.
40. Bocanegra-González, K., Thomas, E., Guillemin, M., Caicedo, C., Higueta, L, Gonzalez, M. y De Carvalho, D. 2019. Diversidad y estructura genética de cuatro especies arbóreas clave del Bosque Seco Tropical en Colombia. *Caldasia*,41(1):78-91.
41. Botero-Cruz, A. 2010. Evaluación De La Factibilidad De Implementación De Un Corredor De Conservación Para Jaguar (*Panthera onca*), En Las Zonas De Influencia De Los Santuarios De Flora y Fauna Los Colorados En Los Montes De María (Bolívar) y El Corchal" El Mono Hernández" en el delta del Canal del Dique. Facultad de Ciencias Universidad Javeriana. Bogotá.55 p.
42. Botstein, D., White, R., Skolnick, M., y Davis, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*,32(3): 314-331.
43. Boughton, D. 1999. Empirical evidence for complex source–sink dynamics with alternative states in a butterfly metapopulation. *Ecology*,80(8):2727-2739.
44. Braga, R., Korasaki, V., Andresen, E y Louzada, J. 2013. Dung beetle community and functions along a habitat-disturbance gradient in the Amazon: a rapid assessment of ecological functions associated to biodiversity. *PLoS One*,8(2): e57786.
45. Bowen, B. 1999. Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology*,8: S5-S10.
46. Brown, J., Scholtz, C., Janeau, J., Grellier, S y Podwojewski, P. 2010. Dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) can improve soil hydrological properties. *Applied Soil Ecology*,46(1):9-16.
47. Brumfield, R., Beerli, P., Nickerson, D. y Edwards, S. 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology & Evolution*,18(5):249-256.
48. Buckhout-White, S., Person, C., Medintz, I y Goldman, E.2018. Restriction enzymes as a target for DNA-based sensing and structural rearrangement. *ACS Omega*,3(1):495-502.
49. Buerkle, A y Gompert, C. 2013. Population genomics based on low coverage sequencing: how low should we go? *Molecular Ecology*,22(11):3028-3035.
50. Bui, V., Ziegler, T y Bonkowski, M. 2020. Morphological traits reflect dung beetle response to land use changes in tropical karst ecosystems of Vietnam. *Ecological Indicators*,108(105697).
51. Cambefort, Y. 1991. From saprophagy to coprophagy. 22-35. Hanski y Cambefort. *Dung Beetle Ecology*. Princeton University Press, Nueva Jersey.481 p.

52. Cariou, M., Duret, L. y Charlat, S. 2013. Is RAD-seq suitable for phylogenetic inference? An in silico assessment and optimization. *Ecology and Evolution*,3(4):846-852.
53. Carvajal-Cogollo, J y Urbina-Cardona, J. 2008. Patrones de diversidad y composición de reptiles en fragmentos de bosque seco tropical en Córdoba, Colombia. *Tropical Conservation Science*,1(4):397-416.
54. Castaño-Villa, G. 2005. Áreas protegidas, criterios para su selección y problemáticas en su conservación. *Boletín Científico, Centro De Museos, Museo De Historia Natural*,10:79-102.
55. Catchen, J., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W. y Postlethwait, J.2011. Stacks: building and genotyping Loci de novo from short-read sequences. *G3 (Bethesda, Md.)*, Aug,1(3):171-182.
56. Catchen, J., Hohenlohe, P., Bassham, S., Amores, A. y Cresko, W. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*,22(11):3124-3140.
57. Chen, F., Shi, J., Luo, Y., Sun, S. y Pu, M. 2013. Genetic characterization of the gypsy moth from China (Lepidoptera, *Lymantriidae*) using inter simple sequence repeats markers. *PLoS One*,8(8):73017.
58. Coates, D., Byrne, M y Moritz, C. 2018. Genetic diversity and conservation units: Dealing with the species-population continuum in the age of genomics. *Frontiers in Ecology and Evolution*,6:165.
59. Colparques. 2020. <http://www.colparques.net/COLORADOS>. 01/04/2020
60. Cooke, T., Yee, M., Muzzio, M., Sockell, A., Bell, R., Cornejo, O., Kelley, J., Bailliet, G., Bravi, C., Bustamante, C. y Kenny, E. 2016. GBStools: A Statistical Method for Estimating Allelic Dropout in Reduced Representation Sequencing Data. *PLoS Genetics*, Feb 1,12(2): e1005631.
61. Cordeiro, E., Macrini, C., Sujii, P., Schwarcz, K., Pinheiro, J., Rodrigues, R., Brancalion, P. y Zucchi, M. 2019. Diversity, genetic structure, and population genomics of the tropical tree *Centropogon tomentosum* in remnant and restored Atlantic forests. *Conservation Genetics*,20(5):1073-1085.
62. Crossley, M., Rondon, S y Schoville, S. 2019. Effects of contemporary agricultural land cover on Colorado potato beetle genetic differentiation in the Columbia Basin and Central Sands. *Ecology and Evolution*,9(16):9385-9394.
63. Cruaud, A., Gautier, M., Galan, M., Foucaud, J., Sauné, L., Genson, G., Dubois, E., Nidelet, S., Deuve, T. y Rasplus, J. 2014. Empirical assessment of RAD sequencing for interspecific phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*,31(5):1272-1274.
64. Császár, P., Torma, A., Gallé-Szpisjak, N., Tölgyesi, C y Gallé, R. 2018. Efficiency of pitfall traps with funnels and/or roofs in capturing ground-dwelling arthropods. *European Journal of Entomology*,115:15-24.
65. Cultid-Medina, C., Medina, C., Martínez, B., Escobar A., Constantino L, y Betancur N. 2012. Escarabajos coprófagos (Scarabaeinae) del eje cafetero: guía para el estudio ecológico. WCS Books, Colombia. 196 p.

66. Danzmann, R., Ferguson, M. y Yallendorf, F. 1988. Heterozygosity and Components of Fitness in a strain of rainbow trout. *Biological Journal of the Linnean Society*,33(3):285-304.
67. da Silva, P y Hernández, M. 2015. Spatial patterns of movement of dung beetle species in a tropical forest suggest a new trap spacing for dung beetle biodiversity studies. *PLoS One*,10(5): e (126112).
68. Davey, J., Hohenlohe, P., Etter, P., Boone, J., Catchen, J y Blaxter, M. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*,12(7):499.
69. Davey, J., Cezard, T., Fuentes-Utrilla, P., Eland, C., Gharbi, K y Blaxter, M. 2013. Special features of RAD Sequencing data: implications for genotyping. *Molecular Ecology*,22(11):3151-3164.
70. Davis, A., Holloway, J., Huijbregts, H., Krikken, J., Kirk-Spriggs, A. y Sutton, S. 2001. Dung beetles as indicators of change in the forests of northern Borneo. *Journal of Applied Ecology*,38(3):593-616.
71. Davis, A., Scholtz, C., Dooley, P., Bham, N y Kryger, U. 2004. Scarabaeine dung beetles as indicators of biodiversity, habitat transformation and pest control chemicals in agro-ecosystems. *South African Journal of Science*,100(9-10):415-424.
72. Dawson, I., Lengkeek, A., Weber, J. y Jamnadass, R. 2009. Managing genetic variation in tropical trees: linking knowledge with action in agroforestry ecosystems for improved conservation and enhanced livelihoods. *Biodiversity and Conservation*,18(4):969-986.
73. Delgado, P. 2012. Influencia del hábitat sobre el ensamblaje de escarabajos coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) en bosques secos en el municipio de Chimichagua (Cesar). Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 556 p.
74. Delgado-Gómez, P., Lopera A y Rangel, J. 2012. Variación espacial del ensamblaje de escarabajos coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) en remanentes de bosque seco en Chimichagua (Cesar, Colombia). 833-849. J.O. Rangel-Ch. Colombia Diversidad Biótica XII: La región Caribe de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá. 1046 p.
75. De-Lucas, A. 2009. Flujo genético, demografía y variabilidad genética en una conífera Mediterránea emblemática, el pino negral o rodano. Departamento de Producción Vegetal y Recursos Forestales. Universidad de Valladolid, Valladolid. 104 p.
76. Díaz, J. 2006. Bosque Seco Tropical Colombia. Banco de Occidente. Cali, Colombia.
77. Díaz, A., Galante, E y Favila, M.2010. The effect of the landscape matrix on the distribution of dung and carrion beetles in a fragmented tropical rain forest. *Journal of Insect Science*,10(81):1-16

78. Díaz, S., Purvis, A., Cornelissen, J., Mace, G., Donoghue, M., Ewers, R., Jordano, P y Pearse, W. 2013. Functional traits, the phylogeny of function, and ecosystem service vulnerability. *Ecology and Evolution*,3(9):2958-2975.
79. Díaz-Arce, N., Arrizabalaga, H., Murua, H., Irigoien, X y Rodríguez-Ezpeleta, N. 2016. RAD-seq derived genome-wide nuclear markers resolve the phylogeny of tunas. *Molecular Phylogenetics and Evolution*,102:202-207.
80. Díaz-Arce, N y Rodríguez-Ezpeleta, N. 2019. Selecting RAD-seq data analysis parameters for population genetics: the more the better? *Frontiers in Genetics*,10:533.
81. Diekmann, O., Gyllenberg, M., Metz, J. y Thieme, H. R. 1998. On the formulation and analysis of general deterministic structured population models I. Linear theory. *Journal of Mathematical Biology*,36(4):349-388.
82. Doube, B. 2018. Ecosystem services provided by dung beetles in Australia. *Basic and Applied Ecology*,26:35-49
83. Drag, L. y Cizek, L. 2015. Successful reintroduction of an endangered veteran tree specialist: conservation and genetics of the Great Capricorn beetle (*Cerambyx cerdo*). *Conservation Genetics*,16(2):267-276.
84. Ebel, E., DaCosta, J., Sorenson, M., Hill, R., Briscoe, A., Willmott, K. y Mullen, S. 2015. Rapid diversification associated with ecological specialization in Neotropical *Adelpha* butterflies. *Molecular Ecology*,24(10):2392-2405.
85. Echeverría-Londoño, S., Newbold, T., Hudson, L., Contu, S., Hill, S., Lysenko, I., Arbeláez-Cortés, E., Armbrrecht, I., Boekhout, T y Cabra-García, J. 2016. Modelling and projecting the response of local assemblage composition to land use change across Colombia. *Diversity and Distributions*,22(11):1099-1111.
86. Eguiarte, L., Aguirre-Liguori, J., Jardón-Barbolla, L., Aguirre-Planter, E. y Souza, V. 2013. Genómica de poblaciones: nada en Evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *TIP.Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*,16(1):42-56.
87. Ellegren, H y Galtier, N. 2016. Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*,17(7):422-433.
88. Ellstrand, N y Rieseberg, L.2016.When gene flow really matters: gene flow in applied evolutionary biology. *Evolutionary. Applications*, 9(7):833–836.
89. Elshire, R., Glaubitz, J., Sun, Q., Poland, J., Kawamoto, K., Buckler, E. y Mitchell, S. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS One*, May 4,6(5): e19379.
90. Emerson, K., Merz, C., Catchen, J., Hohenlohe, P., Cresko, W., Bradshaw, W. y Holzapfel, C. 2010. Resolving postglacial phylogeography using high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Sep 14,107(37):16196-16200.

91. Emlen, D. 1997. Alternative reproductive tactics and male-dimorphism in the horned beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*,41(5):335-341.
92. Engelhardt, K., Lloyd, M y Neel, M. 2014. Effects of genetic diversity on conservation and restoration potential at individual, population, and regional scales. *Biological Conservation*,179:6-16.
93. Erlich, H y Arnheim, N. 1992. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annual Review of Genetics*,26(1):479-506.
94. Eschscholtz, J. 1822. Beschreibungen neuer Insecten. *Entomographien Erster Lieferung*.G Reimer, Berlin. iii:128.
95. Etter, Paul D., Bassham, S., Hohenlohe, P., Johnson, E., y Cresko, W. 2011. SNP Discovery and Genotyping for Evolutionary Genetics using RAD Sequencing. 157-178. *Anonymous Molecular methods for evolutionary genetics*. Springer
96. Excoffier, L., Smouse, P y Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, Jun,131(2):479-491.
97. FCDS. 2016. <http://fcds.org.co/project/conectividad-de-bosque-seco-tropical-en-el-caribe-colombiano/> .(27/05/2018)
98. Feder, J., Opp, S., Wlazlo, B., Reynolds, K., Go, W y Spisak, S. 1994. Host fidelity is an effective premating barrier between sympatric races of the apple maggot fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Aug 16,91(17):7990-7994.
99. Ferreira-Neto, C., dos Santos Cruz, Geyner., Alves de Amorim, I., Balbino, V., de Moura y Rita de Cássia. 2017. Effects of fragmentation and anthropic pressure on the genetic structure of *Canthon (Peltecanthon) staigi* (Coleoptera: Scarabaeidae) populations in the Atlantic Forest domain. *Journal of Insect Conservation*, 21(2):267-276.
100. Fischer, M., Rellstab, C., Leuzinger, M., Roumet, M., Gugerli, F., Shimizu, K. K., Holderegger, R y Widmer, A. 2017. Estimating genomic diversity and population differentiation an empirical comparison of microsatellite and SNP variation in *Arabidopsis halleri*. *BMC Genomics*,18:1:69.
101. Fontalvo-Rodríguez, L y Domínguez-Haydar, Y. 2009. *Ectatomma ruidum* (Roger) como indicadora de diversidad de hormigas cazadoras (Hymenoptera: Formicidae) y relación con estructura vegetal en parches de bosque seco del Caribe colombiano. *Intropica*,29-39.
102. Fouet, C., Kamdem, C., Gamez, S. y White, B. 2017. Extensive genetic diversity among populations of the malaria mosquito *Anopheles moucheti* revealed by population genomics. *Infection, Genetics and Evolution*,48:27-33
103. Franke, K. y Fischer, K. 2013. Effects of inbreeding and temperature stress on life history and immune function in a butterfly. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(3):517-528.

104. Frankham, R., Ballou, J., y Briscoe, D. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
105. Frankham, R., Ballou, J., y Briscoe, D. 2010. Introduction to Conservation Genetics. Segunda edición. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.
106. Frankham, R., Ballou, J., Ralls, K., Eldridge, M., Dudash, M., Fenster, C., Lacy, R., y Sunnucks, P. 2017. Genetic Management of Fragmented Animal and Plant Populations. Oxford University Press, Oxford, U.K.391 p.
107. Freeland, J., Kirk, H., y Petersen, S. 2011. Molecular ecology (2nd ed.). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
108. Fröhlich, T., Kirschbaum, T., Thoenes, U., Furrer, F., Dietrich-Veenstra, U y Seller, M. 2004. The LightTyper Instrument: High-Throughput Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms. *Biochemica-Mannheim*,2:9-11.
109. Fumagalli, M., Vieira, F., Korneliussen, T., Linderoth, T., Huerta-Sanchez, E., Albrechtsen, A y Nielsen, R. 2013. Quantifying population genetic differentiation from next-generation sequencing data. *Genetics*, Nov,195(3):979-992.
110. Galván-Guevara y Sierra., S. 2009. Biodiversidad en el área de influencia de la Estación Primates de Colosó, Sucre, Colombia. *Revista Colombiana De Ciencia Animal-RECIA*,98-121.
111. García-Atencia, S. y Martínez-Hernández, N. 2015. Escarabajos fitófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) del departamento del Atlántico, Colombia. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 31: 89–96.
112. Gardner, T., Hernández, M., Barlow, J y Peres, C. 2008. Understanding the biodiversity consequences of habitat change: the value of secondary and plantation forests for neotropical dung beetles. *Journal of Applied Ecology*,45(3):883-893.
113. Garg, R y Mishra, V. 2018. Molecular insights into the genetic and haplotype diversity among four populations of *Catla catla* from Madhya Pradesh revealed through mtDNA cyto b gene sequences. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*,16(1):169-174.
114. Gaublomme, E., Maebe, K., Doninck, K., Dhuyvetter, H., Li, X., Desender, K. y Hendrickx, F. 2013. Loss of genetic diversity and increased genetic structuring in response to forest area reduction in a ground dwelling insect: a case study of the flightless carabid beetle *Carabus problematicus* (Coleoptera, Carabidae). *Insect Conservation and Diversity*,6(4):473-482.
115. Gauffre, B., Mallez, S., Chapuis, M., Leblois, R., Litrico, I., Delaunay, S y Badenhauer, I. 2015. Spatial heterogeneity in landscape structure influences dispersal and genetic structure: empirical evidence from a grasshopper in an agricultural landscape. *Molecular Ecology*,24(8):1713-1728.
116. Gautier, M., Gharbi, K., Cezard, T., Foucaud, J., Kerdelhué, C., Pudlo, P., ... y Estoup, A. 2013. The effect of RAD allele dropout on the estimation of genetic variation within and between populations. *Molecular ecology*, 22(11), 3165-3178.

117. Genier, F. 2012. A new species and notes on the subgenus *Deltochilum* (*Deltochilum*) Eschscholtz, 1822 (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae: Deltochilini). *Zootaxa*,3357(1):25-36.
118. Gil, P., Benavides M., Hernández, H; Nogueira P., Fontes, G., Lima, E.2014. Genetic variability and population structure of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) In Brazil, Inferred by Aflp Markers. *Cenicafé* 65 (2):42-54.
119. Giraldo, C., Escobar, F., Chara, J. y Calle, Z.2011. The adoption of silvopastoral systems promotes the recovery of ecological processes regulated by dung beetles in the Colombian Andes. *Insect Conservation and Diversity*,4(2):115-122.
120. Giska, I., Babik, W., van Gestel, C., van Straalen, N. y Laskowski, R. 2015. Genome-wide genetic diversity of rove beetle populations along a metal pollution gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,119:98-105.
121. González, E. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*,59(2-3):377-388.
122. González A., Molano, F.y Medina, C. 2009. Los subgéneros *Calhyboma*, *Hybomidium* y *Telhyboma* (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae: *Deltochilum*) en Colombia. *Revista Colombiana De Entomología*,35(2):253-274.
123. González, E. 2011. Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas: *Ilexperado spp.* Lopezlilloi (Arquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Universidad de las Palmas de Gran Canaria, 241 p.
124. González-Alvarado, A. y Vaz-de-Mello, F.2014. Taxonomic review of the subgenus *Hybomidium* Shipp 1897 (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae: *Deltochilum*). *Annales De La Société Entomologique De France (N.S.)*,10/02,50(3-4):431-476.
125. González-Alvarado, A. y Medina, C. 2015. Listado de especies de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) de bosque seco de Colombia. *Biota Colombiana* 16(1):36 -44.
126. González-Alvarado, A., Molano-Rendón, F y Vaz-de-Mello, F. Z. 2019. A new genus of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) endemic to the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Natural History*,53(27-28):1751-1765.
127. González-M, R., García, H., Isaacs, P., Cuadros, H., López-Camacho, R., Rodríguez, N., Pérez, K., Mijares, F., Castaño-Naranjo, A y Jurado, R. 2018. Disentangling the environmental heterogeneity, floristic distinctiveness and current threats of tropical dry forests in Colombia. *Environmental Research Letters*,13(4):045007.
128. González-Tokman, D., Cultid-Medina, C., Díaz, A., Escobar, F., Ocampo-Palacio, L y Martínez-Garza, C. 2018. Success or failure: the role of ecological

- restoration on the recovery of dung beetle diversity and function in a tropical rainforest. *Revista Mexicana De Biodiversidad*,89(1):232-242.
129. Goodall-Copestake, W., Tarling, G y Murphy, E. 2012. On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene *cox1* in animals. *Heredity*,109(1):50.
 130. Goudet, J y Jombart T. 2005. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*,5(1):184-186.
 131. Griffiths, H., Louzada, J., Bardgett, R. y Barlow, J. 2016. Assessing the Importance of Intraspecific Variability in Dung Beetle Functional Traits. *PloS One*,Mar 3,11(3):e0145598.
 132. Guillardín-Calvo, L., Mora-Márquez, F., Soto, Á y de Heredia, U. 2019. RAD designer: a workflow to select the optimal sequencing methodology in genotyping experiments on woody plant species. *Tree Genetics & Genomes*,15(4):64.
 133. Halffter, G., Matthews, E y Matthews, F. 1966. The natural history of dung beetles in the subfamily Scarabaeidae (Coleoptera, Scarabaeidae). *Folia Entomológica Mexicana*.12-14:1-312.
 134. Halffter, G. y Edmonds, W. 1982. *The Nesting Behavior of Dung-Beetles. An Ecological and Evolutive Approach*. Instituto de Ecología de Mexico, Ciudad de Mexico. 176 p.
 135. Halffter, G y Halffter, V. 1989. Behavioral evolution of the nonrolling roller beetles. *Instituto De Ecología, México*,32:1-53.
 136. Halffter, G y Ezcurra, E.1992. La diversidad biológica de Iberoamérica. *Acta Zoológica Mexicana*. CYTED-D, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Instituto de Ecología, AC, Secretaria de Desarrollo Social, Xalapa.389p.
 137. Halffter, G y Morrone, J. 2017. An analytical review of Halffter's Mexican transition zone, and its relevance for evolutionary biogeography, ecology and biogeographical regionalization. *Zootaxa*,4226(1):1-46.
 138. Hamilton, M. 2009. *Population genetics*. United Kingdom Oxford, Reino Unido, John Wiley & Sons, Ltd. 424 p.
 139. Hanski, I. 1983. Distributional ecology and abundance of dung and carrion-feeding beetles (Scarabaeidae) in tropical rain forests in Sarawak, Borneo. *Acta Zoological Feenica*, 167: 1-45.
 140. Hanski I, Cambefort Y. 1991. Competition in dung beetles. In: Hanski I, Cambefort Y, editors. *Dung beetle ecology*. Princeton (NJ): Princeton University Press. 481 p.
 141. Hanski, I.1998. Metapopulation dynamics. *Nature*,396: 41–49.
 142. Hanski., I y Gaggioti., O. 2004. *Ecology, genetics and evolution of metapopulations*. Academic Press, San Diego.

143. Harmon, L. y Braude, S. 2010. Conservation of small populations: effective population sizes, inbreeding, and the 50/500 rule. 125-138. *An Introduction to Methods and Models in Ecology, Evolution, and Conservation Biology*. Academic Press, San Diego.
144. Hartl, D y Clark, A. 1997. *Principles of population genetics*. Sunderland, MA, Sinauer associates.
145. Hartl, D., y Clark, A. 2007. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Massachusetts. 565 p.
146. Hazlitt, S., Sigg, D., Eldridge, M y Goldizen, A. 2006. Restricted mating dispersal and strong breeding group structure in a mid-sized marsupial mammal (*Petrogale penicillata*). *Molecular Ecology*,15(10):2997-3007.
147. Helyar, S., Hemmer-Hansen, J., Bekkevold, D., Taylor, M., Ogden, R., Limborg, M., Cariani, A., Maes, G., Diopere, E. y Carvalho, G. 2011. Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources*,11:123-136.
148. Herazo-Vitola, F., Mercado-Gómez, J y Mendoza-Cifuentes, H. 2017. Estructura y composición florística del bosque seco tropical en los Montes de María (Sucre-Colombia). *Ciencia En Desarrollo*,8(1):71-82.
149. Hernández, C., Hurtado, G., Ortiz, Q y Walschulger, C. 1992. Unidades biogeográficas de Colombia. 100-151p. *Diversidad biológica de Iberoamérica*, Compilado por. G. Halffter. México.
150. Hess, J., Matala, A y Narum, S. 2011. Comparison of SNPs and microsatellites for fine-scale application of genetic stock identification of Chinook salmon in the Columbia River Basin. *Molecular Ecology Resources*,11:137-149.
151. Hickerson, M., Carstens, B., Cavender-Bares, J., Crandall, K., Graham, C., Johnson, J., Rissler, L., Victoriano, P. y Yoder, A. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*,54(1):291-301.
152. Hilsdorf, A y Krieger, J. 1998. *Biologia molecular na conservação de peixes: ferramentas moleculares e conservação genética*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Natal. (1). 10-12
153. Hohenlohe, P., Phillips, P. y Cresko, W. 2010. Using population genomics to detect selection in natural populations: key concepts and methodological considerations. *International Journal of Plant Sciences*,171(9):1059-1071.
154. Hohenlohe, P., Amish, S., Catchen, J., Allendorf, F. y Luikart, G. 2011. Next-generation RAD sequencing identifies thousands of SNPs for assessing hybridization between rainbow and westslope cutthroat trout. *Molecular Ecology Resources*,11:117-122.
155. Holdridge, L. 1967. *Life zone ecology*. *Life Zone Ecology*. Tropical Science Center, San José Costa Rica. 206 p.

156. Holliday, J., Aitken, S., Cooke, J., Fady, B., González-Martínez, S, Heuertz, M., Jaramillo-Correa, J., Lexer, C., Staton, M y Whetten, R. 2017. Advances in ecological genomics in forest trees and applications to genetic resources conservation and breeding. *Molecular Ecology*,26(3):706-717.
157. Holsinger, K. y Weir, B. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. *Nature Reviews Genetics*,10(9):639-650.
158. Holzman, J., Bohonak, A., Kirkendall, L., Gottlieb, D., Harari, A y Kelley, S. 2009. Inbreeding variability and population structure in the invasive haplodiploid palma- borer (*Coccotrypes dactyliperda*). *Journal of Evolutionary Biology*,22(5):1076-1087.
159. Howden, H. y Gill, B.1987. New species and new records of Panamanian and Costa Rican Scarabaeinae (Coleoptera: Scarabaeidae). *The Coleopterists' Bulletin*,41:201-224.
160. Howen, O y Young, H. 1981. Panamanian Scarabaeinae: Taxonomy, distribution, and habits (Coleoptera, Scarabaeidae)-*Contr. Ann.Ent.Inst*, 1,8(1):1-204.
161. Huang, H y Knowles, L. 2014. Unforeseen consequences of excluding missing data from next-generation sequences: simulation study of RAD sequences. *Systematic Biology*,65(3):357-365.
162. Huerta, C., Martínez, M., de Oca, E., Cruz-Rosales, M y Favila, M. 2013. The role of dung beetles in the sustainability of pasture and grasslands. *WIT Transactions on State-of-the-Art in Science and Engineering*,64
163. Hughes, J., Daily, G. y Ehrlich, P. 1997. Population diversity: its extent and extinction. *Science (Nueva York)*, Oct 24,278(5338):689-692.
164. IAvH. 2009. Caracterización de la biodiversidad y de los sistemas de uso en áreas de influencia de la Corporación Autónoma Regional de Sucre componente insectos: escarabajos coprófagos, mariposas y hormigas. 93–130p. En: Informe Técnico Final Convenio Carsucre de la Biodiversidad de los Sistemas de Uso en Áreas de Influencia de la Corporación Autónoma Regional de Sucre. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Colombia.
165. IAvH. 2011. Informe del Estado del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables 2011. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales – IDEAM. Bogotá.
166. IAvH.2016. Hito 7.3. Propuesta de monitoreo. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá.46 p.
167. IGAC- Instituto geográfico Agustín Codazzi. 1969. Monografía del departamento de Sucre. Oficina de Estudios Geográficos, Bogotá.

168. Jiménez-Ferbans, L., Mendieta, W., García, H y Amat, G. 2008. Notas sobre los escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) en ambientes secos de la región de Santa Marta, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 13 (2): 203-208.
169. Jiménez, B., De la Rosa, N., Naranjo, D., 2018. Plan de Manejo del Santuario de Flora y Fauna Los Colorados 2018-2023. Parques Nacionales Naturales de Colombia. 256 p.
170. Jombart, T. 2008. adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*,24(11):1403-1405.
171. Jombart, T y Ahmed, I. 2011. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*,27(21):3070-3071.
172. Jones, M., Forester, B., Teufel, A., Adams, R., Anstett, D., Goodrich, B., Landguth, E., Joost, S y Manel, S. 2013. Integrating landscape genomics and spatially explicit approaches to detect loci under selection in clinal populations. *Evolution*,67(12):3455-3468.
173. Jost, L. 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*,17(18):4015-4026.
174. Jungwirth, E.2017.Comparison of ddRAD Analysis Pipelines. Graz University of Technology Institute of Neural Engineering Institute of Computational Biotechnology.Graz.98 p.
175. Kai, W., Nomura, K., Fujiwara, A., Nakamura, Y., Yasuike, M., Ojima, N., Masaoka, T., Ozaki, A., Kazeto, Y y Gen, K. 2014. A ddRAD-based genetic map and its integration with the genome assembly of Japanese eel (*Anguilla japonica*) provides insights into genome evolution after the teleost-specific genome duplication. *BMC Genomics*,15(1):233.
176. Kamvar, Z., Tabima, J y Grünwald, N. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *Peerj*,2: e281.
177. Kamvar, Z. N., Brooks, J. C y Grünwald, N. J. 2015. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetics*,6:208.
178. Kang, A., Kim, K., Park, J y Kim, I. 2012. Genetic diversity of the dung beetle, *Copris tripartitus* (Coleoptera: Scarabaeidae), that is endangered in Korea. *Entomological Research*,42(5):247-261.
179. Kattan, G., Sánchez, C., Vélez, C., Ramírez, L y Celis, M. 2019. Beta diversity and knowledge gaps of Colombia's dry forests: implications for their conservation. *Caldasia*,41(1):5-11.
180. Kazachkova, N., Meijer, J. y Ekblom, B. 2008. Genetic diversity in European pollen beetle, *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae), populations assessed using AFLP analysis. *European Journ*

181. Keeling, M., 2002. Using individual-based simulations to test the Levins metapopulation paradigm. *Journal of Animal Ecology*,270-279. *al of Entomology*,105(5):807-814.
182. Kekkonen, J., Wikstrom, M y Brommer, J. 2012. Heterozygosity in an isolated population of a large mammal founded by four individuals is predicted by an individual-based genetic model. *PloS One*,7(9): e43482.
183. Keller, L. y Waller, D. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*,17(5):230-241.
184. Keyghobadi, N. 2007. The genetic implications of habitat fragmentation for animals. *Canadian Journal of Zoology*,85(10):1049-1064.
185. Khan, F. 2015. Molecular Markers: An Excellent Tool for Genetic Analysis. *Journal Molecular Biomarkand Diagnosis*. 6:233.
186. Kimura, M y Crow, J. 1964. The Number of Alleles that can be Maintained in a Finite Population. *Genetics*, Apr,49:725-738.
187. Kirk, H y Freeland, J. 2011. Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology. *International Journal of Molecular Sciences*,12(6):3966-3988.
188. Kirschner, S., Hunewald, O., Mériaux, S. B., Brunnhoefer, R., Muller, C. P y Turner, J. 2016. Focussing reduced representation CpG sequencing through judicious restriction enzyme choice. *Genomics*,107(4):109-119.
189. Kleinhans, C y Willows-Munro, S. 2019. Low genetic diversity and shallow population structure in the endangered vulture, *Gyps coprotheres*. *Scientific Reports*,9(1):1-11.
190. Knutsen, H., Rukke, B., Jorde, P. y Ims, R. 2000. Genetic differentiation among populations of the beetle *Bolitophagus reticulatus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in a fragmented and a continuous landscape. *Heredity*,84(6):667-676.
191. Kohlmann, B., Roderus, D., Elle, O., Solís, Á., Soto, X y Russo, R. 2010. Biodiversity conservation in Costa Rica: a correspondence analysis between identified biodiversity hotspots (Araceae, Arecaceae, Bromeliaceae, and Scarabaeinae) and conservation priority life zones. *Revista Mexicana De Biodiversidad*,81(2):511-559.
192. Koopae, H. y Koshkoiyeh, A.2014. SNPs Genotyping technologies and their applications in farm animals breeding programs. *Brazilian Archives of Biology and Technology*,57(1):87-95.
193. Lacy, R. 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology*,1(2):143-158.
194. Laikre, L., Palm, S. y Ryman, N. 2005. Genetic population structure of Fishes: implications for coastal zone management. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*,34(2):111-119.

195. Laikre, L., Nilsson, T., Primmer, C., Ryman, N. y Allendorf, F.2009. Importance of genetics in the interpretation of favourable conservation status. *Conservation Biology*,23(6):1378-1381.
196. Lal, M., Southgate, P., Jerry, D. y Zenger, K. 2016. Fishing for divergence in a sea of connectivity: the utility of ddRADseq genotyping in a marine invertebrate, the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Marine Genomics*,25:57-68.
197. Lam, A. W. 2017. *Phylogeography and Population Genetics of Diving Beetles in New Guinea*. University of California, Berkeley.83 p.
198. Larson, A., Wake, D., Yanev, K.1984. Measuring gene flow among populations having high levels of genetic fragmentation. *Genetics*, 106:293-308.
199. Leache, A., Chavez, A., Jones, L., Grummer, J., Gottscho, A y Linkem, C. 2015. Phylogenomics of phrynosomatid lizards: conflicting signals from sequence capture versus restriction site associated DNA sequencing. *Genome Biology and Evolution*,7(3):706-719.
200. Leaché, A. y Oaks, J.2017. The utility of single nucleotide polymorphism (SNP) data in phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*,48:69-84.
201. Ledig, F. 1988. The conservation of diversity in forest trees: why and how should genes be conserved? *Bioscience*,38(7):471-479.
202. Leffler, E., Bullaughey, K., Matute, D., Meyer, W., Segurel, L., Venkat, A., Andolfatto, P y Przeworski, M. 2012. Revisiting an old riddle: what determines genetic diversity levels within species? *PLoS Biology*,10(9): e1001388.
203. Leng, L y Zhang, D. 2011. Measuring population differentiation using GST or D? A simulation study with microsatellite DNA markers under a finite island model and nonequilibrium conditions. *Molecular Ecology*,20(12):2494-2509.
204. Leonardi, S, Piovani, P, Scalfi, M, Piotti, A, Giannini, R y Menozzi, P.2012. Effect of habitat fragmentation on the genetic diversity and structure of peripheral populations of beech in central Italy. *Journal of Heredity*,103(3): 408-417.
205. Lepais, O y Weir, J. 2014. Sim RAD: an R package for simulation-based prediction of the number of loci expected in RAD seq and similar genotyping by sequencing approaches. *Molecular Ecology Resources*,14(6):1314-1321.
206. Levins, R. 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *American Entomologist*,15(3):237-240.
207. Li, S., Wei, F., Du, J. y Yang, M.2017.Genetic diversity and spread of *Lissorhoptus oryzophilus* (Coleoptera: Curculionidae) in China, based on amplified fragment length polymorphism. *Journal of Asia-Pacific Entomology*,20(3):935-941.
208. Liu, J., Gui, F. y Li, Z. 2010. Genetic diversity of the planthopper, *Sogatella furcifera* in the Greater Mekong Subregion detected by inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. *Journal of Insect Science*,10(1):52.

209. López De Heredia, U. 2016. Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*,64:7-31.
210. Lozier, J., Jackson, J., Dillon, M. y Strange, J. 2016. Population genomics of divergence among extreme and intermediate color forms in a polymorphic insect. *Ecology and Evolution*,6(4):1075-1091.
211. Luck, G., Daily, G. y Ehrlich, P. 2003. Population diversity and ecosystem services. *Trends in Ecology y Evolution*,18(7):331-336.
212. Luikart, G., England, P., Tallmon, D., Jordan, S. y Taberlet, P. 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*,4(12):981.
213. Luquet, E., Lena, J., David, P., Prunier, J., Joly, P., Lengagne, T., Perrin, N. y Plénet, S. 2013. Within-and among-population impact of genetic erosion on adult fitness-related traits in the European tree frog *Hyla arborea*. *Heredity*,110(4):347-354.
214. Macherey-Nagel. 2017. Genomic DNA from tissue. User manual. 2017. https://www.cultek.com/media/wysiwyg/manuales/MACHEREY-NAGEL/DNA/Tissue_and_cells/NucleoSpin_8_Tissue.pdf. 15-19 p. (20/05/2020)
215. Machkour-M'Rabet, S., Leberger, R., León-Cortés, J., Gers, C. y Legal, L. 2014. Population structure and genetic diversity of the only extant Baroniinae swallowtail butterfly, *Baronia brevicornis*, revealed by ISSR markers. *Journal of Insect Conservation*,18(3):385-396.
216. Maldaner, M., Vaz-de-Mello, F., Takiya, D y Ferreira, D. 2019. Genetic and chromatic variation of *Coprophanaeus (Megaphanaeus) ensifer* (Germar, 1821) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Zoologischer Anzeiger*,283:150-160.
217. Manjeri, G., Muhamad, R., Faridah, Q. y Tan, S. 2011. Genetic variation studies in *Oryctes rhinoceros* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) from oil palm plantations using random amplified microsatellite (RAMs) markers. *African Journal of Biotechnology*,10(14):2611-2617.
218. Manning, P., Slade, E., Beynon, S. y Lewis, O. 2016. Functionally rich dung beetle assemblages are required to provide multiple ecosystem services. *Agriculture, Ecosystems & Environment*,218:87-94.
219. Maroso, F., Casanova, A., do Prado, F., Bouza, C., Pardo, B. G., Blanco, A., Hermida, M., Fernández, C., Vera, M y Martínez, P. 2018. Species identification of two closely exploited flatfish, turbot (*Scophthalmus maximus*) and brill (*Scophthalmus rhombus*), using a ddRADseq genomic approach. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*,28(5):1253-1260.
220. Martínez, N., Cañas, L., Rangel, J., Barraza, J., Montes, J y Blanco, O. 2010. Coleópteros coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) en un fragmento de bosque seco tropical en el departamento del Atlántico, Colombia. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 11(1): 21-30.
221. Masel, J. 2011. Genetic drift. *Current Biology: CB*, Oct 25,21(20):R837-8.

222. Mastretta-Yanes, A., Arrigo, N., Alvarez, N., Jorgensen, T., Piñero, D y Emerson, B. 2015. Restriction site-associated DNA sequencing, genotyping error estimation and de novo assembly optimization for population genetic inference. *Molecular Ecology Resources*,15(1):28-41.
223. McAndrew, B. y Napier, J. 2011. Application of genetics and genomics to aquaculture development: current and future directions. *The Journal of Agricultural Science*,149(S1):143-151.
224. McGeoch, M., Van Rensburg, B. y Botes, A. 2002. The verification and application of bioindicators: a case study of dung beetles in a savanna ecosystem. *Journal of Applied Ecology*,39(4):661-672.
225. Medina, C., Toro, A., Vítolo, A y Gill, B. 2001. Escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae) de Colombia. *Biota Colombiana*,2(2):131-144.
226. Medina, C., Escobar, F. y Kattan, G. 2002. Diversity and habitat use of dung beetles in a restored Andean landscape. *Biotropica*, 34(1):181-187.
227. Medina, C., González-Alvarado, A y Neita, J. 2018. Caracterización preliminar de escarabajos coprófagos y fitófagos (Coleoptera: Scarabaeidae, Melolonthidae) del bosque seco de la serranía de la Macuira, Alta Guajira, Colombia. *Cuadernos de Biodiversidad* 54:28-40.
228. Mesa, L., Santamaría M., García H y Aguilar-Cano J. (Eds.). 2016. Catálogo de biodiversidad de la región caribe. Volumen 3. Serie Planeación ambiental para la conservación de la biodiversidad en áreas operativas de Ecopetrol. Proyecto Planeación ambiental para la conservación de la biodiversidad en las áreas operativas de Ecopetrol. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt – Ecopetrol S.A, Bogotá D.C.452 p.
229. Mestre, F., Pita, R., Paupério, J., Martins, F., Alves, P., Mira, A. y Beja, P. 2015. Combining distribution modelling and non-invasive genetics to improve range shift forecasting. *Ecological Modelling*,297: 171-179.
230. Meyer, C., Fründ, J., Lizano, W. y Kalko, E.2008. Ecological correlates of vulnerability to fragmentation in Neotropical bats. *Journal of Applied Ecology*,45(1):381-391.
231. Miles, L., Newton, A., DeFries, R., Ravilious, C., May, I., Blyth, S., Kapos, V y Gordon, J. 2006. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of Biogeography*,33(3):491-505.
232. Millar, C., Ledig, F y Riggs, L. 1990. Conservation of diversity in forest ecosystems. *Forest Ecology and Management*, 35:1-4.
233. Milotić, T., Baltzinger, C., Eichberg, C., Eycott, A., Heurich, M., Müller, J., Noriega, J., Menendez, R., Stadler, J y Ádám, R. 2018. Dung beetle assemblages, dung removal and secondary seed dispersal: data from a large-scale, multi-site experiment in the Western Palaearctic. *Frontiers of Biogeography*,10:1-2.

234. Mitchell-Olds, T., Feder, M. y Wray, G. 2008. Evolutionary and Ecological Functional Genomics. *Heredity*, 100:101-102.
235. Molano, F y Parrales, D. 2015. A new species of *Scybalocanthos* Martínez 1948 (Coleoptera: Scarabaeinae) of the colombian Andes. *Boletín Científico. Centro De Museos. Museo De Historia Natural*, 19(2):359-368.
236. Moodley, Y., Russo, I., Dalton, D., Kotzé, A., Muya, S., Haubensak, P., Bálint, B., Munimanda, G., Deimel, C. y Setzer, A. 2017. Extinctions, genetic erosion and conservation options for the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Scientific Reports*, 7:41417.
237. Morgan, R. y Xu, Q. 2000. Type II Restriction Endonuclease, HpyCH4V, Obtainable from *Helicobacter Pylori* CH4 and a Process for Producing the Same,
238. Morin, P., Luikart, G y Wayne, R. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(4):208-216.
239. Moritz, C. 1994. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(10):373-375.
240. Moritz, C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, 51(2):238-254.
241. Motro, U y Thomson, G. 1982. On heterozygosity and the effective size of populations subject to size changes. *Evolution*, 1059-1066.
242. Müller, T. y Juškauskas, A. 2018. Inbreeding affects personality and fitness of a leaf beetle. *Animal Behaviour*, 138:29-37.
243. Nadeau, N., Ruiz, M., Salazar, P., Counterman, B., Medina, J., Ortiz-Zuazaga, H., Morrison, A., McMillan, W., Jiggins, C. y Papa, R. 2014. Population genomics of parallel hybrid zones in the mimetic butterflies, *H. melpomene* and *H. erato*. *Genome Research*, Aug, 24(8):1316-1333.
244. Namipashaki, A., Razaghi-Moghadam, Z y Ansari-Pour, N. 2015. The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies. *Cell Journal*, Summer, 17(2):187-192.
245. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Dec, 70(12):3321-3323.
246. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89(3):583-590.
247. Nei, M. y Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10): 5269-5273.
248. Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, Nueva York.
249. Nichols, E., Larsen, T., Spector, S., Davis, A., Escobar, F., Favila, M., Vulinec, K. y Network, T. 2007. Global dung beetle response to tropical forest

- modification and fragmentation: a quantitative literature review and meta-analysis. *Biological Conservation*,137(1):1-19.
250. Nichols, E., Spector, S., Louzada, J., Larsen, T., Amezquita, S. y Favila, M. 2008. Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. *Biological Conservation*,141(6):1461-1474.
251. Nichols, E., Gardner, T., Peres, C. y Spector, S. 2009. Co-declining mammals and dung beetles: an impending ecological cascade. *Oikos*,118(4):481-487.
252. Nielsen, R., Paul, J., Albrechtsen, A y Song, Y. 2011. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature Reviews Genetics*,12(6):443.
253. Nonaka, E., Sirén, J., Somervuo, P., Ruokolainen, L., Ovaskainen, O y Hanski, I. 2019. Scaling up the effects of inbreeding depression from individuals to metapopulations. *Journal of Animal Ecology*,88(8):1202-1214.
254. Noriega, J., Solís, C., Escobar, F y Realpe, E. 2007. Escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) de la provincia de la Sierra Nevada de Santa Marta. *Biota Colombiana* 8 (1): 77-86.
255. Noriega, J., Barranco, W., Hernández, J., Hernández, E., Castillo, S., Monroy, D y García H. 2016. Estructura estacional del ensamblaje de escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) en una parcela permanente de bosque seco tropical. *Revista de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*:40(154):75-83.
256. Obrist, M y Duelli, P. 1996. Trapping efficiency of funnel-and cup-traps for epigeal arthropods. *Mitteilungen-Schweizerische Entomologische Gesellschaft*,69:361-369.
257. Offerman, H., Dale, V., Pearson, S., O'Neill, R. y Bierregaard, R.1995. Effects of forest fragmentation on neotropical fauna: current research and data availability. *Environmental Reviews*,3(2):191-211.
258. O'Leary, S., Puritz, J., Willis, S., Hollenbeck, C. y Portnoy, D. 2018. These aren't the loci you're looking for: Principles of effective SNP filtering for molecular ecologists. *Molecular Ecology*,27(16):3193-3206.
259. Ontiveros, V., Capitán, J., Arthur, R., Casamayor, E y Alonso, D. 2019. Colonization and extinction rates estimated from temporal dynamics of ecological communities: The island r package. *Methods in Ecology and Evolution*,10(7):1108-1117.
260. Opdam, P. 1991. Metapopulation theory and habitat fragmentation: a review of holarctic breeding bird studies. *Landscape Ecology*,5(2):93-106.
261. Otavo, S., Parrado-Rosselli, Á y Noriega, J. A. 2013. Superfamilia Scarabaeoidea (Insecta: Coleoptera) como elemento bioindicador de perturbación antropogénica en un parque nacional amazónico. *Revista De Biología Tropical*,61(2):735-752.

262. Ouborg, N., Vergeer, P y Mix, C. 2006. The rough edges of the conservation genetics paradigm for plants. *Journal of Ecology*, 94(6):1233–1248.
263. Pan, Y., Wang, X., Sun, G., Li, F. y Gong, X. 2016. Application of RAD Sequencing for Evaluating the Genetic Diversity of Domesticated *Panax notoginseng* (Araliaceae). *PloS One*, Nov 15,11(11): e0166419.
264. Pannell, J y Charlesworth, B. 1999. Neutral genetic diversity in a metapopulation with recurrent local extinction and recolonization. *Evolution*,53(3):664-676.
265. Paradis, E. 2010. pegas: An R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics*,26(3):419-420.
266. Paradis, E., Blomberg, S., Bolker, B., Brown, J., Claude, J., Cuong, H. y Desper, R. 2019. Package “ape”. *Analyses of Phylogenetics and Evolution*, Version,2(4):
267. Paris, J., Stevens, J. y Catchen, J. M. 2017. Lost in parameter space: a road map for stacks. *Methods in Ecology and Evolution*,8(10):1360-1373.
268. Parker, G. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*,45(4):525-567.
269. Parques Nacionales Naturales. 2005. Plan de Manejo del SFF Los Colorados. San Juan Nepomuceno
270. Pascoal, S., Cezard, T., Eik-Nes, A., Gharbi, K., Majewska, J., Payne, E., Ritchie, M., Zuk, M. y Bailey, N. 2014. Rapid convergent evolution in wild crickets. *Current Biology*,24(12):1369-1374.
271. Pasquis, R.2016. Comisión del 31 de mayo al 3 de Junio de 2016 a la sede PNN Cartagena, PNN Corales de profundidad, SFF Corchal “El Mono Hernández”, SFF Los Colorados. Bogotá. 28p.
272. Pennington, R., Lavin, M. y Oliveira-Filho, A. 2009. Woody plant diversity, evolution, and ecology in the tropics: perspectives from seasonally dry tropical forests. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*,40:437-457.
273. Pessôa, M., Izzo, T. y Vaz-de-Mello, F. Z. 2017. Assemblage and functional categorization of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeinae) from the Pantanal. *Peerj*,5: e3978.
274. Peterson, B., Weber, J., Kay, E., Fisher, H. y Hoekstra, H.2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS One*,7(5): e37135.
275. Piñero, et al. 2008a. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. 437-494. Conabio. Capital Natural De México vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad, México.
276. Piñero, D., et al. 2008b. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en Capital natural de

- México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. 415-435 p
277. Pizano, C y García, H. (Editores). 2014. El Bosque Seco Tropical en Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D.C., Colombia. 349 p.
 278. PNN.Parques Nacionales Naturales de Colombia.2020.<http://www.parquesnacionales.gov.co/portal/es/ecoturismo/region-caribe/santuario-de-flora-y-fauna-los-colorados/.22/03/2020>.
 279. Portillo-Quintero, C. A. y Sánchez-Azofeifa, G. A. 2010. Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. *Biological Conservation*,143(1):144-155.
 280. Portillo-Quintero, C., Sanchez-Azofeifa, A., Calvo-Alvarado, J., Quesada, M y do Espirito Santo, Mario Marcos. 2015. The role of tropical dry forests for biodiversity, carbon and water conservation in the neotropics: lessons learned and opportunities for its sustainable management. *Regional Environmental Change*,15(6):1039-1049.
 281. Rafter, M., McCulloch, G., Daghish, G., Gurdasani, K. y Walter, G.2018. Polyandry, genetic diversity and fecundity of emigrating beetles: understanding new foci of infestation and selection. *Journal of Pest Science*,91(1):287-298.
 282. Rangel, J y Carvajal, J. 2012. Suelos de la región Caribe de Colombia. En: *Diversidad Biótica*, tomo XII. Rangel, J (Eds.). Universidad nacional de Colombia. Bogotá, Colombia,1:437-494.
 283. Rangel-Acosta, J., Blanco-Rodríguez, O y Martínez-Hernández, N. 2016a. Escarabajos copro-necrófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) en diferentes usos del suelo en la Reserva Campesina la Montaña (RCM) en el departamento del Atlántico, Colombia. *Boletín Científico Museo Historia Natural. Universidad de Caldas* 20 (1): 78-97.
 284. Rangel-Acosta, J., Hernández, N, Gutiérrez-Rapalino, N., Gutiérrez-Moreno, L., Borja-Acuña., R. 2016b. Efecto del tamaño de la ronda hidráulica sobre las comunidades de escarabajos coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) en la cuenca media y baja del río César, Colombia. *Entomotropica*,31:109-130.
 285. Rangel-Acosta, J. y Martínez-Hernández, N.2017. Comparación de los ensamblajes de escarabajos copronecrófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) entre fragmentos de bosque seco tropical y la matriz adyacente en el departamento del Atlántico-Colombia. *Revista Mexicana De Biodiversidad*,88(2):389-401.
 286. Rangel-Acosta, J., Solano-Torres, J. y Martínez-Hernández, N. 2018. Variación temporal y vertical de los escarabajos coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) en dos fragmentos de Bosque Seco Tropical en el departamento del Atlántico-Colombia. *Boletín Científico.Centro De Museos.Museo De Historia Natural*,22(1):179-198.

287. Rangel-Acosta, J., Martínez-Hernández, N., y Yonoff-Zapata, R. 2020. Respuesta de los escarabajos coprófagos (Scarabaeidae: Scarabaeinae) a la modificación del hábitat causada por un incendio forestal en la Reserva Bijibana, Atlántico-Colombia. *Revista Mexicana De Biodiversidad*,91.
288. Ree, R. y Hipp, A. 2015. Inferring phylogenetic history from restriction site associated DNA (RADseq). *Next-Generation Sequencing in Plant Systematics*. (Eds E Hörandl, MS Appelhans),181-204.
289. Rochette, N y Catchen, J. 2017. Deriving genotypes from RAD-seq short-read data using Stacks. *Nature Protocols*,12(12):2640-2659.
290. Rodríguez, G., Banda, K., Reyes, S y González, A. 2012. Lista comentada de las plantas vasculares de bosques secos prioritarios para la conservación en los departamentos de Atlántico y Bolívar (Caribe colombiano. *Biota Colombiana*,13(2).
291. Rodríguez-Ezpeleta, N., Bradbury, I. R., Mendibil, I., Álvarez, P., Cotano, U. y Irigoien, X. 2016. Population structure of Atlantic mackerel inferred from RAD-seq-derived SNP markers: Effects of sequence clustering parameters and hierarchical SNP selection. *Molecular Ecology Resources*,16(4):991-1001.
292. Roehrdanz, R., Bouchier, R., Cortilet, A., Olson, D. y Sears, S. 2011. Phylogeny and genetic diversity of flea beetles (*Aphthona sp.*) introduced to North America as biological control agents for leafy spurge. *Annals of the Entomological Society of America*,104(5):966-975.
293. Rosero-Toro, J., Romero-Duque, L., Santos-Fita, D y Ruan-Soto, F. 2018. Cultural significance of the flora of a tropical dry forest in the Doche vereda (Villavieja, Huila, Colombia). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*,14(1):22.
294. Rudas, G., Marcelo, D., Armenteras, D., Rodríguez, N., Morales, M., Delgado, L y Sarmiento, A. 2007. Biodiversidad y actividad humana: relaciones en ecosistemas de bosque subandino en Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D. C., Colombia. 128 p.
295. RUNAP.2018. Departamento de Sucre. <https://runap.parquesnacionales.gov.co/departamento/936>. (26/03/2020).
296. Rybicki, J y Hanski, I. 2013. Species–are a relationships and extinctions caused by habitat loss and fragmentation. *Ecology Letters*,16(1):27-38.
297. Salwasser, H. 1990. Conserving biological diversity: a perspective on scope and approaches. *Forest Ecology and Management*,35(1-2):79-90.
298. Sampedro, A., Gómez, H y Ballut, G. 2014. Estado de la vegetación en localidades abandonadas por “desplazamiento”, en los Montes de María Sucre, Colombia. *Revista Colombiana De Ciencia Animal-RECIA*,184-193.
299. Santos-Heredia, C., Andresen, E., del-Val, E., Zárate, D., Nava-Mendoza, M y Jaramillo, V. 2016. The activity of dung beetles increases foliar nutrient concentration in tropical seedlings. *Biotropica*,48(5):565-567.

300. Schaberg, P., DeHayes, D., Hawley, G. y Nijensohn, S. 2008. Anthropogenic alterations of genetic diversity within tree populations: implications for forest ecosystem resilience. *Forest Ecology and Management*, 256(5):855-862.
301. Schebeck, M., Schuler, H., Einramhof, B., Avtzis, D., Dowle, E., Faccoli, M., Battisti, A., Ragland, G., Stauffer, C y Bertheau, C. 2019. The Apennines as a cryptic Pleistocene refugium of the bark beetle *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 127(1):24-33.
302. Scheben, A., Batley, J y Edwards, D. 2017. Genotyping-by-sequencing approaches to characterize crop genomes: choosing the right tool for the right application. *Plant Biotechnology Journal*, 15(2):149-161.
303. Scholtz, C., Davis, A., y Kryger, U. 2009. Evolutionary biology and conservation of dung beetles. Pensoft, Sofia-Moscow. 481 p.
304. Shirasawa, K., Hirakawa, H y Isobe, S. 2016. Analytical workflow of double-digest restriction site-associated DNA sequencing based on empirical and in silico optimization in tomato. *DNA Research*, 23(2):145-153.
305. Schmeller, D., Schregel, J y Veith, M. 2007. The importance of heterozygosity in a frog's life. *Naturwissenschaften*, 94(5):360-366.
306. Schmidt, T., Rašić, G., Zhang, D., Zheng, X., Xi, Z. y Hoffmann, A. 2017. Genome-wide SNPs reveal the drivers of gene flow in an urban population of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11:10:e0006009.
307. Schowalter, T., Noriega, J. y Tschardtke, T. 2018. Insect Effects on Ecosystem services—Introduction, 26:1-7.
308. Schweyen, H., Rozenberg, A y Leese, F. 2014. Detection and removal of PCR duplicates in population genomic ddRAD studies by addition of a degenerate base region (DBR) in sequencing adapters. *The Biological Bulletin*, 227(2):146-160.
309. Seeb, J., Carvalho, G., Hauser, L., Naish, K., Roberts, S. y Seeb, L. 2011. Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in non model organisms. *Molecular Ecology Resources*, 11:1-8.
310. Selkoe, K y Toonen, R. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5):615-629.
311. Sembène, M., Rasplus, J., Silvain, J., y Delobel, A. 2008. Genetic differentiation in sympatric populations of the groundnut seed beetle *Caryedon serratus* (Coleoptera: Chrysomelidae): New insights from molecular and ecological data. *International Journal of Tropical Insect Science*, 28(3): 168-177.
312. Shipp, J. 1897. On the synonymy of the genus *Deltochilum*. *Entomologische Nachrichten*, 23(13):194-196.
313. Sielezniew, M., Rutkowski, R, Ponikwicka, D., Ratkiewicz, M., Dziekańska, I y Švitra, G. 2012. Differences in genetic variability between two ecotypes of

- endangered myrmecophilous butterfly *Phengaris* (= *Maculinea*) *alcon* – the setting of conservation priorities. *Insect Conservation Diversity* 5:223–236.
314. Simmons, L., y Ridsdill-Smith, T. (Eds.). 2011. Ecology and evolution of dung beetles. John Wiley y Sons, 290 p.
 315. Singhal, S., Huang, H., Title, P., Donnellan, S., Holmes, I. y Rabosky, D. 2017. Genetic diversity is largely unpredictable but scales with museum occurrences in a species-rich clade of Australian lizards. *Proceedings. Biological Sciences*, 17(284):1854:10.
 316. Sitters, J., Maechler, M., Edwards, P., Suter, W y Olde Venterink, H. 2014. Interactions between C: N: P stoichiometry and soil macrofauna control dung decomposition of savanna herbivores. *Functional Ecology*, 28(3):776-786.
 317. Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16(1):393-430.
 318. Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*, 236(4803):787-792.
 319. Smouse, P., Peakall, R y Gonzales, E. 2008. A heterogeneity test for fine scale genetic structure. *Molecular Ecology*, 17(14):3389-3400.
 320. Sole, C. 2005. Phylogeography of *Scarabaeus* (*Pachysoma*) MacLeay (Scarabaeidae: Scarabaeinae). University of Pretoria.
 321. Solís, C., Noriega, J. y Herrera, G. 2011. Escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeinae) en tres bosques secos del departamento del Atlántico-Colombia. *Boletín Del Museo De Entomología De La Universidad Del Valle*, 12(1):33-41.
 322. Soria-Carrasco, V., Gompert, Z., Comeault, A., Farkas, T., Parchman, T., Johnston, J., Buerkle, C., Feder, J., Bast, J., Schwander, T., Egan, S., Crespi, B. y Nosil, P. 2014. Stick insect genomes reveal natural selection's role in parallel speciation. *Science (Nueva York)*, May 16, 344(6185):738-742
 323. Spector, S. 2006. Scarabaeine dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae): an invertebrate focal taxon for biodiversity research and conservation. *The Coleopterists Bulletin*, 60(5):71-83.
 324. Stapley, J., Reger, J., Feulner, P., Smadja, C., Galindo, J., Ekblom, R., Bennison, C., Ball, A., Beckerman, A. y Slate, J. 2010. Adaptation genomics: the next generation. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(12):705-712.
 325. Storer, C., Payton, A., McDaniel, S., Jordal, B. y Hulcr, J. 2017. Cryptic genetic variation in an inbreeding and cosmopolitan pest, *Xylosandrus crassiusculus*, revealed using dd RAD seq. *Ecology and Evolution*, 7(24):10974-10986.
 326. Strickland, L., Arias, C., Rodriguez, V., Johnston, J., McMillan, W. y Windsor, D. 2019. Inheritance, distribution and genetic differentiation of a color

- polymorphism in Panamanian populations of the tortoise beetle, *Chelymorpha alternans* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Heredity*,122(5):558-569.
327. Sullivan, C, Slade, E., Bai, M., Shi, K y Riordan, P. 2018. Evidence of forest restoration success and the conservation value of community-owned forests in Southwest China using dung beetles as indicators. *PloS One*, Nov 8,13(11): e0204764.
328. Takahashi, T., Nagata, N.y Sota, T. 2014. Application of RAD-based phylogenetics to complex relationships among variously related taxa in a species flock. *Molecular Phylogenetics and Evolution*,80:137-144.
329. Tarasov, S y Dimitrov, D. 2016. Multigene phylogenetic analysis redefines dung beetles relationships and classification (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). *BMC Evolutionary Biology*,16(1):257.
330. Team, R. 2015. RStudio: integrated development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.Rstudio.Com>,42(14).
331. Tonelli, M., Verdú, J. y Zunino, M. 2019. Grazing abandonment and dung beetle assemblage composition: Reproductive behaviour has something to say. *Ecological Indicators*,96:361-367.
332. Torkamaneh, D., Boyle, B y Belzile, F. 2018. Efficient genome-wide genotyping strategies and data integration in crop plants. *Theoretical and Applied Genetics*,131(3):499-511.
333. Thornhill, R. 1983. Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *The American Naturalist*,122(6):765-788.
334. Trivers, R. 1972. Parental investment and sexual selection. 136-179.I Campbell B (ed). *Sexual selection and the descent of man, 1871-1971*. Aldine, Chicago.
335. Tromeur, E., Rudolf, L. y Gross, T.2015.Impact of dispersal on the stability of metapopulations, *Journal of Theoretical. Biology*, 392:1–11
336. van Nouhuys, S.2009. Metapopulation Ecology. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley y Sons. 9 p.
337. van Nouhuys, S. 2016. Metapopulation Ecology.*Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley y Sons, Ltd: Chichester.
338. Van Tassell, C., Smith, T., Matukumalli, L., Taylor, J., Schnabel, R., Lawley, C., Haudenschild, C., Moore, S., Warren, W y Sonstegard, T. 2008. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. *Nature Methods*,5(3):247.
339. Vargas-Zapata, M., Boom-Urueta, C., Seña-Ramos, L., Echeverry-Iglesias, A. y Martínez-Hernández, N. 2015. Composición vegetal, preferencias alimenticias y abundancia de Biblidinae (Lepidoptera: Nymphalidae) en un fragmento de bosque seco tropical en el departamento del Atlántico, Colombia.*Acta Biológica Colombiana*,20(3): 79-92.

340. Vaz-de-Mello, F. 1999. Scarabaeidae s. str. (Coleoptera: Scarabaeoidea) de um fragmento de Floresta Amazônica no Estado do Acre, Brasil. 1. Taxocenose. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, 28(3):447–453.
341. Via, S., Bouck, A. C y Skillman, S. 2000. Reproductive isolation between divergent races of pea aphids on two hosts. II. Selection against migrants and hybrids in the parental environments. *Evolution*, 54(5):1626-1637.
342. Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M. y Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34(3):275.
343. Vulinec, K. 2002. Dung beetle communities and seed dispersal in primary forest and disturbed land in Amazonia. *Biotropica*, 34(2):297-309.
344. Vulinec, K., Lambert, J y Mellow, D. 2006. Primate and dung beetle communities in secondary growth rain forests: implications for conservation of seed dispersal systems. *International Journal of Primatology*, 27(3):855-879.
345. Wachi, N., Kusumi, J., Tzeng, H. y Su, Z. 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
346. Wachi, N., Matsubayashi, K. y Maeto, K. 2018. Application of next-generation sequencing to the study of non-model insects. *Entomological Science*, 21(1):3-11.
347. Wade, M. y McCauley, D. 1988. Extinction and recolonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution*, 42(5):995-1005.
348. Wang, Y., Zhang, Z y Xu, L. 2002. The genetic diversity of central and peripheral populations of ratlike hamster (*Cricetulus triton*). *Chinese Science Bulletin*, 47(3):201-206.
349. Wang, S., Haegeman, B., y Loreau, M. 2015. Dispersal and metapopulation stability. *PeerJ* 3: e1295
350. Weir, B. 2012. Estimating F-statistics: A historical view. *Philosophy of Science*, 79(5), 637–643.
351. Westwood J. 1835. Beetles. In: Partington ChF, editor. *British cyclopaedia of natural history: Combining a scientific classification of animals, plants and minerals*. Vol 1. London: Orr & Smith.
352. Wickham, H. 2011. ggplot2. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 3(2):180-185.
353. Wiens, J. 1997. *Metapopulation Dynamics and Landscape Ecology*. 43-68. Hanski, I y Gilpin M, eds. *Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution*. Academic Press, San Diego, CA.
354. Whipple, S. 2011. *Dung beetle ecology: Habitat and food preference, hypoxia tolerance, and genetic variation*. The University of Nebraska-Lincoln.

355. Whipple, S., Lindroth, E., Hoback, W., Albrecht, M y Foster, J. 2012. Genetic Variability of *Digitonthophagus gazella* (F.) (Coleoptera: Scarabaeidae) from Vieques, Puerto Rico and South Africa. *The Coleopterists Bulletin*,66(1):45-50.
356. Whitlock, M. y Mccauley, D. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1 / (4Nm)$. *Heredity*,82(2):117-125.
357. Whitlock, M. 2004. *Metapopulations Genetics: Selection and drift in populations*.153-173.Hanski., I y Gaggioti., O. 2004. *Ecology, genetics and evolution of metapopulations*. Academic Press, San Diego.
358. Willing, E., Dreyer, C. y Van Oosterhout, C. 2012. Estimates of genetic differentiation measured by F_{ST} do not necessarily require large sample sizes when using many SNP markers. *PloS ONE* 7, e42649
359. Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*,28(2):114-138.
360. Wright, S. 1949. The genetical structure of Populations. *Annals of Eugenics*,01/01; 2019/11,15(1):323-354.
361. Wright, S. 1951. Genetical structure of populations. *Nature*,166:47-249.
362. Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19(3): 395-420.
363. Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4: Variability Within and Among Natural Populations* the University of Chicago Press, Chicago.590 p.
364. Yadav, S, Singh, J., Padmanaban, B.y Kumar, L.2017. Genetic variability in Indian populations of banana corm weevil *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae) assessed by RAPDs and AFLPs. *International Journal of Tropical Insect Science* 37(3):149-162.
365. Zahavi, A. 1975. Mate selection—a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*,53(1):205-214.

13. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de cobertura promedio por muestra

Nombre muestra	de	Cobertura promedio muestra	Desviación de estándar	Número de lecturas usadas	Localidad
A81		28,8024	40,568	4585125	SFFC.Bolívar
A82		27,5084	37,7417	4365133	SFFC.Bolívar
A27		26,0457	34,4996	4029019	EBPC.Sucre
A85		22,758	29,4942	3799874	SFFC.Bolívar
A89		19,1799	23,1033	2472976	SFFC.Bolívar
A21		18,061	22,0729	3185738	EBPC.Sucre
A20		17,9065	21,4213	1723400	RCM. Atlántico
A12		17,6112	22,1266	1893828	RCM. Atlántico
A19		17,4828	19,6877	1819275	RCM. Atlántico
A11		17,1792	19,7318	1582912	RCM. Atlántico
A29		16,0384	21,9241	1310486	EBPC.Sucre
A15		15,7852	17,5444	1518012	RCM. Atlántico
A24		15,7069	18,0213	1726949	EBPC.Sucre
A88		14,113	14,2792	1079256	SFFC.Bolívar
A83		13,8703	14,9007	1336966	SFFC.Bolívar
A84		13,057	14,6544	1581948	SFFC.Bolívar
A23		11,9783	13,6032	249811	EBPC.Sucre
A22		11,8698	11,9675	1007027	EBPC.Sucre
A14		11,1468	11,2201	774977	RCM. Atlántico
A87		10,9535	12,0429	1055503	SFFC.Bolívar
A97		10,5742	9,25787	129826	SFFC.Bolívar
A90		9,64549	8,07237	376200	SFFC.Bolívar
A18		9,17408	7,48823	540466	RCM. Atlántico
A13		9,12156	7,6542	63508	RCM. Atlántico

A91	7,29796	6,44302	187798	EBPC.Sucre
A95	6,67083	7,72336	98315	RCM. Atlántico
A26	6,6208	4,68334	22800	EBPC.Sucre
A94	6,57807	7,8189	66117	RCM. Atlántico
A28	6,1106	9,10723	39394	EBPC.Sucre
A92	5,96821	5,13912	18052	EBPC.Sucre

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN con el kit NucleoSpin Tissue 96

NucleoSpin® 96 Tissue – centrifuge processing

5 Protocols

5.1 NucleoSpin® 96 Tissue – centrifuge processing

- For hardware requirements, refer to section 2.3.
- For detailed information on each step, see page 16.
- For use of the NucleoSpin® 96 Tissue Core Kit (REF 740454.4), refer to section 2.4 regarding recommended accessories.

Before starting the preparation:

- Check if Buffer B5 and Proteinase K were prepared according to section 3.
- Set incubator or oven to 56 °C.
- Preheat Elution Buffer BE to 70 °C.

Protocol-at-a-glance

1 Prepare samples	2 x 0.5 cm mouse tail or up to 20 mg tissue, 10 ⁶ cultured cells, or bacteria
2 Lyse samples	180 µL T1 25 µL Proteinase K Mix 56 °C, ≥ 6 h
3 Adjust DNA binding conditions	200 µL BQ1 200 µL ethanol (96–100 %) Mix
4 Transfer lysates to NucleoSpin® Tissue Binding Plate	
5 Bind DNA to silica membrane of the NucleoSpin® Tissue Binding Plate	5,600 x g, 10 min

6	Wash silica membrane	500 µL BW
		5,600 x g, 2 min
		700 µL B5
		5,600 x g, 4 min
7	Dry silica membrane	70 °C, 10 min
8	Elute DNA	100 µL BE (70 °C)
		5,600 x g, 2 min

Optional: Repeat elution step once.

Detailed protocol

- For hardware requirements, refer to section 2.3.
- For use of the NucleoSpin® 96 Tissue Core Kit (REF 740454.4), refer to section 2.4 regarding recommended accessories.

Before starting the preparation:

- Check if Buffer B5 and Proteinase K were prepared according to section 3.
- Set incubator or oven to 56 °C.
- Preheat Elution Buffer BE to 70 °C.

1 Prepare samples

For each preparation, cut up to two 0.5 cm pieces (20 mg) of mouse tail into appropriate lysis tubes or plates. If preparing DNA from rat tails, one 0.5 cm piece is sufficient. Tissue samples should not exceed 20 mg, cultured cells and bacteria should not exceed 10⁶ cells.

2 Lyse samples

Prepare a Proteinase K working solution: For each sample, mix **25 µL Proteinase K** with **180 µL Buffer T1** and vortex. Transfer 200 µL of the resulting solution to each well of the Round-well Block containing the samples. Close the wells with Cap Strips. Mix by vigorous shaking for 10–15 s. Spin briefly (15 s; 1,500 x g) to collect any sample at the bottom of the wells.

The samples must be submerged in the solution. Never prepare the Proteinase K working solution more than 15 min before addition to the samples. Proteinase K tends to self digest on when incubated in Buffer T1 without substrate.

Incubate the Round-well Block containing the samples at **56 °C** for **at least 6 h** (for mammalian cells reduce incubation to 10 min, bacterial cells may require pre-lysis with, e.g., lysozyme) or overnight until the samples are completely lysed. For optimal lysis, mix occasionally during incubation. Place a weight on top of the Round-well Block in order to prevent the Cap Strips from popping off occasionally.

After lysis, set the incubator to 70 °C for the membrane drying step.

Centrifuge the Round-well Block (15 s; 1,500 x g) to collect any condensate from the Cap Strips. Remove Cap Strips.

Residual hair and/or bones in the lysate can be removed by centrifugation (2 min; 5,600–6,000 x g) and transfer of the supernatant to a new Round-well Block (not supplied with the kit).

3 Adjust DNA binding conditions

Add **200 µL Buffer BQ1** and **200 µL 96–100 % ethanol** to each sample. Again, take care not to moisten the rims of the individual wells while dispensing the buffer. Close the individual wells with new Cap Strips (supplied). Mix by vigorous shaking for 10–15 s. Spin briefly (10 s; 1,500 x g) to collect any sample from the Cap Strips.

Ethanol and Buffer BQ1 can be premixed before addition to the samples, if the mixture is to be used during the next 3 months. Never centrifuge at higher g-forces or for longer periods as DNA will precipitate.

Place a NucleoSpin® Tissue Binding Plate on a MN Square-well Block.

If using more than one plate, label the plates for later identification. The use of a second plate placed on a MN Square-well Block avoids the need to balance the centrifuge.

4 Transfer lysates

Remove the first Cap Strip and transfer the lysates resulting from step 2 carefully from the Round-well Block into the wells of the NucleoSpin® Tissue Binding Plate. Continue with the next eight samples. Do not moisten the rims of the individual wells while dispensing the samples – moistened rims may cause cross contamination during centrifugation. After transfer, seal the openings of the plate with Self-adhering PE Foil.

For transfer of the lysate from the Round-well Block to the NucleoSpin® Tissue Binding Plate, we recommend use of an electronic eight-channel pipetting device with extra long tips capable of holding more than 850 µL.

5 Bind DNA to silica membrane

Place the MN Square-well Blocks with NucleoSpin® Tissue Binding Plates onto the centrifuge carriers and insert them into the rotor buckets. Centrifuge at **5,600–6,000 x g** for **10 min**.

Typically, the lysates will have passed through the silica membrane within a few minutes. The centrifugation process can be extended to 20 min, if the lysates have not passed completely.

6 Wash silica membrane

1st wash

Remove the Self-adhering PE Foil and add **500 µL Buffer BW** to each well of the NucleoSpin® Tissue Binding Plate. Seal the plate with a new Self-adhering PE Foil and centrifuge again at **5,600–6,000 x g** for **2 min**.

2nd wash

Remove the Self-adhering PE Foil and add **700 µL Buffer B5** to each well of the NucleoSpin® Tissue Binding Plate. Re-use the Self-adhering PE Foil to seal the plate and centrifuge again at **5,600–6,000 x g** for **4 min**.

During this step, as much ethanolic Buffer B5 as possible is removed by centrifugation.

7 Dry silica membrane

Remove the Self-adhering PE Foil and place the NucleoSpin® Tissue Binding Plate on an opened Rack of Tube Strips. Place it in an incubator for **10 min** at **70 °C** to evaporate residual ethanol.

Removal of ethanol by evaporation at 70 °C is more effective than prolonged centrifugation.

Note: The ethanol in Buffer B5 may inhibit enzymatic reactions and should be removed completely before eluting DNA.

8 Elute DNA

Dispense **100 µL preheated Buffer BE (70 °C)** to each well of the NucleoSpin® Tissue Binding Plate. Dispense the buffer directly onto the membrane. Incubate at room temperature for **1 min**. Centrifuge at **5,600–6,000 x g** for **2 min**. Repeat elution step once. Remove the NucleoSpin® Tissue Binding Plate from the Rack of Tube Strips by lifting the plate at one side carefully as the Tube Strips may stick to the outlets of the NucleoSpin® Tissue Binding Plate. For alternative elution procedures see section 2.3.

If elution in small volume tubes is desired, place a 96 PCR plate (not supplied) on top of a Round-well Block or a Rack of Tube Strips and elute into the PCR plate.

Anexo 3. Tabla de lecturas obtenidas por muestra obtenidas de *Stacks*

Muestra	Número de lecturas retenidas	Lecturas de baja calidad	Total de lecturas
A81-1B_ATTGCC.FQ.GZ	6287590	111381	6398971
A82-1B_ACTCCGC.FQ.GZ	5989168	116024	6105192
A27-1A_ATCCGC.FQ.GZ	5511455	83852	5595307
A85-1A_GATC.FQ.GZ	5594569	95091	5689660
A89-1A_TTAGGTGC.FQ.GZ	3713560	83068	3796628
A21-1B_ACATT.FQ.GZ	4689744	100387	4790131
A20-1B_AGAGC.FQ.GZ	2427907	50307	2478214
A12-1B_CGGATGGC.FQ.GZ	2755395	74644	2830039
A19-1B_CCTA.FQ.GZ	2703095	69387	2772482
A11-1B_GCGATGC.FQ.GZ	2175011	48210	2223221
A29-1A_CATTCGC.FQ.GZ	1838444	48752	1887196
A15-1A_ACATT.FQ.GZ	2310837	44139	2354976
A24-1B_GCTCACGC.FQ.GZ	2577544	54790	2632334
A88-1A_CTAGGTC.FQ.GZ	1578559	34791	1613350
A83-1B_CATCTGGC.FQ.GZ	2098793	68805	2167598
A84-1B_TTCACCGC.FQ.GZ	2516418	71638	2588056
A23-1B_AGCCTCC.FQ.GZ	470069	25622	495691
A22-1B_GACCTT.FQ.GZ	1639963	52511	1692474
A14-1A_AGAGC.FQ.GZ	1208176	23971	1232147
A87-1A_CAGTGT.FQ.GZ	1809599	60571	1870170
A97-1C_CTGT.FQ.GZ	268657	11551	280208
A90-1A_AGAGGTTC.FQ.GZ	648689	19874	668563
A18-1A_GCTCACGC.FQ.GZ	977031	25465	1002496
A13-1A_CCTA.FQ.GZ	185928	5519	191447
A91-1B_GATC.FQ.GZ	365464	9878	375342
A95-1B_TTAGGTGC.FQ.GZ	238041	10175	248216
A26-1A_CGCGT.FQ.GZ	77756	3215	80971
A94-1B_CTAGGTC.FQ.GZ	160919	5541	166460
A28-1A_ACTTGC.FQ.GZ	140279	4449	144728
A92-1B_GATGT.FQ.GZ	81344	3579	84923