

EFECTO DEL SISTEMA DE APAREAMIENTO SOBRE LA GENÉTICA DE POBLACIONES EN *ROSSOMYRMEX MINUCHAE* (HYMENOPTERA, FORMICIDAE), HORMIGA ESCLAVISTA ENDÉMICA DE SIERRA NEVADA, GÁDOR Y FILABRES (ANDALUCÍA, ESPAÑA)

OLIVIA SANLLORENTE, FRANCISCA RUANO Y ALBERTO TINAUT

RESUMEN

En este artículo se resumen los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto 78/2003. Su interés estriba en el hecho de que *Rossomyrmex minuchae* es una especie con una distribución parcheada y con poblaciones muy escasas, a lo que se une un comportamiento reproductor marcadamente polígamo por parte de los machos y monándrico por parte de las hembras, lo que hacía sospechar la posibilidad de una situación crítica de las poblaciones causada por una elevada endogamia y por tanto baja diversidad genética. Los resultados nos muestran unas poblaciones en equilibrio, con una relativa baja diversidad genética, pero sin evidencias de endogamia ni efecto cuello de botella, como consecuencia, deducimos, de una reducción poblacional por causas naturales.

Palabras clave: *Rossomyrmex minuchae*, *Proformica longiseta*, esclavismo, genética poblacional, conservación.

SUMMARY

In this article we summarize the results of the Project 78/2003. *Rossomyrmex minuchae* is an interesting species to study given its patchy distribution and the scarcity of its populations. Moreover, males are extremely polygamous whereas females are monoandrous. This different behavior led us to consider the possibility of a critical situation of the populations caused by a high inbreeding and thus a low genetic diversity. Our results show that the populations are balanced, with a relatively low genetic diversity but without evidences for inbreeding or bottlenecks, which we conclude, as a consequence of a natural process of population reduction.

Key words: *Rossomyrmex minuchae*, *Proformica longiseta*, slavery, population genetics, conservation.

INTRODUCCIÓN

Rossomyrmex minuchae Tinaut, 1981 (Hymenoptera: Formicidae) es una hormiga esclavista endémica de las altas cumbres del sureste peninsular, conociéndose, en el momento de ini-

cio del proyecto, exclusivamente en Sierra Nevada. Incluida en la categoría de especie vulnerable de la UICN. La especie hospedadora o esclava es *Proformica longiseta* Collinwood, 1978, también endémica del sureste español, si bien sus poblaciones son más abundantes y su rango

de distribución altitudinal mayor (se encuentra entre los 1.800 y los 2.700 m). *R. minuchae* sólo aparece en las partes más inferiores de esta distribución, lo cual es más notable en Sierra Nevada, donde no supera los 2.200 m. Ambas especies aparecen asociadas a ambientes áridos montañosos, en el piso altitudinal correspondiente al xérico-frígido (TINAUT y FERNÁNDEZ 1993), localizándose los hormigueros tanto bajo piedra como directamente en el suelo, los cuales se evidencian por minúsculos agujeros al descubierto, muy difíciles de localizar. Por otro lado, el periodo de actividad de *Proformica* comienza en mayo y termina a finales de septiembre, mientras que en *Rossomyrmex* va desde junio hasta agosto.

El comportamiento esclavista de *Rossomyrmex minuchae* ha sido ampliamente estudiado (RUANO 2000) y, brevemente, su ciclo biológico podríamos iniciarlo cuando una nueva reina, fertilizada, busca un hormiguero no parasitado de *Proformica*, en el que entra repeliendo cualquier ataque de las obreras esclavas, aparentemente con las secreciones de la glándula de Dufour (RUANO *et al.* 2005). Entra y mata a las reinas hospedadoras, quedando todas las obreras a su servicio. La nueva reina pone sus huevos que serán cuidados y alimentados por las obreras esclavas y cuando emergen las obreras de *Rossomyrmex*, éstas no desempeñan ningún papel de obrera típica (no buscan comida, ni cuidan de sus hermanas, ni defienden el hormiguero) limitándose a llevar a cabo asaltos a otros hormigueros de *Proformica* para reponer las esclavas que van muriendo. Los asaltos comienzan cuando una obrera encuentra un nuevo hormiguero de la especie hospedadora, en ese momento regresa al nido original y transporta a una congénere hasta el hormiguero a asaltar con lo que aprende la localización y así sucesivamente cada obrera transporta a otra y la lleva al futuro objetivo hasta que se alcanza un número crítico de obreras (entre 60 y 90) momento en el que se rompe la cadena de reclutamiento y, rápidamente, comienza la invasión del nido. Normalmente no es hasta el día siguiente cuando las asaltantes salen con su botín, incluyendo, larvas, algunas obreras vivas y restos de obreras, entre ellos los gastos de las obreras mayor de *Proformica* (RUANO y TINAUT 1999).

El número de asaltos realizado cada año es escaso, con una media de 2,2, lo cual podría deberse al gran expolio que durante unos 3 días lleva a cabo *Rossomyrmex*, con un número aproximado de 200 presas frente a otras hormigas parásitas, cuyo asalto sólo dura unos 5-10 minutos en los que roban todo lo que pueden en ese tiempo y se van dejando el resto del hormiguero intacto (RUANO 2000).

La densidad de hormigueros de *Rossomyrmex* es muy baja, con una media de 0,002 nidos por m², además su biología reproductora limita su expansión dado que un mismo hormiguero no produce sexuados cada año, las hembras aparentemente copulan con un solo macho y además, un mismo macho puede aparearse con varias reinas (RUANO y TINAUT 2005), circunstancias que hacen pensar que la especie presente una baja variabilidad genética y que junto al escaso número de hormigueros, estuviese en situación de depresión endogámica y posible extinción.

Por último, *Rossomyrmex minuchae* es una especie de gran interés no sólo por su escasez y por ser esclavista, sino porque además presenta una distribución disyunta con la otra especie conocida al comienzo del proyecto: *Rossomyrmex proformicarum* Arnoldi 1928, de las llanuras al norte del Caspio y sureste de Kazajstán (MARIKOVSKY 1974). De esta especie apenas se conoce algo aparte de su descripción morfológica y aspectos biológicos básicos. Además, según SCHULZ y SANETRA (2002), *R. minuchae* se encontraría también en Turquía; dato que nos resultó muy llamativo dada la distancia entre esta población y la ibérica.

Por tanto, los principales objetivos de este proyecto fueron:

1. Determinar el área real de distribución de las poblaciones ibéricas mediante prospecciones en zonas potencialmente habitables por esta especie, por similitud de hábitat y teniendo en cuenta la presencia o no de la especie hospedadora. Así mismo, aclarar si *R. minuchae* está presente en Turquía, perdiendo entonces su carácter endémico.

2. Conocer la genética poblacional de las poblaciones encontradas de la hormiga esclavista *Rossomyrmex minuchae*. Comparar la diversidad genética y la genética de poblaciones de ésta con la de las especies asiáticas, aparentemente con distribuciones amplias y continuas, para poder entender mejor la situación actual de las poblaciones españolas
3. Estudiar paralelamente la estructura genética de las especies hospedadoras del género *Proformica*, así como otros parámetros (hidrocarburos cuticulares) que nos permitan entender los mecanismos coevolutivos que hayan tenido lugar entre ellas.
4. Establecer la filogenia del género *Rossomyrmex*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio y trabajo de campo

Se realizaron numerosos muestreos para detectar la presencia de la especie ibérica en 22 localidades de Sierra Nevada, Sierra de Gádor, Sierra de Filabres, Sierra de Cazorla, Sierra de Baza, Sierra de la Almijara-Tejeda, Sierra de María y Sierra de la Sagra. También se anotó la presencia o no de la especie hospedadora, *P. longiseta* o de alguna otra del género. Además se ampliaron los muestreos a Turquía en Kayseri (Ziyaret tepesi Giçidi) localidad en la que se había citado a *R. minuchae* (SCHULZ y SANETRA 2002), así como en otra localidad (Belembağı beli) de características similares situada a 500 Km de la anterior, en las cercanías de Konya. En el caso de *R. proformicarum*, se realizó un muestreo en las localidades referenciadas por Marikovsky al sureste de Kazajstán, en las proximidades de Almaty.

De cada hormiguero detectado de *Rossomyrmex* se tomaron 5 obreras para análisis genéticos (conservadas en etanol absoluto) y sus coordenadas UTM. En el caso de la hospedadora, por cada población detectada se recolectaron 5 obreras de 10 hormigueros diferentes y se tomó una coordenada UTM promedio por cada población, dado que los hormigueros de *Proformica* apare-

cen frecuentemente muy cerca entre sí, saliéndose del rango de sensibilidad del GPS. De Sierra Nevada se tomaron muestras de machos de *R. minuchae* para comprobar la existencia y abundancia de machos diploides, indicadores de depresión endogámica en himenópteros haplodiploides (COOK & CROZIER 1995). Además se tomaron 5 obreras de cada especie y población para el análisis de los hidrocarburos cuticulares (HC).

Análisis genéticos

El ADN fue extraído con el kit Genepure (Gentra Systems) según las instrucciones del manual. Para el estudio genético poblacional se analizó ADN microsatélite utilizando primers de 3 especies relacionadas con las dos objeto de estudio: *Cataglyphis cursor*, *Formica exsecta* y *Formica lugubris* (PEARCY *et al* 2004; CHAPUISAT 1996; GYLLENSTRAND *et al* 2002), siendo finalmente útiles 11 loci para *Rossomyrmex* y 7 para *Proformica*. Los análisis de filogenia se realizaron secuenciando parte del gen citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) con primers diseñados para *F. exsecta*. El proceso de amplificación se llevó a cabo mediante PCR. Los productos resultantes fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y posteriormente genotipados en un secuenciador ABI3100 en la unidad de genómica de la Universidad de Córdoba. Para la secuenciación mitocondrial, se purificaron las secuencias con kits comerciales (QIAquick y Accu-Prep) y se secuenciaron en el servicio de secuenciación del Departamento de Genética (Universidad de Granada).

Los genotipos de los microsatélites se comprobaron con los programas Genemapper v 3.5 y GeneScan v 3.7. Con estos datos y el programa FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET 2002) se calcularon los siguientes parámetros poblacionales: desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg, frecuencia alélica, riqueza de alelos (A), diversidad genética o heterocigosis esperada (H_S), diferenciación entre poblaciones dentro de especie (F_{ST}), índice de endogamia (F_{IS}) y desequilibrio de ligamiento. Para evitar problemas de replicación debidos al parentesco entre obreras del mismo nido, se utilizó el programa RESAMPIND (com pers. Jerome

Goudet) que toma al azar un individuo por hormiguero para cada análisis; este proceso se realizó 1000 veces. La posibilidad de recientes cuellos de botella se analizó mediante el método gráfico (LUIKART *et al* 1998) basado en la abundancia de alelos de baja frecuencia.

Las secuencias del COI se visualizaron y corrigieron a mano con ClustalW y Chromas Lite v 2.01. Las diferencias entre secuencias y los análisis filogenéticos se realizaron con MEGA v 3.1., Mr. Bayes y PHYML.

Análisis de los hidrocarburos cuticulares

Cada ejemplar fue sumergido en 1 ml de pentano durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo los viales en los que se había realizado cada extracción se dejaban secar a temperatura ambiente para almacenarlas en el congelador a -20°C . Posteriormente se volvía a disolver en 1 ml de pentano. El contenido cuticular se identificó utilizando grupos de, al menos, 20 obreras por cada análisis combinando cromatografía de gases/espectrografía de gases (Turbomass system, Perkin-Elmer, Norwalk CT, USA, funcionando a 70eV) utilizando una columna capilar no-polar DB-5. Se utilizó un programa de temperaturas que fluctuaba entre 150°C (2 minutos de inicio) hasta 300°C ($5^{\circ}\text{C min}^{-1}$) con 10 minutos a temperatura final. La cuantificación fue llevada a cabo por medio de una cromatografía de gases utilizando el mismo equipo y programa de temperatura. Cuando fue posible, se utilizaron cinco individuos de cada colonia. Si los extractos individuales resultaban insuficientes, entonces se utilizó el extracto de dos o tres individuos. Debido a la gran cantidad de datos hemos utilizado la media del contenido cuticular para cada colonia. La identificación de las sustancias se realizó de acuerdo con los datos previos ya publicados para *R. minuchae* y sus hospedadores de Sierra Nevada (ERRARD *et al.* 2006) y se completó con un análisis más preciso para los picos menores. Se aplicó un análisis cluster para conocer la similitud en hidrocarburos cuticulares en las diferentes poblaciones de hospedador (esclavas), parásito y obreras potencialmente hospedadoras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Área de distribución de *Rossomyrmex*

En las sierras muestreadas del sureste peninsular (Figura 1) *P. longiseta*, la especie hospedadora, ha aparecido en Sierra Nevada, Sierra de Gádor, Sierra de Filabres y Sierra de Cazorla. *Rossomyrmex minuchae* por su parte ha sido hallada en las tres primeras, si bien no en todos los puntos de muestreo: en Sierra Nevada no se han encontrado nuevas poblaciones, en Gádor encontramos en 3 de 5 localidades y en Filabres en 1 de 3 (RUANO *et al.* 2007). Además, durante la realización de este proyecto, o con anterioridad, hemos muestreado otros enclaves del centro y norte de la península Ibérica en los que vive el género *Proformica*, no habiendo localizado a *Rossomyrmex* en ningún caso, lo que refuerza, de momento, lo restringido de la distribución de este género parásito.

Respecto a la población de Turquía, la especie encontrada no fue en ningún caso *R. minuchae* sino que el material recogido pertenece realmente a una nueva especie para el género: *R. anatolicus* (TINAUT 2007). La especie hospedadora es *P. korbi*.

Como resultado de la expedición realizada por nosotros a Kazajstán, comprobamos que la especie que allí habita no es *R. proformicarum* como se venía considerando (MARIKOVSKY 1974) sino que es una especie descrita para el noroeste de China: *R. quadratinodum* (XIA y ZHENG 1995) especie que había pasado desapercibida para nosotros por estar descrita en chino y en una revista de escasa distribución. El área en la que estuvimos prospectando y en donde encontramos a esta especie fue en la región del río Ili (proximidades al Charin Canyon), relativamente cercana a Xinjian, de donde se había descrito a esta especie. Ambas localidades (río Ili y Xinjian) son fronteras entre los dos países. Por ello no nos sorprendió su hallazgo en Kazajstán (TINAUT *et al.* 2008), pero sí que Marikovsky la confundiera con *R. proformicarum*, especie que, de momento, sigue restringida a las llanuras del Caspio. La especie hospedadora permanece aún sin identificar, por lo que la denominamos de momento como *Proformica sp.* (figura 2).

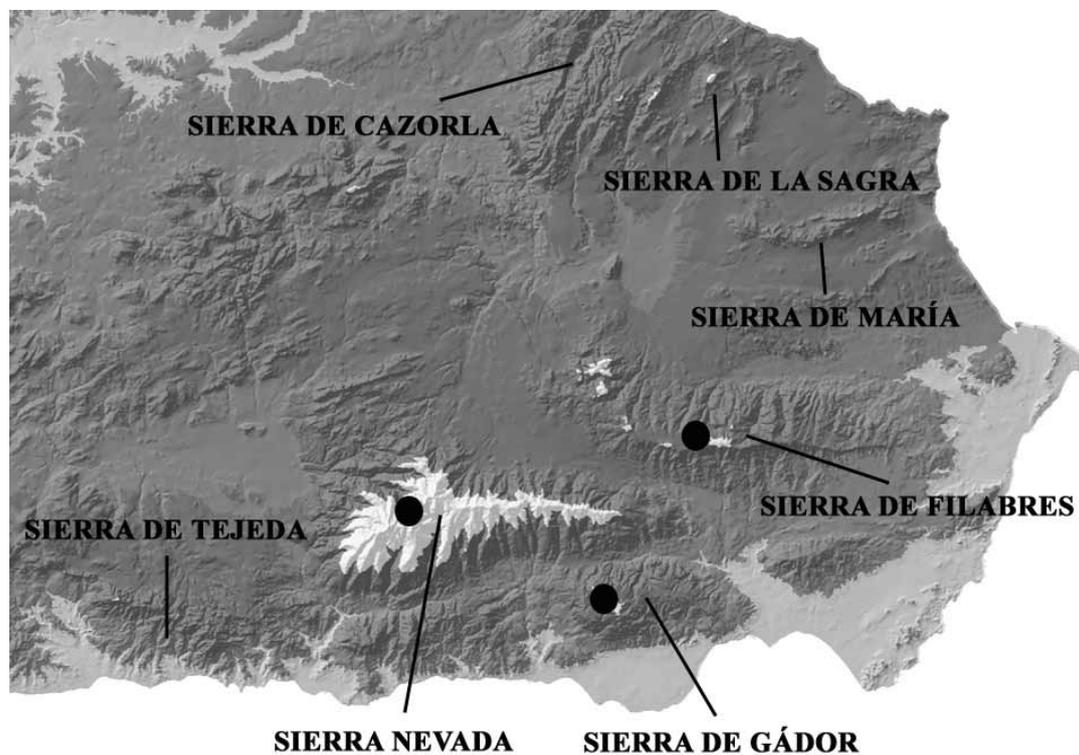


Figura 1. Sierras muestreadas. Los puntos señalan las localidades donde se ha encontrado la especie *Rossomyrmex minuchae*.
Figure 1. Sampled sierras. Dots show localities where the species *Rossomyrmex minuchae* was found.



Figura 2. Distribución del género *Rossomyrmex*.
Figure 2. Distribution of the genus *Rossomyrmex*.

Por tanto, *R. minuchae* mantiene su carácter endémico, si bien no es exclusiva para Sierra Nevada, sí lo es para la alta montaña del sureste peninsular. De nuestras prospecciones en el área general de distribución de este género, destacamos que hemos aclarado algunos errores que se iban arrastrando en la literatura como es el hecho de que el género *Rossomyrmex* pasa a contar con cuatro especies en lugar de dos como se pensaba y que *R. proformicarum* queda restringida a las llanuras al norte del Caspio, donde fue descrita, y no está presente en el sureste de Kazajistán como Marikovsky había supuesto (TINAUT *et al.* 2008).

Genética poblacional de *Rossomyrmex*

Las tres poblaciones de *R. minuchae* presentan en general un bajo número de alelos y diversidad genética. El índice de endogamia por otro lado no es significativamente distinto de cero, por lo que no parecen haber indicios genéticos de consanguinidad en dichas poblaciones (Tabla 1). Paralelamente, de los 31 machos muestreados, tan solo se encontró uno diploide, siendo por tanto un 3,2% del total, valor dentro de lo esperado en poblaciones normales. En esta misma línea, no encontramos evidencias de cuello de botella reciente en

Especie	Población	N	Obreras	A \pm SE	H _s \pm SE	F _{IS} \pm SE
<i>R. minuchae</i>	Gador	30	157	1,594 \pm 0,194	0,366 \pm 0,102	0,188 \pm 0,001
	Filabres	8	41	1,742 \pm 0,141	0,446 \pm 0,076	0,176 \pm 0,002
	Sierra Nevada	26	170	1,446 \pm 0,137	0,254 \pm 0,079	0,176 \pm 0,002
<i>R. anatolicus</i>	Belembaçi beli	4	32	2,337 \pm 0,316	0,499 \pm 0,303	0,069 \pm 0,229
	Ziyaret tepesi	3	27	3,040 \pm 0,298	0,684 \pm 0,276	0,089 \pm 0,202
<i>R. quadratinodum</i>	Charyn canyon	3	27	1.717 \pm 0,115	0,486 \pm 0,069	0,211 \pm 0,242

Tabla 1. Datos poblacionales de las especies de *Rossomyrmex* estudiadas: riqueza alélica (A), diversidad genética (H_s) y coeficiente de endogamia (F_{IS}). N indica el número de hormigueros y obreras el número total de individuos analizados.

Table 1. Population data of the studied species of *Rossomyrmex*: allelic richness (A), genetic diversity (H_s) and inbreeding coefficient (F_{IS}). N corresponds to the number of nests and workers to the total number of individuals analyzed.

ninguna de las tres poblaciones, ni desviación de H-W ni desequilibrio de ligamiento. Estos resultados apoyarían que los bajos niveles de diversidad estarían dentro de los niveles normales dado el pequeño tamaño poblacional que presenta la especie actualmente (TRONTTI *et al.* 2006; GOUIN *et al.* 2006), que las poblaciones estudiadas han debido ser pequeñas durante mucho tiempo, y que la reducción en el tamaño poblacional se haya producido de forma natural y progresiva (FRANKHAM *et al.* 2002).

Por otra parte, las tres poblaciones ibéricas presentan diferencias genéticas significativas ($\theta=0,605$; $P=0,001$). Este dato indicaría que dichas poblaciones permanecieron seguramente separadas al menos con anterioridad a la última glaciación, unos 20.000 años de antigüedad, al menos (QUEK *et al.* 2004).

Las especies asiáticas estudiadas, *R. anatolicus* y *R. quadratinodum*, presentan valores superiores

en número de alelos y diversidad genética, si bien sólo resultan significativamente mayores en la especie turca. Además, las dos poblaciones de Turquía pese a estar separadas alrededor de 500 Km no presentan diferenciación genética significativa ($\theta=0,233$; $P=0,068$), al contrario de lo que pasa en la especie ibérica para distancias 10 veces menores, lo cual apoya la idea de que se trate de una especie de amplia distribución en el primer caso y de poblaciones fragmentadas, sin flujo génico y de muy pequeño tamaño, en la realidad, en el segundo. De la especie kazaja no podemos concluir este dato al haber conseguido muestras de tan solo una población (Tabla 1).

Genética poblacional de *Proformica*

Proformica longiseta presenta valores de variabilidad genética esperados para una especie con su distribución y estructura colonial: hormigueros con varias reinas y formando nuevos hormigueros por gemación (a partir de una o unas pocas

reinas acompañadas por varias obreras) (FERNANDEZ-ESCUADERO *et al.* 2001). Dichos valores son superiores a los de la especie esclavista, más restringida por dichos parámetros vitales. Así mismo, *P. longiseta* presenta diferenciación entre las poblaciones muestreadas, si bien con un valor muy inferior al de la parásita, pero aun así de forma significativa ($\theta=0,185$; $P=0,002$). Lo curioso es que esta diferenciación genética se da a nivel nuclear (microsatélites) y mitocondrial y no según un patrón geográfico, de tal forma que hay poblaciones de una misma sierra más diferentes entre sí que dos poblaciones de distintas sierras. Este patrón podría explicarse como consecuencia de la gemación, dado que las hembras se dispersan andando para formar nuevas colonias y no volando como la mayoría de las hormigas, con lo que la distancia recorrida es potencialmente menor. La mayor similitud encontrada entre poblaciones de distintas montañas, que dentro de una misma, sería debida a la deriva génica, es decir, al azar gracias a la amplia distribución y variabilidad de la especie.

Proformica korbi, la hospedadora turca, posee valores similares a la ibérica para un número de alelos y diversidad, si bien las dos poblaciones analizadas no difieren genéticamente ($P=0,110$), al igual que ocurría con su parásita, a pesar de la gran distancia que las separa. Este dato sugeriría que su distribución es muy amplia y aparecería de forma bastante continua puesto que presenta las mismas características reproductivas que *P. longiseta* pero sin diferenciación poblacional.

En cuanto a *P. sp.*, los resultados son similares a los de *P. korbi* a pesar de tratarse de una especie monogínica (los hormigueros presentan una sola reina) (TINAUT *et al.*, in press), siendo pues esperables otros resultados. Sin embargo, esto puede no ocurrir debido a que el comportamiento de gemación permanecería a pesar de la monoginia, lo cual está documentado en *Cataglyphis cursor*, género cercano a *Proformica* (LENOIR *et al.* 1998).

Hidrocarburos cuticulares

El análisis de los HC se ha extendido a todas las poblaciones de las que hemos recogido material

de *Rossomyrmex* y su especie esclava (sur de la península Ibérica, Anatolia (Turquía) y llanuras del río Ili (Kazajstan)), pero de momento sólo se han analizado las poblaciones de la península Ibérica.

Se han identificado un total de 46 picos, incluyendo fundamentalmente mono, dimetil y trimetil-alkanos (C23 a C34). Los picos mayores resultaron completamente diferentes entre Sierra Nevada, Gádor y Filabres. En Sierra Nevada y Gádor estos tenían todos más de 28 carbonos mientras que en Filabres, se encontraron en las regiones C24/C27. Además, hemos encontrado una correlación positiva en las distancias químicas y genéticas entre poblaciones (test de Mantel, $r=0,52$; $P=0,01$). Sin embargo, no encontramos correlación entre estas variables dentro de poblaciones (tests de Mantel, todos $P > 0,05$).

Por tanto, las tres poblaciones de *R. minuchae* aparecen bien diferenciadas en el cluster (Figura 3) así como al calcular las distancias en los HC entre la especie esclavista y sus potenciales hospedadoras, apareciendo una población: Filabres, diferente de Gádor y Sierra Nevada. Esto puede indicar una interacción diferente entre hospedador y parásito, como respuesta a una coevolución en mosaico, debido a la separación geográfica de las poblaciones, como ya ha sido observado en otros casos o especies (ZAMORA-MUÑOZ *et al.* 2003; NASH *et al.* 2008; UGELVIG *et al.* 2008).

Filogenia

Los géneros *Rossomyrmex* y *Proformica* aparecen bien diferenciados uno de otro y mantienen congruencia específica dentro de clado salvo en las poblaciones de *P. longiseta* en Sierra Nevada que aparecen muy separadas de las otras dos sierras ibéricas. La posición del género *Cataglyphis*, si bien es cercano a los otros dos, permanece incierta. Según qué método de reconstrucción filogenético empleemos aparece entre *Rossomyrmex* y *Proformica* (Método de Máxima Parsimonia) o bien separado de ambos (quedando los anteriores más próximos entre sí, como en el caso de Neighbour-Joining) (Figura 4).

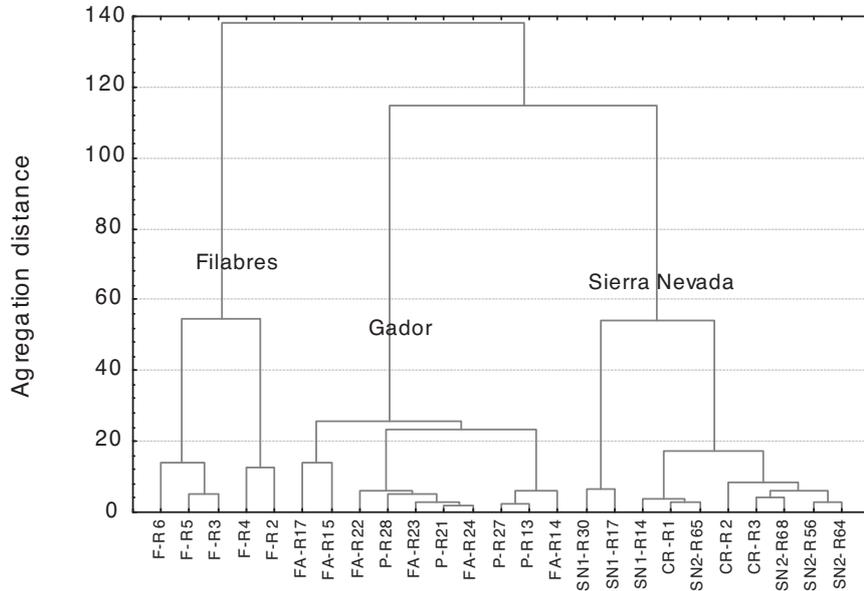


Figura 3. Análisis Cluster de los hidrocarburos cuticulares de las tres poblaciones aisladas de *R. minuchae* (Distancias Euclidianas y método de Ward).

Figure 3. Cuticular hydrocarbon cluster analysis of the three isolated populations of *R. minuchae* (Euclidean distances and Ward method).

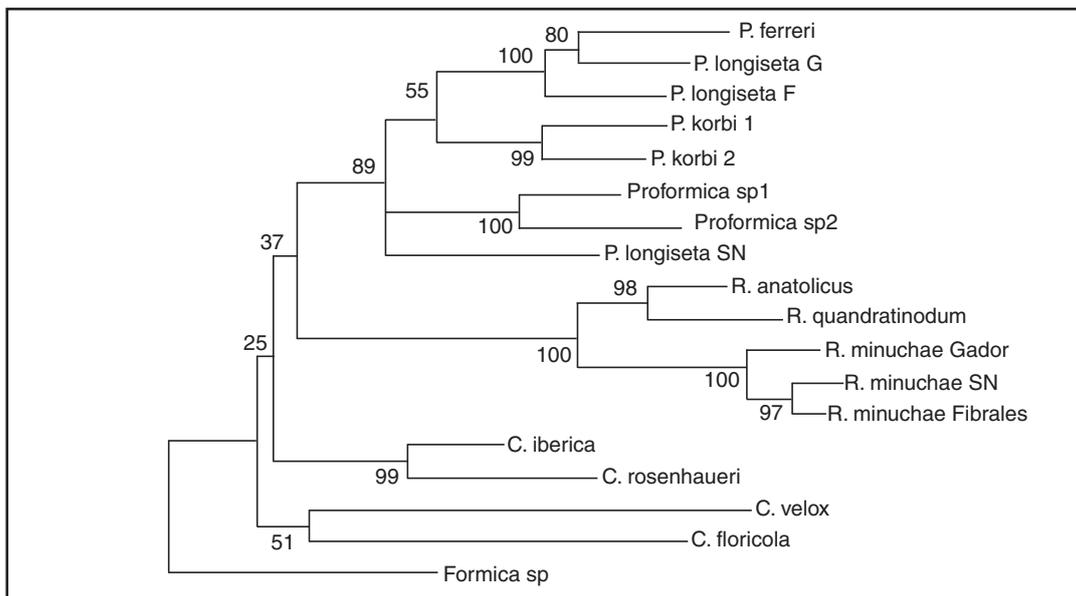


Figura 4. Árbol Neighbour-Joining incluyendo las especies de *Rossomyrmex* y *Proformica* estudiadas así como cuatro del género *Cataglyphis* y una de *Formica* como grupo externo. Las siglas SN, G y F significan Sierra Nevada, Gádor y Filabres respectivamente.

Figure 4. Neighbour-Joining tree including the studied species of *Rossomyrmex* and *Proformica* as well as four of the genus *Cataglyphis* and one of *Formica* as an outgroup. SN, G and F acronyms mean Sierra Nevada, Gádor and Filabres respectively.

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer a la dirección del Parque Nacional de Sierra Nevada por facilitarnos la labor de muestreo mediante los permisos oportunos. También a Alejandra Fernández Zambrano por su inestimable ayuda en el trabajo de campo y parte de laboratorio. Yelimbek Kaz nos ayudó en el campo en Kazajstán, mientras que el equipo de Fernando Mier del consulado de España en Kazajstán nos respaldó logísticamente. En Turquía nos acompañó Çelal Karaman en toda nuestra estancia. Para el análisis genético preliminar contamos con la colaboración del Dr.

Laurent Keller que puso a nuestra disposición su laboratorio de la Universidad de Lausanne (Suiza), así como al Dr. Rob Hammond por su colaboración en dichos análisis. Para el estudio de los hidrocarburos cuticulares contamos con el apoyo del Dr. Alain Lenoir y la Dra. Christine Errard (Universidad de Tours, Francia). Finalmente, por la parte económica, agradecemos al Ministerio de educación por la beca FPU a O.S., al plan propio de la Universidad de Granada y la Junta de Andalucía por sus ayudas en los distintos viajes al extranjero que tuvimos que realizar y al Ministerio de Medio Ambiente por el proyecto que actualmente presentamos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAPUISAT, M. 1996. Characterization of microsatellite loci in *Formica lugubris* and their variability in other ant species. *Molecular Ecology* 5: 599-560.
- COOK, J.M. & CROZIER, R.H. 1995. Sex determination and population biology in the Hymenoptera. *TREE* 10: 281-286.
- ERRARD, C., RUANO, F., RICHARD, F.J., LENOIR, A., TINAUT, A. & HEFETZ, A. 2006. Co-evolution-driven cuticular hydrocarbon variation between the slave-making ant *Rossomyrmex minuchae* and its host *Proformica longiseta* (Hymenoptera: Formicidae). *Chemoeology* 16: 235-240
- FERNÁNDEZ-ESCUADERO, I., SEPPA, P. & PAMILO, P. 2001. Dependent colony founding in the ant *Proformica longiseta*. *Insectes Sociaux* 48: 80-82.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J.D. & BRISCOE, D.A. 2002 *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- GOUDET, J. 2002. FSTAT, A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Version 2.9.3.2). Available from www.unil.ch/izea/software/fstat.html
- GOUIN, N., GRANDJEAN, F. & SOUTY-GROSSET, C. 2006. Population genetic structure of the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in France based on microsatellite variation: biogeographical inferences and conservation implications. *Freshwater Biology* 51: 1369-1387.
- GYLLENSTRAND, N., GERTSCH, P.J. & PAMILO, P. 2002. Polymorphic microsatellite DNA markers in the ant *Formica execta*. *Molecular Ecology Notes* 2: 67-69.
- LENOIR, A., QUÉRARD, L., PONDICQ, N. & BERTON, F. 1998. Reproduction and dispersal in the ant *Cataglyphis cursor* (Hymenoptera, Formicidae). *Psyche* 95: 21-44.
- LUIKART, G., ALLENDORF, F.W., CORNUET, J.M. & SHERWIN, W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89: 238-247.
- MARIKOVSKY, P.I. 1974 The biology of the ant *Rossomyrmex proformicarum* Arnoldi (1928). *Insectes Sociaux* 21: 301-308.
- NASH, D.R., ALS, T.D., MAILE, R., JONES, G.R. & BOOMSMA, J.J. 2008. A mosaic of chemical coevolution in a large blue butterfly. *Science* 319: 88-90.
- PEARCY, M., CLEMENCET, J., CHAMERON, S., ARON, S. & DOUMS, C. 2004. Characterization of nuclear DNA microsatellite markers in the ant *Cataglyphis cursor*. *Molecular Ecology Notes* 4: 642-644.
- QUEK, S.P., DAVIES, S.J., ITINO T. & PIERCE, N.E. 2004. Codiversification in an ant-plant mutualism: Stem texture and the evolution of host use in *Crematogaster* (Formicidae: Myrmicinae) inhabitants of *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Evolution* 58: 554-570.

- RUANO, F. & TINAUT, A. 1999. Raid process, activity pattern and influence of abiotic conditions in the slave-making ant *Rossomyrmex minuchae* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes sociaux* 46: 341-347.
- RUANO, F. 2000. Biología e implicaciones evolutivas en una hormiga esclavista, *Rossomyrmex minuchae* (Hymenoptera: Formicidae). PhD Thesis.
- RUANO, F. & TINAUT, A. 2005. Mating behaviour in a slave-making ant, *Rossomyrmex minuchae* (Hymenoptera, Formicidae). *Naturwissenschaften* 92 (7): 328-331.
- RUANO, F., HEFETZ, A., LENOIR, A., WITTKO, F. & TINAUT, A. 2005. Dufour's gland secretion as a repellent used during usurpation by the slave-maker ant *Rossomyrmex minuchae*. *Journal of Insect Physiology* 51: 1158-1164.
- RUANO, F., TINAUT, A., SANLLORENTE, O. & FERNÁNDEZ-ZAMBRANO, A. 2007. Nuevas localidades para *Rossomyrmex minuchae* Tinaut, 1981 (Hymenoptera, Formicidae). *Boletín Asociación Española de Entomología* 31(1-2): 209-212.
- SCHULZ, A. & SANETRA, M. 2002. Notes on the socially parasitic ants of Turkey and the synonymy of *Epimyrma*. *Entomofauna* 23: 157-172.
- TINAUT, A. & FERNÁNDEZ, I. 1993. El medio abiótico de *Proformica longiseta* Collingwood, 1978, una hormiga de la alta montaña mediterránea (Hymenoptera, Formicidae). *Zoologica Baetica* 4: 57-73.
- TINAUT, A. 2007. A new species of the genus *Rossomyrmex* from Turkey (Hymenoptera, Formicidae). *Graellsia* 63 (1): 135-142.
- TINAUT, A., RUANO, F., SANLLORENTE, O., ZAMBRANO, A. & Y. KAZ. 2008. *Rossomyrmex quadratinodum* Xia & Zheng, 1995 a new ant species for Kazakhstan (Hymenoptera, Formicidae). *Graellsia* 64 (2): 339-340.
- TINAUT, A., RUANO, F., SANLLORENTE, O., FERNANDEZ-ZAMBRANO, A., KARAMAN, C. & KAZ, Y. In press. Nest composition and relatedness in three slave-making ants of the genus *Rossomyrmex* Arnoldi and their *Proformica* Ruzsky hosts (Hymenoptera, Formicidae). *Insect Science*.
- TRONTTI, K., ARON, S. & SUNDSTRÖM, L. 2006. The genetic population structure of the ant *Plagiolepis xene*-implications for genetic vulnerability of obligate social parasites. *Conservation Genetics* 7: 241-250.
- UGELVIG, L., DRIJFHOUT, F., KRONAUER, D., BOOMSMA, J., PEDERSEN, J. & CREMER, S. 2008. The introduction history of invasive garden ants in Europe: Integrating genetic, chemical and behavioural approaches. *BMC Biology* 6, 11.
- XIA, Y. & ZHENG, Z. 1995. A new record genus and a new species of Formicidae (Hymenoptera) from China. *Entomotaxonomia* 17: 219-221.
- ZAMORA-MUÑOZ, C., RUANO, F., ERRARD, C., LENOIR, A., HEFETZ, A. AND TINAUT, A. 2003. Coevolution in the slave-parasite system *Proformica longiseta*-*Rossomyrmex minuchae* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 42: 299-317.