

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

**ESTUDIOS FILOGENÉTICOS Y FILOGEOGRÁFICOS EN GORGOJOS DE
IMPORTANCIA AGRONÓMICA.
(PHYLOGENETIC AND PHYLOGEOGRAPHIC STUDIES ON WEEVILS OF
AGRONOMIC IMPORTANCE.)**

**Tesis presentada para optar al el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas.**

María Amalia Scataglioni

Directores de tesis: Dra. Analía Alicia Lanteri y Dra. Viviana Andrea Confalonieri
Laboratorio de Genética, Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Bs. As., 2005.

ESTUDIOS FILOGENÉTICOS Y FILOGEOGRÁFICOS EN GORGOJOS DE IMPORTANCIA AGRONÓMICA.

RESUMEN

En este trabajo de tesis se presenta un estudio a nivel interespecífico y otro a nivel intraespecífico, en dos grupos de gorgojos perjudiciales para la agricultura en Argentina y América; analizando, en ambos casos, la variabilidad a nivel de secuencias de ADN mitocondrial desde una perspectiva filogenética.

En el primer caso, se realizó un estudio filogenético en el complejo de especies *Pantomorus–Naupactus*. Los resultados mostraron que las especies sudamericanas asignadas a *Pantomorus* constituyen un grupo polifilético basado en caracteres morfológicos convergentes, como la reducción de los hombros y alas metatorácicas. Otros géneros del complejo como *Aramigus*, *Asynonychus*, *Eurymetopus* y *Graphognathus* serían linajes monofiléticos que han acumulado una gran cantidad de autapomorfias, y se han diferenciado a partir del grupo parafiletico *Naupactus*.

En el segundo caso, se llevó a cabo un estudio filogeográfico, a nivel poblacional, en la especie *Anthonomus grandis*, conocida como “picudo del algodón”, a fin de establecer el origen de las poblaciones sudamericanas de la plaga. Se demostró que las muestras de picudos procedentes de áreas algodoneras de Argentina y Paraguay presentan baja o nula variabilidad de haplotipos mitocondriales. Por el contrario, las muestras del Parque Nacional Iguazú, una zona de vegetación nativa protegida, y de México, considerado país de origen de la especie, presentaron características típicas de poblaciones ancestrales, como alta variabilidad y diferenciación genética de haplotipos. Estos resultados, analizados a la luz de evidencias biogeográficas, permitieron proponer que la especie habría estado ampliamente distribuida en el continente Americano probablemente desde el Plio-Pleistoceno, y que su asociación con algunas especies de malváceas de los géneros *Gossypium* y *Cienfuegosia* sería probablemente muy antigua.

Palabras claves: Complejo *Pantomorus–Naupactus*, filogenia, *Anthonomus grandis*, filogeografía, ADNmitocondrial.

PHYLOGENETIC AND PHYLOGEOGRAPHIC STUDIES ON WEEVILS OF AGRONOMIC IMPORTANCE.

ABSTRACT

This research deals with inter- and intraspecific studies of two groups of weevils that have damaging effects on agriculture in Argentina and America, analyzing, in both cases, variability at the mitochondrial DNA level from a phylogenetic perspective.

At the interspecific level, a phylogenetic study was performed in the *Pantomorus–Naupactus* species complex. The results obtained showed that South American species assigned to *Pantomorus* formed a polyphyletic group based on homoplastic characters, such as the reduction of the elytral humeri and metathoracic wings. Other genera indigenous to South America, *Aramigus*, *Asynonychus*, *Eurymetopus* and *Graphognathus*, are also part of the complex and would represent derived monophyletic lineages of the paraphyletic *Naupactus*.

At the intraspecific level, a phylogeographic study was carried out in the cotton boll weevil *Anthonomus grandis*. The main goal was to establish the origin of South American populations. Samples from cotton fields of Paraguay and Argentina showed a single or very few haplotypes. On the contrary, samples from Iguazú National Park, a protected area of native vegetation, and Mexico, considered as the center of origin of the species, presented a very high genetic diversity, typical of ancestral populations. The phylogeographic analysis suggests that the boll weevil was probably a widespread species occurring throughout the Americas by the Plio-Pleistocene, having old host plant associations with Malvaceae of the genus *Gossypium* and *Cienfuegosia*.

Key words: *Pantomorus–Naupactus* complex, phylogeny, *Anthonomus grandis*, phylogeography, mitochondrial DNA.

ESTUDIOS FILOGENÉTICOS Y FILOGEOGRÁFICOS EN GORGOJOS DE IMPORTANCIA AGRONÓMICA.

ÍNDICE

	Página
CUADRO RESUMEN.....	6
CAPÍTULO I: Introducción	
1. LA SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA.....	8
1. Supuestos del análisis de parsimonia.....	10
2. Filogenias basadas en datos moleculares.....	11
1. Congruencia entre distintas fuentes de datos.....	11
3. Filogenias a nivel microevolutivo.....	14
1. El ADN mitocondrial como marcador filogenético en estudios intraespecíficos.....	14
2. La filogeografía.....	15
2. LA FAMILIA CURCULIONIDAE.....	17
1. Estudio filogenético en el complejo <i>Pantomorus-Naupactus</i>	18
2. Estudio filogeográfico en <i>Anthonomus grandis</i>	20
3. OBJETIVOS GENERALES.....	22
1. Referidos al complejo <i>Pantomorus-Naupactus</i>	22
2. Referidos a la especie <i>Anthonomus grandis</i>	22
CAPÍTULO II: Metodologías	
1. TÉCNICAS DE LABORATORIO.....	24
1. Obtención y preservación de los materiales de estudio.....	24
2. Extracción del ADN.....	25
3. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR y purificación.....	26
4. Secuenciación de los genes mitocondriales.....	28
2. ANÁLISIS DE DATOS.....	29
1. Edición, alineación y diferenciación las secuencias de ADN.....	29
2. Análisis de parsimonia.....	30
1. Construcción de matrices de datos.....	30
a. En el complejo <i>Pantomorus-Naupactus</i>	30
b. En <i>Anthonomus grandis</i>	30
2. Tratamiento de los caracteres.....	31
a. En el complejo <i>Pantomorus-Naupactus</i>	31
b. En <i>Anthonomus grandis</i>	33
3. Búsqueda de los árboles de longitud mínima.....	33
4. Cálculo de los parámetros del árbol.....	34
5. Medidas de soporte de ramas.....	35
6. Optimización de caracteres.....	36
3. Análisis de congruencia en el complejo <i>Pantomorus-Naupactus</i>	36
4. Análisis filogeográfico en <i>Anthonomus grandis</i>	38
1. El método filogeográfico y la teoría de la coalescencia.....	38
2. Pasos del análisis filogeográfico.....	40

CAPÍTULO III: Estudio filogenético en el complejo *Pantomorus-Naupactus*.

1. ANTECEDENTES	43
1. El problema sistemático	43
2. Evolución de caracteres adaptativos	46
3. Características biológicas y daños a los cultivos	48
2. HIPÓTESIS PUESTAS A PRUEBA	51
1. En el campo de la sistemática	51
2. En relación con la congruencia de caracteres	51
3. En relación con la evolución de caracteres supuestamente adaptativos	51
3. OBJETIVOS PARTICULARES	52
4. ESTRATEGIA Y MATERIALES DE ESTUDIO	53
5. RESULTADOS	56
1. Análisis de la diferenciación de las secuencias	56
2. Análisis de parsimonia	57
1. Datos moleculares.....	57
a. Análisis bajo pesos iguales.....	57
b. Análisis bajo pesos implicados.....	57
c. Análisis bajo costos de transformación diferenciales.....	59
2. Datos morfológicos.....	61
a. Análisis bajo pesos iguales.....	61
b. Análisis bajo pesos implicados.....	61
3. Datos combinados.....	63
a. Análisis bajo pesos iguales.....	63
b. Análisis bajo pesos implicados.....	64
c. Análisis bajo costos de transformación diferenciales.....	65
3. Análisis de congruencia entre los datos moleculares y morfológicos	67
1. Congruencia taxonómica.....	67
2. Congruencia de caracteres.....	68
6. DISCUSION	69
1. Distintos métodos de pesado	69
2. La hipótesis filogenética propuesta y su congruencia con la morfología	70
3. Evolución del modo de reproducción partenogenético en el grupo	77
7. CONCLUSIONES	80
8. APÉNDICE	82

CAPÍTULO IV: Estudio filogeográfico en el picudo del algodónero *Anthonomus grandis*

1. ANTECEDENTES	87
1. Datos biológicos y daños al cultivo del algodón	87
2. Diferenciación intraespecífica	91
3. Lugar de origen de la especie	92
4. La dispersión hacia el norte	93
5. Hipótesis sobre el origen de las poblaciones en América del Sur	96
1. Hipótesis de sucesivas introducciones debidas al comercio del algodón.....	96
2. Hipótesis de la dispersión natural desde México hasta América del Sur.....	97
2. HIPÓTESIS PUESTAS A PRUEBA	99
3. OBJETIVOS PARTICULARES	99
4. ESTRATEGIA Y MATERIALES DE ESTUDIO	99
5. RESULTADOS	101
1. Diferenciación en las secuencias de genes mitocondriales	101

1. En el gen de COI.....	101
2. En el gen de COII.....	102
2. Diversidad haplotídica.....	104
1. En el gen de COI.....	104
2. En el gen de COII.....	104
3. Análisis de parsimonia de los haplotipos.....	106
1. En el gen de COI.....	106
2. En el gen de COII.....	107
4. Optimización de caracteres, largo de ramas y tasas evolutivas.....	109
5. Análisis de los filogramas.....	111
6. DISCUSION.....	115
1. ¿Poblaciones ancestrales de picudo en América del Sur?.....	115
2. ¿Cómo y cuándo <i>Anthonomus grandis</i> alcanzó su distribución actual?.....	116
1. Los filogrupos más ancestrales: Iguazú y Tamaulipas.....	116
2. El filogrupo del haplotipo A.....	119
3. ¿Existen linajes de picudos exclusivamente ligados al algodón?.....	121
4. ¿Cuáles fueron los posibles hospederos en la expansión hacia América del Sur?...122	
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	128
 CAPÍTULO IV: Bibliografía	
1. LITERATURA CITADA.....	131
2. PUBLICACIONES DEL PRESENTE TRABAJO.....	143

INDICE DE FIGURAS

Página

Fig.1: Arbol de genes y árbol de especies.....	13
Fig.2: Esquema del gen COI, mostrando las regiones amplificadas en el presente estudio.....	27
Fig.3: Cladograma obtenido del análisis bajo pesos iguales de la matriz molecular.....	57
Fig.4: Consenso estricto obtenido del análisis bajo pesos implicados de la matriz molecular..	58
Fig.5: Cladograma obtenido del análisis de costos $tv/ts = o > 4/1$ de la matriz molecular.....	60
Fig.6: Consenso estricto obtenido del análisis bajo pesos iguales de la matriz morfológica....	61
Fig.7: Cladograma obtenido del análisis bajo pesos implicados de la matriz morfológica.....	62
Fig.8: Cladograma obtenido del análisis bajo pesos iguales de la matriz combinada.....	63
Fig.9: Consenso estricto obtenido del análisis bajo pesos implicados de la matriz combinada..	64
Fig.10: Cladograma obtenido del análisis de costos $tv/ts \geq 4/1$ de la matriz combinada.....	66
Fig.11: Congruencia taxonómica entre los resultados de datos morfológicos y de ADN.....	73
Fig.12: Caracteres de los genitales en el complejo <i>Pantomorus-Naupactus</i>	85
Fig.13: Láminas de la especie representativas de la diversidad dentro del complejo <i>P-N</i>	86
Fig.14: Ciclo de vida de <i>Anthonomus grandis</i>	90
Fig.15: Mapa de distribución de especies tetraploides de <i>Gossypium</i> en América Central.....	94
Fig.16: Mapa de la distribución de morfotipos de picudo y su dispersión en América.....	95
Fig.17: Arbol de N-J obtenido en el estudio de RAPD de Scataglini <i>et al</i> , 2000.....	98
Fig.18: Mapa de localidades del estudio filogeográfico con secuencias de ADN.....	100
Fig.19: Traducción a aminoácidos de las secuencias obtenidas para COI y COII.....	103
Fig.20: Cladograma consenso obtenido a partir de las secuencias del gen COI.....	106
Fig.21: Cladograma consenso obtenido a partir de las secuencias del gen COII.....	107
Fig.22: Cladogramas de COI y COII con caracteres optimizados sobre las ramas.....	109
Fig.23: Filograma obtenido para los haplotipos del gen de COI.....	112
Fig.24: Filograma obtenido para los haplotipos del gen de COII.....	113
Fig. 25: Mapa de distribución de las especies de <i>Cienfuegosia</i> sección <i>Paraguayana</i>	125
Fig. 26: Mapa de distribución de especies de <i>Cienfuegosia</i> sección <i>Friesia</i>	125
Fig 27: Mapa de distribución de las especies tetraploides de <i>Gossypium</i> en América.....	126

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Cuadro resumen.....	6
Tabla 2: Características del ADN mitocondrial.....	15
Tabla 3: Cebadores utilizados para amplificar y secuenciar los genes de COI y COII.....	27
Tabla 4: Composición de las soluciones de laboratorio de los protocolos experimentales.....	28
Tabla 5: Asignaciones genéricas y distribuciones geográficas en el complejo <i>P-N</i>	55
Tabla 6: Información taxonómica de los géneros que constituyen el complejo <i>P-N</i>	56
Tabla 7: Valores de “fit” del análisis de pesos implicados de la matriz molecular.....	58
Tabla 8: Resultados del análisis bajo distintos costos de tv/ts de la matriz molecular.....	59
Tabla 9: Valores de “fit” del análisis bajo pesos implicados de la matriz morfológica.....	62
Tabla 10: Valores de “fit” del análisis bajo pesos implicados de la matriz combinada.....	64
Tabla 11: Resultados del análisis bajo distintos costos de tv/ts de la matriz combinada.....	65
Tabla 12: Matriz de datos morfológica confeccionada por Lanteri.....	82
Tabla 13: Codificación de los caracteres morfológicos analizados por Lanteri.....	83
Tabla 14: Especies afines con <i>Anthonomus grandis</i> , distribución y plantas hospederas.....	93
Tabla 15: Distribución geográfica actual y hospederas de <i>Anthonomus grandis</i>	93
Tabla 16: Diferenciación genética obtenida en el estudio de RAPD de Scataglini <i>et al</i> 2000...	98
Tabla 17: Frecuencia y diversidad haplotídica de COI y COII en localidades muestradas.....	105

CUADRO RESUMEN

Estudio realizado	Objetivos	Hipótesis previas	Fuentes de datos	Datos adicionales	Análisis de datos
<p>Estudio Filogenético en el complejo <i>Pantomorus-Naupactus</i> (Entiminae: Naupactini)</p>	<p>-Estudiar las relaciones filogenéticas entre las especies del complejo.</p> <p>-Analizar la congruencia entre caracteres moleculares y morfológicos.</p> <p>-Analizar la evolución de la partenogénesis en el grupo.</p>	<p><i>Pantomorus</i> y <i>Naupactus</i> no serían grupos monofiléticos.</p> <p>(Basada sobre evidencia morfológica)</p>	<p>17 secuencias del gen COI de 999 pares de bases.</p> <p>1 individuo por especie</p> <p>OTU = especie</p>	<p>Matriz de datos morfológicos.</p>	<p>Análisis de parsimonia de datos de ADN y morfología (separados y combinados)</p> <p>-Bajo pesos iguales</p> <p>-Bajo pesos implicados</p> <p>-Bajo diferentes costos de tv/ts</p> <p>Análisis de congruencia de caracteres y taxonómica entre los dos conjuntos de datos.</p> <p>Análisis de la presencia de reproducción partenogenética sobre la hipótesis filogenética planteada.</p>
<p>Estudio Filogeográfico en <i>Anthonomus grandis</i> (Curculioninae: Anthonomini)</p>	<p>Establecer el origen y vías de dispersión del picudo en América del Sur.</p>	<p>Presencia de linajes ancestrales en América del Sur</p> <p>(Basada sobre estudios de RAPD)</p>	<p>61 sec. de COI de 279 pb.</p> <p>42 sec. de COII de 327 pb.</p> <p>9-6 individuos por población en 7 poblaciones</p> <p>OTU = haplotipo</p>	<p>Evidencias biogeográficas</p>	<p>Análisis de parsimonia de haplotipos bajo pesos iguales.</p> <p>Análisis de los filogramas, teniendo en cuenta la diferenciación, frecuencia y distribución geográfica de los haplotipos.</p>

CAPÍTULO I

Introducción

1. LA SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA.

Durante varias centurias los naturalistas han tratado de describir y explicar la diversidad del mundo biológico, lo cual constituye el principal objetivo de la Sistemática.

La formalización de un sistema jerárquico de nomenclatura por el naturalista sueco Linneo, estableció las bases científicas para describir y categorizar la diversidad biológica. Este sistema jerárquico fue inicialmente independiente de la teoría evolucionista y, de hecho, ciertos evolucionistas como Buffon, se opusieron al sistema linneano y al esencialismo aristotélico que implicaba. Sin embargo el sistema linneano prevaleció y posteriores evolucionistas como Lamarck, Darwin y Haeckel optaron por el mismo para producir sus clasificaciones (Swofford *et al*, 1996).

Los esfuerzos iniciales por reconstruir la historia filogenética durante la primera mitad del siglo XX, estuvieron basados en criterios poco objetivos y la estimación de la filogenia consistía en poco más que afirmaciones plausibles formuladas por expertos en determinados grupos taxonómicos.

A partir de la década del '50 comenzó una etapa de profundización de los principios de la clasificación biológica que dio lugar a una controversia entre tres escuelas: el evolucionismo, el feneticismo y el cladismo. Estas escuelas no diferían en su objetivo de proponer una clasificación que describiera las similitudes y diferencias en los caracteres de los organismos a clasificar, sino más bien en la metodología o la forma de relacionar estos caracteres con la clasificación (Goloboff, 1998a).

Los evolucionistas o sistemáticos tradicionales empleaban los conocimientos previos acumulados en el grupo en estudio. Daban peso relativo a los caracteres y clasificaban bajo un criterio arbitrario dependiente del investigador, y por lo tanto, altamente subjetivo.

Los feneticistas utilizan un método empírico para determinar los grupos. Sus algoritmos resumen las semejanzas de los organismos en medidas de distancia. Los organismos se agrupan por su similitud global, por lo tanto, un grupo determinado de esta forma puede no tener un carácter único que lo identifique como tal.

El cladismo también emplea un método empírico, desarrollado por el entomólogo alemán Willi Hennig, en el que los organismos se agrupan por similitud especial. Aquellos caracteres presentes en los miembros de un grupo y ausentes en grupos relacionados son los que Hennig (1966) llamó sinapomorfías, y mostró que sólo

agrupando por este tipo de caracteres se reconocen grupos cuyos miembros comparten un ancestro en común exclusivo, o grupos monofiléticos. Por lo tanto un grupo monofilético puede definirse por al menos algún carácter único, propio de todos sus miembros y de su ancestro, cuya diagnosis es lo más breve y simple posible, de acuerdo con el criterio de simplicidad o máxima parsimonia. En caso de existir conflicto entre los distintos caracteres para definir los grupos, debe recurrirse a hipótesis *ad hoc* de convergencias o reversiones denominadas homoplasias. El criterio de parsimonia lleva, entonces, a agrupar por sinapomorfias, produciendo grupos monofiléticos que minimizan la cantidad de homoplasias o hipótesis *ad hoc* y, de esta manera, maximiza la capacidad de reflejar similitudes y diferencias en la clasificación.

En este sentido, el que se refiere a eficiencia descriptiva, el método cladístico es el mejor en el modo de relacionar los caracteres con la clasificación (Goloboff, 1998a). Sin embargo no se debe olvidar que esta justificación yace en el uso más eficiente de la información disponible y no está presuponiendo que la evolución siga el curso más parsimonioso (Fitch, 1971; Goloboff, 1998a).

En una visión más filosófica de este último aspecto, Brower (2000) expone que éste es justamente el principio de la parsimonia: los eventos en el mundo real pueden no ocurrir parsimoniosamente, pero la parsimonia es el límite epistemológico que debería ser utilizado para su interpretación. La verdad, según Brower, excepto como una figura del lenguaje, no existe en la ciencia empírica. Los grupos filogenéticos que se reconocen son meras hipótesis, útiles porque proveen una suma máxima de información del patrón empírico soportado por las observaciones. Esta corroboración de hipótesis es lo más cercana a la realidad, de lo que la ciencia empírica puede llegar.

Dado que toda la investigación empírica está basada en observaciones, la ciencia necesariamente descansa en algunos fundamentos teóricos de conocimiento previo. Sin embargo, a fin de hacer las hipótesis científicas falsables, ellas deben descansar lo mínimo posible en teorías suplementarias (Brower, 2000). En este sentido, un número mínimo de supuestos es lo que permite al cladismo hacer sus hipótesis sistemáticas más falsables en relación con los demás métodos.

1.1 Supuestos del análisis de parsimonia.

Los únicos supuestos que requiere el método cladístico son:

-Clasificaciones biológicas jerárquicas: El hecho que las clasificaciones biológicas se ajusten a un patrón jerárquico parecía evidente incluso para los sistemáticos pre-darwinianos. Muchos investigadores se habían preguntado por qué la mejor forma de hacer una sistematización de las propiedades de los organismos vivos es mediante una clasificación jerárquica, pero fue Darwin quien convenció a la comunidad biológica de que la causa era la evolución. Los grados de parentesco expresados en la clasificación se correspondían con grados de parentesco genealógico y el parentesco genealógico se da naturalmente en forma jerárquica (Goloboff, 1998a).

-Independencia de los caracteres: Es un supuesto común a todos los métodos basados en análisis de caracteres. La no independencia de los caracteres que se definen implicaría tener que estimar las covarianzas de los mismos, lo cual haría los algoritmos muy complicados (Swofford *et al*, 1996).

-Homología de caracteres: Un carácter debe ser definido de manera tal que todos los estados observados para ese carácter sobre los taxa analizados, sean derivaciones con modificaciones del estado correspondiente en el ancestro común de dichos taxa. Las características similares entre organismos, que puedan considerarse como diferentes manifestaciones del mismo carácter, comparten una homología primaria (De Pinna, 1991), la cual no implica patrones jerárquicos de agrupamiento. El estado subsiguiente al de la homología primaria es la determinación de las diferencias en estados discretos, y se denomina “identidad de estado de carácter”. La “identidad de estado de carácter” no es un supuesto del método, como lo es la homología primaria, sino que constituye la hipótesis nula del análisis cladístico, la cual es puesta a prueba por la congruencia de caracteres.

1.2 Filogenias basadas en datos moleculares.

A partir de los años 70, el método cladístico fue refinado y desarrollado como un criterio explícito para inferir filogenias. Se implementaron en programas de computadoras algoritmos basados en el criterio de parsimonia (Farris, 1970, 1988; Platnick, 1989), los cuales fueron posteriormente modernizados (Swofford, 1985, 1998; Goloboff, 1996, 1997, 1998b, 1999) permitiendo analizar grandes y complejos conjuntos de datos.

Al mismo tiempo que los avances conceptuales y computacionales en los métodos filogenéticos se desarrollaban, otra revolución ocurría en el campo de la biología: el advenimiento de la biología molecular. Primero surgieron métodos para examinar la estructura molecular de las proteínas y, en los últimos años, técnicas para establecer las secuencias de los ácidos nucleicos, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al*, 1988). Estos métodos fueron rápidamente adoptados por los biólogos evolucionistas, y así, los datos disponibles para el análisis filogenético comenzaron a incrementarse exponencialmente, al menos para determinados taxa (Swofford *et al*, 1996).

Los datos de secuencias de ADN adquirieron una importancia fundamental y se convirtieron en una herramienta sumamente útil en los análisis filogenéticos realizados a cualquier nivel taxonómico. Esto se debe al hecho que determinados genes presentan diferentes tasas evolutivas, lo cual genera que sus secuencias puedan utilizarse en filogenias de distintos niveles taxonómicos: los genes que presentan una mayor diferenciación son usados como evidencia a nivel de taxa más cercanos, mientras que los más conservados se utilizan en análisis que involucran taxa superiores.

1.2.1 Congruencia entre distintas fuentes de datos.

La disponibilidad de esta nueva fuente de evidencia en las relaciones filogenéticas generó que se centrara la atención en una cuestión fundamental ¿las diferentes clases de datos deben ser analizadas de manera simultánea o separada en el análisis cladístico?

Existen diferentes posturas frente al problema de combinar o no los datos provenientes de distintas fuentes de caracteres. Una primera aproximación a este problema es el análisis de la “congruencia taxonómica” (Kluge, 1989) el cual propone analizar los distintos conjuntos de datos por separado y, basándose en la topología, resumir los resultados en árboles de consenso (Nelson, 1979; Rohlf, 1982).

Un enfoque diferente es el “análisis de la evidencia total” (Kluge, 1989), posteriormente denominado como “análisis simultáneo” por Nixon y Carpenter (1996). La idea es combinar todos los conjuntos de datos en una sola matriz y determinar el árbol más parsimonioso para todo el pool de caracteres.

Una postura intermedia sería la denominada “previo acuerdo” o “análisis combinado condicionado” por Chippindale y Weins (1994), el cual propone primero analizar los datos por separado, medir por algún método la cantidad de incongruencia entre los mismos, y abandonar el análisis combinado si los resultados son heterogéneos.

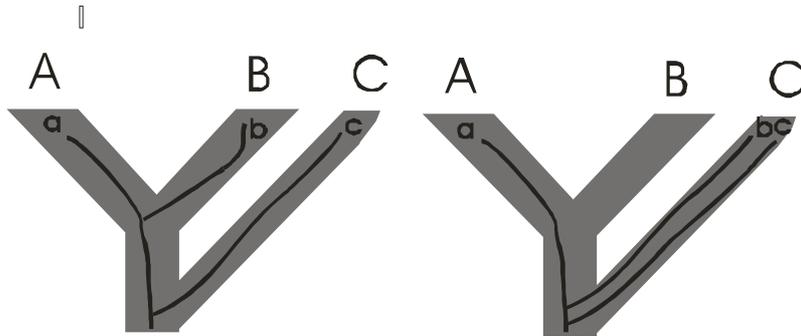
En este sentido, Nixon y Carpenter (1996) no condicionan el resultado del mismo a la aplicación del análisis simultáneo. Estos autores afirman que el “análisis simultáneo” provee un contexto para medir la incongruencia y es preferible a los otros dos métodos fundamentalmente porque produce las hipótesis mejor soportadas, maximizando la congruencia entre diferentes conjuntos de datos, lo cual significa que maximiza la aplicación del criterio de parsimonia. Además permite la emergencia de señales secundarias que pueden permanecer ocultas en los análisis particionados (Nixon & Carpenter, 1996). Sin embargo, dado que las técnicas de biología molecular han permitido grandes avances en el análisis de la diferenciación entre taxa muy cercanamente relacionados, en estos casos han surgido controversias relativas a la congruencia. Según de Queiroz (1993) en los análisis de especies muy emparentados o por debajo del nivel de especies, el análisis simultáneo puede no ser la mejor opción. Los árboles estimados por secuencias de ADN (árboles de genes) pueden diferir de los estimados por datos morfológicos (árboles de organismos) debido a las diferentes historias de ramificación y entonces el análisis simultáneo no sería adecuado, ya que el combinar los datos asume implícitamente que todos los conjuntos de datos son producto de la misma historia de ramificación (de Queiroz, 1993). Las diferencias en las historias de ramificación pueden ser causadas por:

- Diferentes vías de separación o “sorting” de linajes de polimorfismos ancestrales.
- Hibridación o transferencia horizontal entre taxa.

La hibridación o transferencia horizontal suele ser frecuente en muchos grupos de plantas; mientras que el “sorting” de linajes es un problema muy común en taxa cercanamente relacionados. Debido al “sorting” de linajes se producen diferentes topologías entre árboles de genes y árboles de organismos, ya que las ramas internas son suficientemente cortas para evidenciar discordancias (de Queiroz, 1993). Esto significa

que el nodo de bifurcación de los linajes del árbol de genes puede anteceder al nodo de especiación del árbol de organismos (Avise, 2000). Ver figura 1.

Fig. 1. Árbol de genes (minúscula) y árbol de especies (mayúscula). En el primer caso coinciden, en el segundo caso el nodo de bifurcación del linaje b antecede al nodo de especiación entre A y B.



El “sorting” de linajes, además, es influido decisivamente por variables demográficas como el número poblacional, las tasas de extinción y el grado de flujo génico (Avise, 2000). Por lo tanto, para describir adecuadamente las filogenias de organismos o de especies muy cercanas, deben realizarse distintos árboles de genes correspondientes a genes no ligados. En estos casos, la manera de reamalgamar los diferentes árboles de genes en una filogenia compuesta que refleje las verdaderas relaciones entre los organismos, sería a través de la “congruencia taxonómica” (Kluge, 1989), es decir mediante construcción de árboles consenso. Los desacuerdos topológicos resultantes no significan que determinados árboles sean incorrectos, sino que ciertas discordancias reflejan que genes no ligados en organismos de reproducción sexual han atravesado distintas vías de transmisión. La filogenia del grupo estaría representada, entonces, como la tendencia central de la distribución de todas las historias de ramificación (de Queiroz, 1993; Avise, 2000).

Por lo expuesto en este punto, en este trabajo se combinarán los diferentes conjuntos de datos correspondientes al estudio interespecífico, pero se analizarán de manera independiente los correspondientes al estudio intraespecífico.

1.3 Filogenias a nivel microevolutivo.

Los avances de la biología molecular en el análisis de la diferenciación entre taxa cercanamente emparentados, junto con los avances conceptuales y operacionales en la estimación de la filogenia, han permitido la aplicación de algoritmos de parsimonia a nivel microevolutivo; generando así la posibilidad de que el análisis filogenético no esté limitado a aplicaciones en la clasificación biológica (Felsenstein, 1988).

La sistemática molecular ha actuado como puente entre el estudio de la diferenciación interespecífica, tradicionalmente asociado con la filogenia, y de la diferenciación intraespecífica, campo tradicional de la genética de poblaciones. La inicial y aún más importante estructura de ese puente es el análisis del ADN mitocondrial, el cual posibilita el uso de genealogía alélicas en ambos niveles (Avice *et al*, 1987; Hey, 1994).

Otros métodos de uso frecuente en el análisis de diferenciación intraespecífica, como los RAPDs (Amplificación al azar de polimorfismos del ADN) (Williams *et al*, 1990) no permiten este tipo de abordaje porque la homología de los alelos detectados entre especies es cuestionable y fundamentalmente porque no revelan genealogías alélicas. Por lo tanto, si bien esta técnica puede ser utilizada para estimar la diferenciación a nivel intraespecífico, no hace posible sacar ventajas de la interacción entre la genética molecular de poblaciones y la filogenia, pues no permite hacer inferencias genealógicas a partir de sus resultados (Avice, 1994).

1.3.1 El ADN mitocondrial como marcador filogenético en estudios intraespecíficos.

La molécula de ADN mitocondrial posee propiedades especiales que posibilitan su uso como marcador de genealogías alélicas tanto a nivel macro como microevolutivo.

El ADNmt de los animales es una molécula circular, que carece de histonas asociadas. Esta última característica sería uno de los factores que favorecen su alta tasa de mutación y justifican su empleo a escala microevolutiva; a diferencia de los genes nucleares que presentan una tasa evolutiva más lenta, lo cual hace improbable la detección de diferenciación a niveles intraespecíficos (Crandall & Templeton, 1996).

En la mayoría de los animales, el ADNmt se hereda por vía materna pues todas las mitocondrias las aporta la gameta femenina. Esto genera falta de recombinación intermolecular y en consecuencia pueden establecerse genealogías alélicas.

Las células somáticas típicas poseen cientos a miles de mitocondrias, cada una con varias copias de ADN, sin embargo, existe en general un haplotipo mitocondrial preponderante por cada individuo. Esta característica denominada homoplasmia, se debe probablemente a que dentro de cada población intracelular de ADNmt las mutaciones se fijarían rápidamente por un proceso análogo a la deriva génica.

Las propiedades especiales del ADN mitocondrial se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 2: Características del ADN mitocondrial.

Característica	Consecuencia	Implicancias
Herencia materna	No hay recombinación genética intermolecular	Permite el establecimiento de genealogías génicas .
Alta tasa de mutación	Rápida evolución a nivel de secuencias	Permite la detección de diferenciación tanto a nivel específico como interespecífico.
Homoplasmia	La mayoría de los individuos presenta una molécula de ADNmt prevalerte	Permite la utilización de los individuos como unidades taxonómicas.

Estas propiedades, que posibilitan que el ADN mitocondrial sea tratado como un marcador filogenético a nivel intraespecífico en el análisis de genealogías alélicas donde las unidades de estudio pueden ser los individuos, promovieron la emergencia de perspectivas no ortodoxas en microevolución tales como la filogeografía (Avise *et al*, 1987).

1.3.2 La filogeografía.

La filogeografía se define como el análisis espacial o geográfico de los linajes génicos (Avise *et al.*, 1987, Avise, 2000). Esta disciplina aplica por primera vez el análisis de genealogías génicas “ordenadas” a niveles intraespecífico o de especies muy cercanamente emparentadas, y a partir de sus resultados es posible sacar conclusiones con respecto a las secuencias de colonización, diversificación y extinción de los linajes génicos, en determinadas áreas.

Las muchas conexiones entre filogenia y genealogía de genes y la aplicación de ambos aspectos a nivel intraespecífico o poblacional han hecho de la filogeografía un interesante punto de contacto entre los campos macro y microevolutivo. De esta forma,

dos campos de estudio tradicionalmente separados tanto en sus enfoques teóricos como metodológicos, como son la genética de poblaciones y la sistemática, han encontrado puntos de coincidencia en el enfoque filogeográfico (Avice *et al.*, 1987).

Dado que enfatiza los aspectos históricos de la actual distribución de los linajes génicos, la filogeografía puede considerarse como una subdisciplina de la biogeografía histórica, que integra conceptos y técnicas de genética molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática filogenética, etología y paleontología (Avice, 1994, 2000). Además, el estudio comparado de los patrones filogeográficos de varias especies codistribuidas, contribuye a plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes de vicarianza o dispersión y a identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieran haber influido en ellos.

Las raíces históricas de la filogeografía están ligadas a los primeros estudios del ADN mitocondrial animal de la década de los 70 y principios del 80. En la actualidad más del 70% de los trabajos en filogeografía están basados en secuencias de ADNmt animal, debido a las propiedades especiales de esta molécula para ser empleada como marcador filogenético a nivel microevolutivo. El incremento del número de trabajos sobre filogeografía ha sido explosivo y abarca numerosas disciplinas; entre sus múltiples aplicaciones cabe señalar los estudios destinados a determinar el lugar de origen y las vías de dispersión de especies consideradas plagas agrícolas o que han colonizado archipiélagos volcánicos (Roderick y Gillespie, 1998; Sequeira, *et al.*, 2000; Juan *et al.*, 1995); las causas de la diferenciación poblacional observada en caracteres cromosómicos o genéticos y su correlación con gradientes geográficos y/o ecológicos (Confalonieri *et al.*, 1998, 2002), etc.

2. LA FAMILIA CURCULIONIDAE.

Los insectos designados comunmente como gorgojos son coleópteros pertenecientes a la superfamilia Curculionoidea, la cual es la más diversa de todos los seres vivos, habiéndose descrito alrededor de 60.000 especies asociadas con todos los grupos de plantas vasculares.

Debido a su enorme diversidad, los curculiónidos constituyen un grupo ideal para abordar estudios filogenéticos relacionados con su clasificación natural, como así también aspectos referidos a la evolución de ciertos caracteres supuestamente adaptativos, o su posible coevolución con diferentes grupos de plantas huéspedes. Los curculiónidos se alimentan de una gran variedad de tejidos vegetales de tallos, raíces, hojas, flores, frutos y semillas, y es por ello que algunas especies resultan dañinas para ciertos cultivos, principalmente al estado de larva, y pueden transformarse en plagas agrícolas. Por ejemplo *Anthonomus grandis* Boheman, especie conocida vulgarmente como “picudo del algodón”, es la más perjudicial para dicho cultivo en toda América, habiendo causado pérdidas millonarias y aún el abandono de la producción de algodón en ciertas áreas. En el caso de insectos plaga, el empleo de datos moleculares para la caracterización de sus poblaciones resulta particularmente relevante desde el punto de vista aplicado, ya que permite obtener información sobre el lugar de origen de las especies (donde se hallan los enemigos naturales que las controlan), sus vías de dispersión, y la intensidad del flujo génico entre sus poblaciones, y de esta manera contribuyen a implementar estrategias más efectivas para su manejo integrado.

Anthonomus grandis (Curculioninae, Anthonomini) pertenece a un grupo de gorgojos caracterizado por la presencia de un rostro mediano a largo, que la hembra utiliza para preparar un sitio de oviposición en algún órgano de la planta huésped. En este caso la oviposición es endofítica, al igual que el desarrollo larval, y suele haber una relación estrecha entre fitófago y planta huésped (se trata de especies monófagas u oligáfagas) (Lanteri *et al.*, 2002c). Por ejemplo, las hembras del picudo del algodón oviponen en los botones florales y frutos de *Gossypium hirsutum* y de otras malváceas, preferentemente de la tribu Gossypieae.

Otros gorgojos, presentan un rostro corto y ancho, que las hembras no utilizan para la oviposición, la cual es exofítica y se realiza a menudo en lugares cercanos al suelo. En este caso las larvas son frecuentemente subterráneas y se alimentan de los tejidos externos de las raíces, y el rango de plantas huéspedes suele ser más amplio, de modo que se habla de especie polífagas, aunque con ciertas preferencias por

determinadas familias de plantas. Por ejemplo, las especies del “grupo de gorgojos de la alfalfa”, perteneciente al complejo *Pantomorus-Naupactus* (Entiminae, Naupactini) suelen estar asociadas con *Medicago sativa* y con otras leguminosas en la Argentina, pero también se las ha encontrado alimentándose sobre cereales, cítricos, árboles frutales, etc (Lanteri, 1994; Lanteri *et al*, 2002a).

En este trabajo de tesis se han estudiado gorgojos representativos de los dos grupos taxonómicos y ecológicos anteriormente mencionados y para ello se han empleado básicamente las mismas herramientas metodológicas: datos de secuencias de ADN mitocondrial y análisis de las mismas mediante métodos cladísticos (=parsimonia). Por una parte se ha llevado a cabo un estudio filogeográfico en la especie plaga del algodón *Anthonomus grandis*, y por otro, un estudio filogenético de 17 especies representativas del complejo *Pantomorus-Naupactus*, la mayoría de las cuales forman parte del grupo de gorgojos de la alfalfa. Los taxones en estudio se distribuyen en el continente americano desde los Estados Unidos de América hasta la Argentina y revisten importancia económica.

2.1 Estudio filogenético en el complejo *Pantomorus-Naupactus*.

La pregunta fundamental que se intentará responder a través de este trabajo de tesis es ¿las especies de los géneros *Pantomorus* y *Naupactus* constituyen grupos monofiléticos?

El complejo *Pantomorus-Naupactus* está integrado por alrededor de 300 especies distribuidas desde los EEUU hasta la Argentina, y registra su máxima diversidad en las áreas tropicales y subtropicales de América del Sur. Además de los géneros *Pantomorus* Schoenherr y *Naupactus* Dejean, dentro del citado complejo se incluyen otros géneros considerados afines, como son *Aramigus* Horn, *Asynonychus* Crotch, *Atrichonotus* Buchanan, *Graphognathus* Buchanan, *Phacepholis* Horn y *Eurymetopus* Schoenherr, la mayoría representados en la Argentina.

Los caracteres de la morfología externa resultan insuficientes para realizar una buena caracterización de los géneros del complejo *Pantomorus-Naupactus* sobre la base de un criterio filogenético, y algunos de ellos, tales como la reducción de la región humeral de los élitros y de las alas metatorácicas, podrían conducir al reconocimiento de taxones artificiales basados en caracteres convergentes surgidos en linajes que habitan ambientes similares (por ejemplo áreas de vegetación abierta). En este contexto, Lanteri y colaboradores han planteado que la mayor parte de las especies de América del Sur

asignadas frecuentemente a *Pantomorus* constituirían un grupo polifilético basado en caracteres convergentes, y que la mayoría de los restantes géneros del complejo serían grupos monofiléticos surgidos a partir del género parafilético *Naupactus*.

Las contribuciones realizadas por Lanteri y colaboradores durante los últimos años han permitido una mejor caracterización de los grupos del complejo *Pantomorus-Naupactus* mediante el aporte de nuevos atributos, principalmente de las estructuras genitales de machos y hembras, y han establecido las bases para interpretar su filogenia (Lanteri, 1986, 1990; Lanteri & O'Brien, 1990; Lanteri & Díaz, 1994; Lanteri & Marvaldi, 1995). No obstante dichos aportes, las relaciones filogenéticas entre estos taxones aún no han sido dilucidadas, pues hasta el presente, no se había realizado un análisis de conjunto que permitiera establecer si la similitud morfológica entre algunas especies o grupos de especies del complejo es homóloga (= debida al antecesor común) u homoplástica (= debida a evolución paralela o convergente) (DePinna, 1991).

Por las razones expuestas, se decidió realizar un análisis cladístico de conjunto, incluyendo un grupo de especies representativas de la diversidad del complejo *Pantomorus-Naupactus*, y empleando secuencias de ADN mitocondrial (gen de la Citocromo Oxidasa I) y datos morfológicos. La utilidad de este tipo de análisis en el estudio filogenético de especies cercanamente emparentadas ha sido demostrado ampliamente durante los últimos años, inclusive en el caso de taxones de la tribu Naupactini (Normark & Lanteri, 1998; Sequeira *et al.*, 2000).

El reconocimiento de grupos monofiléticos (= basados en sinapomorfias) por métodos de parsimonia es importante no sólo para producir clasificaciones biológicas más eficientes (Goloboff, 1998a), sino además, para poner a prueba hipótesis en el campo de la biología evolutiva, la biogeografía histórica, el estudio de la especiación y la coevolución etc. Por ejemplo, Lanteri & Normark (1995) y Normark & Lanteri (1998) aplicaron métodos de parsimonia para estudiar la evolución de linajes sexuales y partenogenéticos en la especie *Aramigus tessellatus*, y Sequeira *et al.* (2000) para analizar posibles tipos de especiación en un género distribuido en las islas Galápagos. En este sentido, en el presente trabajo se analizará, de manera preliminar, la evolución de la partenogénesis en algunas especies del complejo *Pantomorus-Naupactus*, basado en la metodología cladística.

2.2 Estudio filogeográfico en *A. grandis*.

La pregunta fundamental que se intentará responder en este trabajo es ¿cuál es el origen de las poblaciones de América del Sur del picudo del algodón?

Anthonomus grandis fue descrita en 1843 sobre la base de especímenes de México cuya planta hospedadora no se hallaba indicada. Unos 40 años después se encontró en los Estados Unidos de América, causando importantes daños en algodónero. En tan solo 20 años (desde 1898 hasta 1916 aproximadamente) se extendió a lo largo de todo el cinturón algodónero del sur de los EEUU, desde la costa Pacífica hasta la costa Atlántica, ocasionando cuantiosos daños (Manessi, 1997).

Aproximadamente 50 años después de su irrupción en América del Norte, el picudo fue hallado en América del Sur, también en algodónero y en huéspedes alternativos. La secuencia de registros en los diferentes países de América del Sur es la siguiente: Venezuela (1949), Colombia (1951), Brasil (1983), Paraguay (1991), Argentina (1993) y Bolivia (1997).

Burke *et al.* (1986) plantearon una hipótesis para explicar la dispersión de *A. grandis* en los EEUU, desde el sur de México. Basándose en datos sobre la diferenciación morfométrica en las poblaciones de *A. grandis* y en la información sobre sus plantas huéspedes, estos autores postularon que se habrían producido dos expansiones principales, una en tiempos geológicos previos al cultivo del algodón, y otra en tiempos históricos, gracias al cultivo del algodón. La primera expansión dataría del Plesitoceno, y habría estado asociada con la dispersión y diversificación de malváceas de los géneros *Gossypium* y *Cienfuegosia* a lo largo de la costa Pacífica (oeste) y del Golfo de México (este). La segunda expansión estaría asociada con el cultivo del algodónero, y se habría producido desde Texas hacia la costa Atlántica.

Para América del Sur, los mismos autores plantearon la hipótesis de una o más introducciones accidentales del picudo, gracias al comercio del algodón, probablemente desde los EEUU, a partir de la cual se habría producido su dispersión en todo el continente. Esta hipótesis se basó en estudios morfométricos preliminares sobre picudos de Venezuela y de Brasil, los cuales indicarían que éstos son similares a los picudos del sudeste de USA (Burke *et al.*, 1986).

Estudios genéticos recientes, basados en poblaciones de picudos de Argentina, Brasil y Paraguay mediante la técnica de RAPDs (Scataglini *et al.*, 2000), pusieron en duda la hipótesis de la introducción de la especie en América del Sur, como única causa para explicar su origen en el continente. Esto se debe a que muestras recolectadas en

zonas de vegetación nativa protegidas como el parque Nacional Iguazú (Misiones, Argentina), resultaron ser genéticamente más afines a las muestras de México que a las de USA, u otras áreas próximas de Brasil, Paraguay y Argentina (Formosa). Asimismo, las muestras de Iguazú y de México presentaron un alto grado de diferenciación, típico de poblaciones ancestrales, por lo contrario, las restantes muestras de Argentina, Paraguay y Brasil, procedentes en su mayoría de zonas aldoneras, presentaban características de poblaciones colonizadoras recientes.

Los resultados obtenidos por Scataglini *et al* (2000) motivaron la realización de un estudio filogeográfico, basado en secuencias de ADN mitocondrial (genes de la Citocromo Oxidasa I y II), con el fin de determinar el origen de las poblaciones de América del Sur del picudo del aldonero.

3. OBJETIVOS GENERALES.

3.1 Referidos al complejo *Pantomorus-Naupactus*.

- Analizar las relaciones filogenéticas entre un conjunto de especies representativas de la diversidad del complejo *Pantomorus-Naupactus*.
- Reconocer grupos monofiléticos que puedan contribuir a una propuesta de clasificación natural para dicho complejo y a estudiar la evolución de la partenogénesis en el grupo.

3.2 Referidos a la especie *Anthonomus grandis*.

- Establecer cuál es el origen de las poblaciones de América del Sur del picudo del algodón.
- Proponer una hipótesis para explicar la expansión de la especie en América del Sur.

CAPÍTULO II

Metodologías

1. TÉCNICAS DE LABORATORIO.

1.1 Obtención y preservación de los materiales de estudio

Los ejemplares de las especies pertenecientes a los distintos géneros del complejo *Pantomorus-Naupactus* fueron recolectados por Lanteri y colaboradores, mediante procedimientos habituales en entomología. Para la recolección de especies frecuentes en pastizales y áreas de vegetación abierta, como las de *Pantomorus* y otros géneros afines, se empleó la red de arrastre. Para coleccionar los *Naupactus* se empleó la red de arrastre y/o el método de la sábana, que consiste en sacudir las ramas de los árboles o arbustos donde se hallan posados los adultos mediante una vara, y dejarlos caer sobre un lienzo extendido, ubicado por debajo de la planta. Esto es posible dado que se trata de especies con escasa o nula capacidad de vuelo.

Los ejemplares del picudo del algodón estudiados fueron recolectados por especialistas y técnicos de diferentes instituciones de la Argentina y de otros países, relacionados con el monitoreo y control de la plaga. Se obtuvieron muestras de poblaciones de Argentina, Brasil y Paraguay, y también de EEUU y de México, a fin de considerar estas últimas como posibles fuentes. Las muestras procedentes de Argentina fueron obtenidas a partir de trampas de feromonas cuyo diseño se explica en Manessi (1997), colocadas en distintos puntos de la frontera con Brasil y Paraguay por técnicos asociados con el "Proyecto de Manejo Integrado del Picudo del Algodonero en Argentina, Brasil y Paraguay", que las revisan periódicamente. La mayor parte de las muestras proceden de zonas algodoneras, pero se incluyeron también muestras de Argentina tomadas en zonas de vegetación nativa.

Todos los insectos empleados para el análisis de secuencias de ADN mitocondrial fueron individuos adultos, que se conservaron en alcohol al 100%. Sólo aquellos ejemplares transferidos al líquido conservante inmediatamente después de muertos resultaron útiles para el análisis molecular.

1.2 Extracción del ADN.

La extracción de ADN se realizó según el protocolo propuesto por Reiss *et al* (1995), siguiendo los pasos que se describen a continuación:

- 1- Sacar el individuo del frasco con alcohol y dejar que se evapore el alcohol apoyándolo sobre un papel absorbente.
- 2- Colocarlo en un mortero con nitrógeno líquido y machacar hasta que quede reducido a un polvo fino.
- 3- Transferir el machacado a un tubo de 1,5 ml.
- 4- Agregar 450 ul de una solución 8:1:1 de Buffer de lisis: SDS 10 %: Proteinasa K 2 mg/ml.
- 5- Agregar 1 ul de RNAsa (10mg/ml) y agitar.
- 6- Incubar a 60°C durante 1 hora.
- 7- Extraer proteínas agregando 3 volúmenes de fenol.
- 8- Centrifugar 10 min a 10.000 rpm.
- 9- Pasar el sobrenadante a un tubo limpio
- 10- Repetir el procedimiento desde el punto 7 con fenol-cloroformo isoamílico.
- 11- Precipitar el sobrenadante con 2 volúmenes de perclorato de sodio en etanol.
- 12- Incubar 20 min a -70°C o toda la noche a -20°C.
- 13- Centrifugar 15 min a 13.000 rpm para precipitar el ADN.
- 14- Eliminar el sobrenadante.
- 15- Resuspender el precipitado en etanol 70% para lavarlo.
- 16- Centrifugar, volcar el sobrenadante y resuspender en 100 ul de buffer TE.
- 17- Guardar a -20°C.

1.3 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR y purificación.

Se amplificaron fragmentos de los genes mitocondriales Citocromo Oxidasa I (COI) y Citocromo Oxidasa II (COII) mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) (Saiki *et al*, 1988) utilizando cebadores específicos.

-Para el complejo *Pantomorus – Naupactus*, se realizó la amplificación de COI de 1 individuo por cada una de las 17 especies analizadas. Se utilizaron 4 cebadores por individuo (dos sentido y dos antisentido) amplificando el gen en dos mitades. Para la primera mitad se utilizó el par de cebadores S1718-A2442 amplificando un fragmento de 700 pares de bases. Para la segunda mitad se amplificaron alternativamente fragmentos de 500 y 600 pares de bases utilizando los pares de cebadores S2336-A2831 (Normark, 1994) y Uea5-Uea8 (Lunt, *et al*, 1996) respectivamente. En la figura 2 se muestra un esquema de las regiones amplificadas.

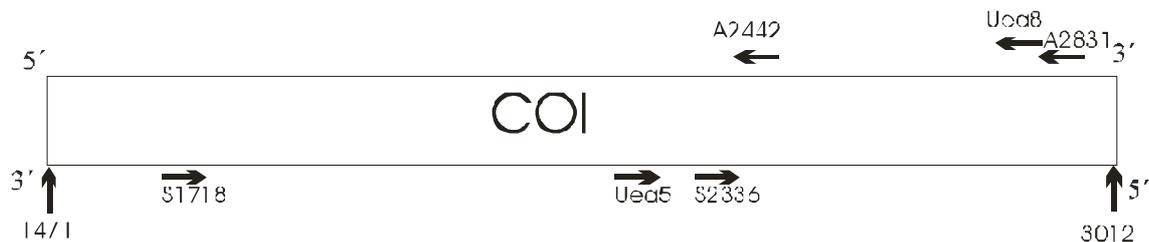
-Para *Anthonomus grandis*, se realizó la amplificación de 700 pb de la primera mitad del gen de COI, y además se amplificó un segundo fragmento de 400 pares de bases perteneciente al gen de COII. Ambos fragmentos fueron amplificados en un promedio de 9 y 6 individuos respectivamente, para cada una de las 7 poblaciones analizadas. Se utilizó el par de cebadores S1718-A2442 (Normark, 1994) para la amplificación correspondiente a la primera mitad del gen de COI y el par COIIS-COIIA (Liu & Beckenbach, 1992) para el fragmento del gen de COII.

Los cebadores utilizados para la amplificación de las dos mitades del gen COI y del fragmento del gen COII se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar y secuenciar las porciones de los genes COI y COII en los gorgojos analizados. Los sitios de apareamiento de los cebadores están dentro de los genes COI y COII. Las secuencias de los cebadores fueron tomadas de Normark (1994), Lunt *et al* (1996) y Liu & Beckenbach (1992). Los nombres de los cebadores de COI consisten en una “S” o una “A” que indican el sentido, seguido de un número que se refiere a la posición del extremo 3’ con respecto a la secuencia de *Drosophila yakuba* (Clary & Wolstenholme, 1985).

En las especies del complejo <i>Pantomorus-Naupactus</i>	700 pb. de la 1ª mitad del gen COI cebador S1718 5’GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC 3’ cebador A2442 5’GCT AAT CAT CTA AAA ATT TTA ATT CCT GTT GG 3’
	500 pb. de la 2ª mitad del gen COI cebador S2336: 5’GGA TTA YTA GGA TTT GTH GTW TGR GCY CA 3’ cebador A2831: 5’TCC TAT TAR WGA RAT TAA TCT TCC RAT TG 3’
	600 pb. de la 2ª mitad del gen COI cebador Uea5: 5’AGT TTT AGC AGG AAT TAC TAT 3’ cebador Uea8: 5’ AAA AAT GTT GAG GGA AAA ATG TTA 3’
En las poblaciones de <i>Anthonomus grandis</i>	700 pb. de la 1ª mitad del gen COI cebador S1718 5’GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC 3’ cebador A2442 5’GCT AAT CAT CTA AAA ATT TTA ATT CCT GTT GG 3’
	400 pb de la 1ª mitad del gen COII cebador COIIS: 5’GGT CAA ACA ATT GAG TCT ATT TGA AC 3’ cebador COIIA 5’CCA CAA ATT TCT GAA CAT TGA CCA 3’

Figura 2. Esquema del gen COI, mostrando las regiones amplificadas en los estudios del complejo *Pantomorus-Naupactus* y del picudo del algodón *Anthonomus grandis*. Los números de las posiciones corresponden al genoma de *Drosophila yakuba* (Clary & Wolstenholme, 1985).



Todas las reacciones de amplificación se realizaron en una solución final de 50 μ l conteniendo 100-200 ngr. del ADN extraído (ADNmolde), 0,5 μ M de cada cebador o “primer”, 200 μ l de cada DNTP, 3,5 mM de CIMg₂, buffer 1x suministrado por Promega y 2,5 unidades de Taq polimerasa (Promega). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Techne con el siguiente perfil de ciclos de temperaturas: 1 ciclo de 6 min a 96 °C; 35 ciclos de 1 min a 96 °C, 1 min a temperatura de “annealing” (temperatura de apareamiento de los cebadores al molde, la cual fue puesta a punto para cada especie y varió entre 46 y 53 °C), 2 min a 72°C; 1 ciclo de 4 min a 72 °C.

Los productos de amplificación doble cadena fueron separados electroforéticamente en gel de agarosa 0,8% con buffer de corrida TAE 1% (tabla 4) y un potencial de 100 voltios. El gel se tiñó con bromuro de etidio 0.5 mg/ml y los fragmentos se visualizaron bajo luz UV.

Los tamaños de los fragmentos amplificados se estimaron por comparación con un marcador de peso molecular (fago Lambda cortado con enzimas de restricción Hind III y EcoRI).

Las bandas fueron extraídas del gel y el ADN fue purificado con “QIA quik Gel Extraction kit” (QIAGEN Inc.).

La composición de las soluciones utilizadas en los protocolos se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Composición de las soluciones de laboratorio de los protocolos experimentales.

Buffer de lisis	0.05 M de Tris – 0.1 M de Na Cl – 0.1 M Edta disódico
Perclorato de sodio en etanol	2.9 M de perclorato de sodio en 80% de etanol 100%
Buffer TE	0.01 M de Tris – 0.001 M de Edta disódico
Buffer TAE 50X	242 gr. De Tris – 57.1 ml de ácido acético –100 ml de Edta disódico 0.5 M PH 8.

1.4 Secuenciación de los genes mitocondriales.

Las secuencias de nucleótidos fueron obtenidas de manera automática mediante un Secuenciador de ADN, PE Biosystem automated 377 a partir de los fragmentos purificados.

Los cebadores utilizados fueron los mismos que para la amplificación del producto (tabla 3).

-Para el complejo *Pantomorus – Naupactus*, se realizaron 4 secuencias por especie (dos sentido y dos antisentido) abarcando en total una porción de 999 pares de bases, correspondientes a las posiciones 260 a 1258 del gen COI (Lunt, *et al*, 1996).

-Para las poblaciones de *Anthonomus grandis*, se secuenciaron 279 pares de bases pertenecientes a la primera mitad del gen de COI, a partir de un único cebador (S1718). Estas secuencias se corresponden con las posiciones 296 a 574. Para el gen COII se secuenciaron 327 pares de bases a partir del cebador COIIS correspondientes a las posiciones 256 a 582 de la primera mitad del gen. (Liu & Beckenbach, 1992).

2. ANÁLISIS DE DATOS.

2.1 Edición, alineación y diferenciación de las secuencias de ADN.

La edición de las secuencias de ADN se llevó a cabo mediante el programa BIOEDIT.

Las proporciones de nucleótidos y la divergencia nucleotídica de secuencias de ADN se estimaron utilizando el programa MEGA v2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

Las secuencias de ADN obtenidas fueron traducidas a secuencias de aminoácidos, mediante al código de ADN mitocondrial para invertebrados (Clary & Wolstenholme, 1985), a fin de descartar la amplificación de posibles pseudogenes nucleares. Se asume que una secuencia pertenece a un gen del genoma mitocondrial, y no a un pseudogen, cuando no codifica para codones “stop” (Sorenson & Fleischer 1996, Zhang & Hewit 1996) y/o cuando no presenta eventos de inserción/delección, plausibles de generar cambios en el marco de lectura (Bensasson *et al.*, 2000). Las secuencias de aminoácidos obtenidas fueron comparadas con las presentadas por Lunt y colaboradores (1996) para el gen COI y por Liu & Beckenbach (1992) para COII en distintas familias de insectos. En dicha comparación se corroboró la ausencia de eventos de inserción/delección, por lo cual, las secuencias de ADN fueron posteriormente alineadas de manera no ambigua mediante el programa CLUSTAL V (Higgins & Sharp, 1989).

Los patrones aminoacídicos propuestos por Lunt (1996) y Liu & Beckenbach (1992) para COI y COII respectivamente, se utilizaron también a fin de establecer si la distribución de la variabilidad en aminoácidos de las secuencias estudiadas era coincidente con la de otros géneros y familias de insectos. Los mencionados autores mostraron que tanto en el gen de COI como en el de COII existen diferentes regiones, evolucionando a distintas velocidades. Por un lado existen zonas conservadas, donde las secuencias de aminoácidos se mantienen constantes a lo largo de los diferentes grupos de insectos, y en las cuales solamente se producirían, a nivel nucleotídico, sustituciones sinónimas, evidenciando una fuerte presión de selección debido a restricciones funcionales de la proteína. Por otro lado, se presentan zonas con diferentes grados de diferenciación en las secuencias de aminoácidos.

2.2 Análisis de parsimonia.

2.2.1 Construcción de matrices de datos.

2.2.1.a En el complejo *Pantomorus-Naupactus*

Se construyeron tres matrices de datos:

- Una matriz de secuencias de COI conformada por 17 especies y 999 caracteres. En algunas pocas especies no pudo completarse toda la secuencia, por lo que algunos sitios fueron codificados como “datos faltantes”.
- Una matriz morfológica, elaborada por Lanteri para ser utilizada en este estudio (Apéndice 1), que consta de 17 unidades terminales y 30 caracteres, de los cuales 23 corresponden a la morfología externa (caracteres 1 a 23), seis a los genitales de la hembra (caracteres 24 a 29) y uno a los genitales del macho (carácter 30). Asimismo 18 de dichos caracteres son doble estado y 12, multiestado.
- Una matriz combinada compuesta por 17 unidades terminales y 1029 caracteres (999 correspondientes a secuencias del gen COI y 30 a la morfología).

Dado que se trató de un estudio a nivel específico donde las especies se encuentran bien diferenciadas y no se esperarían divergencias entre árboles de genes y árboles de especies (de Queiroz, 1993), se realizó el análisis simultáneo de la matriz molecular y la morfológica (matriz combinada) más allá del grado de incongruencia entre los dos conjuntos de datos (Nixon & Carpenter, 1996).

2.2.1.b En *Anthonomus grandis*.

61 secuencias del fragmento amplificado en el gen COI y 42 pertenecientes al fragmento amplificado del gen COII se compararon entre sí y en base a esto se definieron las diferentes variantes mitocondriales existentes en todas las poblaciones o “haplotipos”.

Se construyeron dos matrices de datos:

- Una matriz para el gen de COI conformada por 23 haplotipos y 279 caracteres.
- Una matriz para el gen de COII conformada por 15 haplotipos y 327 caracteres. En algunos individuos no pudo completarse toda la secuencia, por lo que algunos sitios fueron codificados como “datos faltantes”.

En este caso ambas matrices fueron analizadas de manera separada, pues en los estudios a nivel intraespecífico pueden producirse diferentes topologías para cada árbol de genes, ya que las ramas internas son suficientemente cortas para evidenciar discordancias debidas a las diferentes historias de ramificación o “sorting” de linajes de las diferentes genealogías génicas (de Queiroz, 1993).

2.2.2 Tratamiento de los caracteres.

Cada sitio nucleotídico del alineamiento constituyó un carácter en el análisis cladístico de las secuencias.

2.2.2.a En el complejo *Pantomorus-Naupactus*.

Los caracteres de las tres matrices fueron analizados como no ordenados o no aditivos, y bajo distintas estrategias de pesado: bajo pesos iguales, bajo pesos diferenciales y bajo diferentes costos de transformación entre transversiones y transiciones.

El análisis bajo pesos iguales se llevó a cabo con el programa NONA versión 2.0 (Goloboff, 1999).

El análisis bajo pesos iguales implica asignar *a priori* un peso =1 a todos los caracteres, aunque la mayoría de los cladistas concuerdan en que los distintos caracteres no aportan en igual medida a la resolución de las relaciones cladísticas entre los taxa (Goloboff, 1998a). Por lo tanto se realizó también un análisis bajo pesos diferenciales.

El problema de cómo asignar peso a los caracteres ha sido muy discutido (Farris, 1969; Carpenter 1988, 1994; Goloboff, 1993). La mayoría de los autores coincide en que no existe un criterio objetivo para asignar pesos diferenciales *a priori* del análisis. En el caso particular de las secuencias de ADN algunos especialistas han propuesto asignar un peso nulo o menor a los caracteres que ocupan las terceras posiciones de los codones. Estos sitios del ADN tienen una tasa de sustitución mayor en relación a la primera y segunda posiciones, debido a que presentan una menor presión de selección, siendo la mayoría sustituciones sinónimas, es decir que no provocan el cambio del aminoácido codificado. Sin embargo, autores como Källersjö *et al* (1999), demostraron que muchas veces la estructura del árbol puede estar dada en su mayoría por la información aportada por las terceras posiciones, de manera que al disminuir arbitrariamente su peso *a priori* se estaría perdiendo importante información filogenética.

Farris (1969) propuso un método de pesado “a posteriori” denominado “pesado sucesivo”, que está implementado en el programa Hennig86 (Farris, 1988) y ha sido muy utilizado. Es un método iterativo donde en cada corrida se asigna mayor peso a los caracteres con menor grado de homoplasia en el árbol anterior, y así sucesivamente. Cuando un nuevo análisis produce idénticos resultados al precedente, el proceso se detiene.

Una modificación al método de pesado sucesivo de Farris, es el análisis por pesos implicados (Goloboff, 1993). Este método le asigna peso a los caracteres durante las búsquedas, usando una función creciente y cóncava de la homoplasia y seleccionando los árboles que minimizan esta función. La idea es que los árboles que maximizan la citada función resuelven el conflicto entre caracteres en favor de aquéllos que presentan menos homoplasia para esos árboles. El peso de un carácter es una función de su ajuste a un árbol, por lo tanto los pesos quedan determinados por los árboles en cada comparación, y no necesitan tomarse como datos ni permanecer fijos durante el análisis. Lo que en definitiva determina los pesos es el resultado del mismo análisis. Esta es una diferencia importante con el método de pesado sucesivo de Farris, donde los árboles son comparados de acuerdo con las implicancias del carácter en un árbol obtenido en un análisis previo.

En este trabajo de tesis se utilizó el método de pesos implicados de Goloboff, implementado en el programa PIWE versión 3.0 (Goloboff, 1997). PIWE presenta seis diferentes constantes para la función de concavidad ($K= 1,2,3,4,5,6$). Las tres primeras $K=1=2=3$ pesan más fuertemente en contra de los caracteres homoplásticos, mientras que $K=4=5=6$ lo hacen más débilmente. Se analizaron los distintos valores de K , a fin de evaluar la estabilidad de los resultados en cada caso.

Por otra parte, para los datos moleculares, se realizó además un análisis que pesara diferencialmente los distintos tipos de transformaciones del ADN, en vez de los caracteres. Los cambios de bases posibles en una secuencia de ADN se clasifican en: transversiones (Tv), que son cambios entre una purina y una pirimidina o viceversa, y transiciones (Ts) que son cambios purina-purina o pirimidina-pirimidina. Si bien es sabido que las transiciones son más frecuentes que las transversiones y que suelen saturarse rápidamente, la relación entre los dos tipos de transformaciones no es medible en ausencia de una filogenia previa que determine el modelo evolutivo para los costos de transformación. La circularidad de la interacción entre la especificación de estos valores *a priori* y su inferencia *a posteriori* es un problema central en el análisis filogenético de datos de secuencias de ADN (Wheeler, 1995). Por lo tanto es necesario realizar un análisis de sensibilidad o “sensitive analysis” (*sensu* Wheeler, 1995), poniendo a prueba diferentes costos para la relación transversión/transición, a fin de evitar fijar *a priori* un valor arbitrario.

El análisis de diferentes costos de transformación para transversiones y transiciones se llevó a cabo con el programa SPA versión 1.9 (Goloboff, 1998b). Los

diferentes valores de costos utilizados fueron: $T_v/T_s = 1/0 = 2/1 = 4/1 = 6/1 = 8/1 = 10/1$.

2.2.2.b En *Anthonomus grandis*.

Los caracteres fueron analizados como no ordenados o no aditivos. En este caso, se llevó a cabo solamente el análisis bajo pesos iguales con el programa NONA versión 2.0 (Goloboff, 1999).

2.2.3 Búsqueda de los árboles de longitud mínima.

Existen dos tipos de estrategias básicas para obtener el o los árboles más cortos, exactas y heurísticas. La primera garantiza que se ha encontrado el árbol más corto y las otras no, pero las búsquedas exactas sólo puede aplicarse en la práctica a matrices de no más de 15 taxones.

Una estrategia de búsqueda heurística aconsejable es partir de uno o más árboles de Wagner iniciales (este es un algoritmo básico de construcción para la cladística, con secuencias de adición al azar de los taxones) y aplicar a ellos permutación de ramas.

La permutación de ramas o “Branch swapping” consiste en tomar los mejores árboles obtenidos hasta el momento, cortar una rama y moverla a otras partes del árbol, calculando en cada caso la longitud. Esto permite, idealmente, aproximarse a los árboles óptimos. Los cambios de ramas pueden hacerse de dos formas distintas: el corte simple y el corte con re-enraizamiento conocidos en inglés como “subtree pruning regrafting” (SPR) y “tree bisection reconnection”(TBR), respectivamente. El corte simple o SPR toma cada nodo del árbol, lo corta y lo mueve a cada ubicación disponible; el corte con re-enraizamiento o TBR reenraiza el grupo cortado en todas sus posibles raíces y en cada caso lo ubica en todas las posiciones posibles.

En los casos en que se utilizó la búsqueda exacta, se partió del comando “whennig” para crear un árbol de Wagner y luego se aplicó el comando de rearrreglos múltiples “mswap+”. Los “swapeadores múltiples” cortan los árboles en más de un punto al mismo tiempo y por lo tanto producen más rearrreglos. El “mswap+” corta un árbol de T taxones en T-3 puntos, produciendo, por reacomodamientos del tipo TBR, todos los árboles posibles, por lo tanto es una solución exacta.

En el caso de las búsquedas heurísticas, la permutación de ramas no garantiza encontrar todos los árboles de longitud mínima. A veces puede ser imposible llegar desde el árbol que se está permutando hasta otro árbol de longitud menor o igual, a menos que se pase a través de árboles de longitud mayor. Esto se conoce como el

problema de las islas. Se interpreta que los árboles que no están conectados entre sí por medio de árboles de longitud mínima están en islas distintas. Una manera de solucionar el problema de las islas es usar distintos puntos de partida para la permutación de ramas, de forma que se pueda llegar a árboles de distintas islas. Para esto suelen utilizarse distintos árboles de Wagner producidos por diferentes secuencias de adición. En la medida que a partir de distintas secuencias de adición se llega al mismo resultado, aumenta la certeza de haber encontrado todos los árboles óptimos (Goloboff, 1998a).

El algoritmo utilizado para las búsquedas heurísticas fue entonces MULT*N con $N = 10$ replicaciones. Este comando crea N árboles de Wagner con secuencias de adición al azar (ó sea que se parte de 10 secuencias de adición distintas) y a partir de cada uno hace permutación de ramas del tipo TBR, reteniendo en cada replicación los árboles distintos y más cortos hallados. Cuando todas las réplicas obtuvieron árboles de longitud mínima, no fue necesario adoptar estrategias de búsqueda más rigurosas. En los casos en que no todas las réplicas obtuvieron los árboles más cortos se realizó un “swapeo” adicional mediante el comando max* a fin de reportar todos los cladogramas presentes en las islas halladas. Este es uno de los algoritmos de búsqueda heurística más exhaustivo que suele realizarse.

Todos los comandos de búsqueda utilizados están implementados en NONA, así como en PIWE y SPA

2.2.4 Cálculo de los parámetros del árbol.

El índice de consistencia de un carácter (c) fue introducido por Kluge & Farris (1969), como una medida del ajuste del carácter a un árbol y fue definido como $c = m / s$ donde m representa la variación observada (llamada comúnmente rango del carácter), es decir la mínima cantidad de pasos que ese carácter puede mostrar en cualquier árbol, y s es el número de pasos del carácter requerido por parsimonia, en un determinado árbol (Farris, 1989). El valor s es equivalente al rango del carácter (m) más el n° extra de pasos ú homoplasia que presente en determinado árbol: $s = m + h$. Cuando un carácter no requiere homoplasia en un árbol $h = 0$ y $m = s$, entonces el ajuste del carácter al árbol es perfecto y $c = 1$.

Para computar este índice para un conjunto de caracteres, cada s y m es sumada para todos los caracteres, dando C , M y S totales para un determinado árbol (Farris, 1989). El árbol que presente menor n° de pasos extra (homoplasia) para todos los

caracteres, o sea el árbol más corto, es aquel que maximiza $C = \Sigma mi / \Sigma si$. $C = 1$ cuando ningún carácter presenta homoplasia sobre ese árbol. Cuánto menor es C , mayor es el grado de homoplasia o número de pasos extra que presentan los caracteres sobre ese árbol.

El índice de retención (r) evalúa el comportamiento del cladograma con respecto al peor comportamiento posible. Se calcula para cada carácter, haciendo el cociente entre la homoplasia observada y la máxima homoplasia posible: $r = g-s/g-m$, siendo g la mayor cantidad de cambios homoplásicos posibles para ese carácter. Una vez calculado este valor para todos los caracteres se calcula el R para todo el cladograma.

Los índices R_i y C_i fueron calculados con el programa WinClada v1.00.08 (Nixon, 2002).

2.2.5 Medidas de soporte de ramas.

Como método de remuestreo se utilizó el de “Jackknifing”, el cual se basa en hacer alteraciones a la matriz de datos (mediante remuestreos al azar de todos o parte de los caracteres) un número dado de veces, calculando con qué frecuencia un grupo dado se halla presente en los árboles óptimos. Los remuestreos al azar dan una idea de qué proporción de evidencia a favor y en contra hay para cada grupo, y por lo tanto, en qué medida la adición de nuevos caracteres puede modificar las conclusiones. Los valores de jackknifing fueron calculados con el programa WinClada v1.00.08 (Nixon, 2002) generando 100 réplicas de la matriz original.

Además se utilizó otro método de medida de soporte de ramas que no está basado en remuestreos, el “Bremer support” (Bremer, 1994). Este algoritmo calcula la diferencia en longitud entre los árboles más cortos, con y sin la presencia de determinado grupo, de modo que cuanto mayor sea esa diferencia, mejor apoyado estará dicho grupo. Se calcula con el comando BSUPPORT N siendo N el número de pasos extras para los árboles subóptimos. Se fijó un $N=7$. Al aumentar el N, el número de árboles subóptimos retenidos es cada vez mayor, y la memoria se llena fácilmente ya que está programada para guardar 50 árboles. Esta programación puede modificarse con el comando “HOLD” que aumenta en la memoria el número de árboles que se pueden retener y de esta manera incrementa el número de árboles subóptimos revisados. En este trabajo se utilizó “HOLD=20.000”. El “Bremer support” está implementado en NONA, PIWE y SPA.

2.2.6 Optimización de caracteres.

Es la asignación de estados de caracteres a los nodos del árbol de acuerdo con un modelo de parsimonia previamente establecido. Los caracteres que producen homoplasia pueden presentar optimizaciones ambiguas, es decir que pueden definirse como sinapomorfías que luego revierten (opción del tipo acelerado o ACCTAN) o como caracteres con evolución paralela en diferentes ramas (opción del tipo retrasado o DELTRAN). En este trabajo se utilizó la optimización de tipo acelerado, ya que mantiene la hipótesis de homología del carácter en lugar de plantear que pudo haber surgido dos veces de manera independiente durante la evolución, como lo supone DELTRAN, en la cual la hipótesis de homología de estado de carácter es rechazada.

La optimización de caracteres, tanto moleculares como morfológicos, se realizó mediante el programa WinClada v1.00.08 (Nixon, 2002).

2.3 Análisis de Congruencia en el complejo *Pantomorus-Naupactus*.

Se estudió la congruencia entre los diferentes tipos de análisis y los distintos conjuntos de datos en el estudio del complejo *Pantomorus-Naupactus*.

Los análisis de congruencia se dividen en dos clases: la congruencia taxonómica y la congruencia de caracteres (Wheeler, 1995).

La congruencia taxonómica se basa en la topología y concierne a las conclusiones entre diferentes análisis filogenéticos. La información compartida puede ser expresada en términos de grupos compartidos o mostrada como cladogramas consenso (Nelson, 1979; Rohlf, 1982; Bremer, 1990). Si dos análisis soportan cada uno los mismos grupos son completamente congruentes.

La congruencia de caracteres (Mickevich & Farris, 1981) cuantifica el grado de conflicto entre caracteres provenientes de distintos conjuntos de datos.

El estadístico de Mickevich y Farris (1981) estima el conflicto de caracteres creado por la combinación de los datos, independientemente del conflicto de caracteres interno de cada data set. Se define la cantidad de incongruencia (D) como los pasos extra del árbol resultante del análisis combinado con respecto a la suma de pasos de los árboles obtenidos por separado.

$$D_{xy} = L(x + y) - (L_x + L_y)$$

Cuando el largo del árbol obtenido a partir del conjunto de datos combinados $L(x+y)$ es mayor que la suma de los largos de los árboles obtenidos por separado ($L_x +$

Ly), D es mayor que cero y da una medida de la incongruencia entre ambas matrices. Si los largos son iguales, D es igual a cero y las matrices son congruentes.

La significación estadística de esta medida de incongruencia se estima mediante el método de (ILD) Incongruence Length Difference (Farris *et al.*, 1994). Este ensayo prueba está basado en la prueba de U de una cola de Mann-Whitney (Lindgren, 1962), y mide la significación de la incongruencia entre distintos “sets” o particiones de datos, poniendo a prueba la hipótesis nula de congruencia ($D = 0$), bajo una distribución de particiones al azar de todo el conjunto de datos (Farris *et al.*, 1994). La significación está dada por la distribución de probabilidades de los valores de D bajo la hipótesis nula. Esta distribución se obtiene a partir de un número W de particiones al azar de todo el conjunto de datos en dos matrices de los mismos tamaños que las dos matrices originales. Cada forma posible de repartir los datos en dos matrices de tamaño igual a las originales tiene la misma probabilidad bajo la distribución de la hipótesis nula. A partir de la distribución de la hipótesis nula, se obtiene un valor S igual al número de particiones que den valores de D menores al D observado para las matrices originales. La probabilidad de que el D observado sea suficientemente pequeño para considerarlo distinto de 0 debido al azar, es decir la probabilidad de rechazar la hipótesis nula siendo verdadera (error de tipo I) se calcula como $p = 1 - S / (W + 1)$.

El método de ILD se llevó a cabo para estimar estadísticamente la congruencia de caracteres entre el set de datos molecular y morfológico del complejo *Pantomorus-Naupactus*. Se realizó con el programa WinClada v1.00.08 (Nixon, 2002) y se utilizó un número de particiones = 999. ____

Si bien se utilizó la prueba de ILD como método para estimar estadísticamente el grado de incongruencia entre distintos conjuntos de datos, no se condicionó el resultado del mismo a la aplicación del análisis combinado o simultáneo, en concordancia con lo propuesto por Nixon & Carpenter (1996) y en contraposición a Chippindale & Weins (1994) que postulan abandonar el análisis combinado si los resultados son heterogéneos.

2.4 Análisis filogeográfico en *Anthonomus grandis*.

Este análisis se llevó a cabo para el estudio de las poblaciones del picudo del algodónero.

2.4.1 El método filogeográfico.

Como metodología *per se* la filogeografía fue revolucionaria en al menos tres aspectos importantes (Avise, 2000):

El primer aspecto, surgido de los tempranos estudios del ADNmt, fue la introducción de conceptos explícitos de filogenia en la evolución intraespecífica. Anteriormente a estos estudios había una noción de que la filogenia no tenía significado en el nivel intraespecífico debido a que, por la reproducción sexual de los organismos, los linajes coespecíficos eran reticulados más que jerárquicamente ramificados. Hennig (1966) distinguía claramente un patrón jerárquico ramificado para las especies y taxa superiores (relaciones filogenéticas) y un patrón reticulado o red de linajes anastomosados, por debajo del nivel de especie, producto de las relaciones reproductivas entre individuos (relaciones tocogenéticas). Bajo este marco conceptual, no hubiese sido correcto intentar reconstruir filogenias de individuos de reproducción biparental (Lanteri, 1995b). Sin embargo, debido al modo de transmisión asexual (sin recombinación) del ADNmt, los árboles de genes mitocondriales no son reticulados y sí jerárquicamente ramificados, aún en especies de reproducción sexual (Avise *et al.*, 1994; Avise, 2000). De esta forma la historia del componente matrilineal de los organismos puede ser inferida usando los algoritmos y perspectivas de la sistemática filogenética.

El segundo aspecto revolucionario de la filogeografía, que se deriva del primero, fue la introducción y visión no ortodoxa de que organismos individuales pueden ser tratados como OTU en un análisis genético poblacional. Esto se deriva lógicamente del hecho que cada animal presenta un haplotipo de ADN mitocondrial especificable, heredado intacto, sin recombinación intermolecular, a través de la vía materna. En la mayoría de los estudios intraespecíficos basados en isoenzimas las complicaciones mendelianas de la poliploidía, la segregación genética y el “sorting” o reparto independiente de los linajes, hacía necesario que las poblaciones, en lugar de los individuos, sean tratados como unidades de estudio. Esto significó que las poblaciones tuvieran que ser definidas de alguna manera (usualmente con un criterio geográfico) previo al análisis. Una vez que la población era definida, presentaría determinadas

relaciones con otras poblaciones en algún estudio basado en frecuencias alélicas y así sería justificada. Actualmente, con el análisis del ADN mitocondrial, este elemento de circularidad no deseable puede ser removido de la interpretación de patrones poblacionales. La historia matrilineal de organismos individuales puede ser estimada sin complicaciones provenientes de definiciones *a priori* de la unidad poblacional y además sin preocuparse del error de muestreo que el nivel poblacional tiene que atender en el análisis de frecuencias alélicas o genotípicas de colecciones finitas (Awise, 2000).

El tercer aspecto revolucionario del método filogeográfico es que permite la identificación de eventos históricos en las poblaciones, los cuales explicarían la actual distribución de la especie. Las metodologías tradicionales de la genética de poblaciones no consideran los factores históricos cuando estiman el flujo génico intra e interpoblacional. Los estudios filogeográficos, en cambio, permiten identificar patrones que señalan la existencia de barreras antiguas al flujo génico ya que tienen en cuenta el flujo génico histórico y la fragmentación poblacional en un contexto filogenético (Awise, 2000). En consecuencia, el análisis filogeográfico pone en evidencia los diferentes grados de estructuración poblacional de las especies estableciendo los factores históricos que podrían haber causado dicha estructuración (Awise *et al.* 1987). Por ejemplo, si una especie está fuertemente estructurada, en el filograma aparecerán filogrupos separados por “gaps” de varios pasos mutacionales. Estos “gaps” pueden estar correlacionados con una mayor distancia geográfica, pero también pueden estar evidenciando algún otro tipo de aislamiento (ecológico o etológico) de largo plazo, como eventos de fragmentación histórica. A su vez, dentro de cada filogrupo, los haplotipos se separan generalmente por pocos pasos mutacionales. La presencia de varios haplotipos distintos en un mismo filogrupo evidencia una mayor diferenciación genética y un tiempo relativo mayor de divergencia (Lanteri & Confalonieri, 2003).

La “teoría de la coalescencia” (Hudson, 1990) provee el marco conceptual para el estudio de los procesos que influyeron históricamente sobre las poblaciones y que dieron lugar a la distribución actual de su variabilidad genética. Esta teoría es básicamente un modelo de separación de linajes y deriva génica que se retrotrae en el tiempo, hasta un ancestro común.

El concepto de coalescencia tiene una inevitable relación entre los tradicionales conceptos de la genética de poblaciones de tiempos de pérdida o fijación de nuevas mutaciones o tiempos de separación de alelos idénticos por descendencia; así como con el concepto básico de coancestralidad o monofilia de la sistemática filogenética.

En el marco de la filogeografía la idea de coalescencia es explicitada de la siguiente manera: cuando una nueva mutación alcanza la fijación en una población o especie, todos los alelos de ese *locus* son idénticos por descendencia (o coalescen) a una sola copia del alelo en la cual surgió la mutación. Cuando se interrumpe el flujo génico entre dos poblaciones, éstas comenzarán a diferenciarse genéticamente hasta que llegará un momento en que todos los alelos de cada población tengan o coalezcan en un ancestro común más cercano entre sí, que con los alelos de la otra población. A este estado se lo denomina “monofilia recíproca”, y se llega luego de que los alelos han transitado por estados previos de parafiletismo y polifiletismo en el árbol de genes (Avice, 2000).

Si se hacen inferencias sobre el pasado histórico de las poblaciones cuando éstas todavía no alcanzaron el estado de monofilia, es posible hallar todavía variación alélica ancestral, que puede ser interpretada erróneamente como debida a flujo génico inter poblacional. El “sorting” de los alelos hasta alcanzar el estado de monofilia es una de las causas fundamentales por las que el árbol de un gen mitocondrial puede diferir sustancialmente del árbol de organismos cuando se trabaja a nivel microevolutivo (ver figura 1). Por lo tanto es necesario producir diferentes genealogías para estimar la verdadera filogenia de los organismos (Avice, 2000).

2.4.2 Pasos del análisis filogeográfico.

-Cada haplotipo fue considerado como unidad terminal en el análisis cladístico. Como la presencia y frecuencia de haplotipos en las distintas poblaciones es diferente (algunas son monomórficas y otras presentan una gran diversidad), en algunos casos los haplotipos empleados como unidades terminales representaron un individuo de una población, y en otros casos representaron varios individuos de la misma población o presentes en más de una población.

-Se realizó el análisis de parsimonia y la optimización de los caracteres en cada rama.

-Los cladogramas resultantes del análisis se transformaron en filogramas. Los filogramas son cladograma sin raíz y con longitud de ramas de acuerdo con la cantidad de cambio acumulado (evidenciado en la optimización de caracteres).

-En los filogramas se tuvieron en cuenta también las frecuencias y la distribución geográfica de los haplotipos, a fin de interpretar los procesos evolutivos responsables de la dispersión de la especie en estudio.

-El patrón de distribución obtenido fue comparado con patrones filogeográficos de varias especies codistribuidas, lo que contribuyó a plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes de vicarianza o dispersión y a identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieran haber influido en la estructuración actual de la especie.

CAPÍTULO III

Estudio filogenético en el complejo

Pantomorus-Naupactus

1. ANTECEDENTES.

1.1 El problema sistemático.

La subfamilia Entiminae reúne los denominados “gorgojos de rostro corto” y es la más diversa dentro de Curculionidae, con alrededor de 12.200 especies distribuidas a nivel mundial (Lanteri *et al.*, 2002a, Alonso-Zarazaga & Lyal, 1999). Análisis filogenéticos recientes (Marvaldi *et al.*, 2002), basados en evidencia morfológica y molecular, señalan que se trata de un grupo monofilético que reúne numerosas tribus entre las cuales la mejor representada en la República Argentina es Naupactini, también monofilética y de distribución casi exclusivamente Neotropical.

El género más diverso de Naupactini es *Naupactus* Dejean, distribuido desde México hasta la Argentina, con alrededor de 200 especies, 60 de ellas presentes en nuestro país. Las especies de *Naupactus* habitan generalmente en áreas de selva y bosque xerófilo y se las suele encontrar sobre árboles y arbustos. Otros géneros de América del Sur, considerados filogenéticamente próximos a *Naupactus* como, *Asynonychus* Crotch, *Aramigus* Horn, *Atrichonotus* Buchanan, *Graphognathus* Buchanan y *Pantomorus* Schoenherr, se distribuyen principalmente en áreas de vegetación abierta y se asocian preferentemente con pastos y hierbas. Todos los géneros mencionados precedentemente, y probablemente algunos más, forman parte del complejo *Pantomorus* - *Naupactus*, denominación acuñada por Buchanan (1939) y empleada posteriormente por Lanteri y colaboradores (Lanteri & O'Brien, 1990; Lanteri & Morrone, 1995).

Desde el punto de vista morfológico, las especies de *Naupactus* se distinguen de los demás géneros del complejo, principalmente porque presentan tamaño mediano a grande (mayores de 15 mm), antenas muy largas, hombros salientes, alas metatorácicas desarrolladas y ovipositor con un par de hileras de setas hacia el lado externo de los *baculi*. En los restantes géneros las especies son generalmente más pequeñas (no superan los 5- 10mm), con antenas cortas a medianas, hombros reducidos o ausentes, alas metatorácicas no desarrolladas y ovipositor sin setas.

Los caracteres previamente mencionados resultan insuficientes para realizar una buena caracterización de los géneros del complejo *Pantomorus*-*Naupactus* sobre la base de un criterio filogenético, y algunos de ellos, tales como la reducción de las alas metatorácicas, podrían conducir al reconocimiento de taxones artificiales basados en

convergencias, surgidas como adaptaciones a ambientes similares (de vegetación abierta).

Frente a esta situación, distintos especialistas han adoptado diferentes criterios para la delimitación genérica. Por ejemplo, Buchanan, consideró a *Asynonychus*, *Aramigus*, *Atrichonotus*, *Graphoganthus* y *Phacepholis* Horn (el último sólo presente en USA) como subgéneros de *Pantomorus* (Buchanan, 1939), mientras que Wibmer & O'Brien (1986) trataron a la mayor parte de estos géneros como sinónimos de *Pantomorus*, todos basándose en el carácter compartido de la reducción de hombros y alas. Por otra parte Lanteri y colaboradores consideraron a dichos géneros como independientes de *Pantomorus sensu lato* (taxón probablemente artificial), debido a que presentan ciertos caracteres apomórficos, principalmente en los genitales (Lanteri, 1990; Lanteri & O'Brien, 1990; Lanteri & Díaz, 1994; Lanteri & Marvaldi, 1995). Además Lanteri & Morrone (1995) sugirieron que *Eurymetopus* Schoenherr podría formar parte del complejo *Pantomorus-Naupactus* debido a su proximidad con *Atrichonotus* y *Graphognathus*. Morrone (1999) transfirió todas las especies de América del Sur asignadas tradicionalmente a *Pantomorus*, al género *Naupactus*, y consideró que el nombre *Pantomorus* debería emplearse sólo para las especies de México (alrededor de 34), país de donde procede la especie tipo de dicho género.

Los cambios en la delimitación de los géneros han dado lugar a numerosos cambios nomenclaturales. La extensa sinonimia de algunas de las especies del complejo *Pantomorus-Naupactus* (ver tabla 5) refleja el grado de controversia en torno a su clasificación y la complejidad que enfrentaron, a lo largo de los años, los distintos especialistas que trabajaron en este diverso grupo de organismos.

La profundización de los estudios taxonómicos y filogenéticos seguramente obligará a la redefinición de los géneros mencionados sobre la base de un criterio de monofilia. Los aportes realizados por Lanteri y colaboradores en los géneros *Atrichonotus* (Lanteri & O'Brien, 1990), *Phacepholis* (Lanteri, 1990), *Aramigus* (Lanteri & Díaz, 1994; Normark & Lanteri, 1998) y las especies del grupo de *Pantomorus auripes* (Lanteri, 1995) han demostrado la utilidad de la metodología cladística para reconocer grupos monofiléticos en el complejo *Pantomorus-Naupactus*, y en el caso de *Aramigus*, la importancia de emplear información molecular además de la morfológica (Normark & Lanteri, 1998).

La mayoría de los estudios filogenéticos realizados hasta el momento en especies del complejo (Lanteri, 1986, 1990, 1995; Lanteri & O'Brien, 1990; Lanteri &

Díaz, 1994; Lanteri & Morrone, 1995; Normark & Lanteri, 1998), se refieren a un solo género o a pequeños grupos de especies afines relacionadas, y por lo tanto no permiten poner a prueba la monofilia de los distintos géneros pertenecientes al complejo. Un paso fundamental para avanzar en el estudio del complejo *Pantomorus-Naupactus* es reconocer los grupos naturales (ya sean géneros o grupos de especies) dentro del mismo y analizar sus relaciones de parentesco en un contexto global, a fin de disponer de evidencia suficiente para adoptar las decisiones taxonómicas que resulten más apropiadas.

Para el presente estudio, se han elegido especies de América del Sur representativas de los distintos géneros, con las cuales se realizó un análisis filogenético, basado tanto en datos morfológicos como en secuencias de ADN mitocondrial; a fin de establecer los grupos naturales dentro del complejo *Pantomorus-Naupactus*, poniendo a prueba la hipótesis de monofilia de los distintos géneros integrantes del grupo.

Las principales preguntas que se pretende responder mediante este estudio son las siguientes:

- ¿Cuales géneros de los que actualmente integran el complejo *Pantomorus-Naupactus* son monofiléticos?
- ¿La propuesta de algunos autores de considerar a *Asynonychus*, *Aramigus* y *Graphognathus* como sinónimos de *Pantomorus* o de *Naupactus* estaría apoyada por la evidencia filogenética?
- ¿El género *Eurymetopus* forma parte del complejo *Pantomorus-Naupactus*?
- ¿Qué sinapomorfias morfológicas justifican los grupos monofiléticos reconocidos?
- ¿Estos grupos, son también recuperados por los datos del ADNmt?

1.2 Evolución de caracteres adaptativos.

La metodología cladística resulta también de gran utilidad para poner a prueba hipótesis para interpretar la evolución de ciertos caracteres posiblemente adaptativos (Brooks & McLennan, 1991; Cigliano & Morrone, 2000). Para ello es preciso contar con cladogramas de los grupos cuyo carácter (o caracteres) se quieren analizar, identificar los linajes donde se ha producido una evolución del carácter supuestamente adaptativo y determinar la secuencia de transformación de dicho carácter y los cambios ambientales que habrían acompañado tal transformación.

Los caracteres adaptativos son aquellos que confieren a los organismos alguna ventaja o utilidad, y que surgieron históricamente por selección natural. Un carácter apomórfico posiblemente adaptativo en el grupo de gorgojos en estudio es la presencia de partenogénesis, en contraposición con la reproducción sexual (carácter plesiomórfico ancestral), ya que les conferiría una ventaja a las especies que han colonizado ambientes de vegetación abierta. El tema de la evolución de la partenogénesis reviste gran interés no sólo desde el punto de vista teórico sino también aplicado, pues un mejor conocimiento podría contribuir a predecir el avance de ciertas especies sobre zonas de cultivos. Muchas especies con este tipo de reproducción se comportan como plagas y han demostrado una mayor capacidad de dispersión y colonización que sus “parientes diploides” en ambientes marginales de condiciones extremas o disturbados (como por ejemplo agroecosistemas).

La partenogénesis, tipo de reproducción a partir de hembras vírgenes, en Curculionoidea es telitóquica (las hembras producen sólo hembras en su descendencia) y apomítica o ameiótica (aborta la primera división reduccional de la meiosis en la gametogénesis), por lo cual suele estar relacionada con poliploidía, existiendo formas desde triploides hasta decaploides. Para explicar el origen de la poliploidía se ha planteado que las hembras que presentan una alteración en su gametogénesis y producen óvulos $2n$, podrían ser fecundadas por machos normales (producen esperma haploide), dando una descendencia triploide incapaz de reproducirse sexualmente, pero viable gracias a la partenogénesis.

Dentro de los Curculionidae, la partenogénesis se ha registrado en tres subfamilias: Scolytinae (escarabajos de la madera), Listroderinae, y Entiminae (Suomalainen *et al.*, 1987; Lanteri & Normark, 1995). Previamente a los trabajos de Lanteri y colegas (Lanteri, 1993; 1995; Lanteri & O'Brien, 1990; Lanteri & Normark, 1995; Normark & Lanteri, 1996, 1998), sólo se habían reportado tres especies

partenogenéticas para la tribu Naupactini (Entiminae): *Naupactus peregrinus*, *Naupactus leucoloma* y *Asynonychus cervinus*; las cuales fueron introducidas desde América del Sur en los Estados Unidos junto con diversos cultivos (Suomalainen *et al.*, 1987). Lanteri & Normark (1995) brindaron una lista de alrededor de 30 especies con alta probabilidad de incluir linajes partenogenéticos, sobre la base de la ausencia de machos en las poblaciones, y mapearon el carácter partenogénesis sobre distintos cladogramas de especies de Naupactini, para analizar el surgimiento independiente de dicho carácter.

Un hallazgo de importancia en el estudio de la partenogénesis en gorgojos fue el descubrimiento del fenómeno de partenogénesis geográfica en especies de América del Sur, ya que éste había sido descrito sólo para especies europeas de *Otiorhynchus*. Lanteri (1984, 1993), Lanteri & Díaz (1994) y Lanteri & Marvaldi (1995) postularon que *A. cervinus*, *A. tessellatus*, *N. peregrinus* y *N. leucoloma* presentarían partenogénesis geográfica, y que existen linajes sexuales de cada una de estas especies asociados con su área de distribución original y linajes partenogenéticos distribuidos en áreas de colonización reciente (praderas de América del Sur y de otras latitudes donde las especies fueron introducidas accidentalmente con cultivos). Por otra parte, Normark (1994) demostró la presencia de poliploidía en especies de *Aramigus*, y Normark & Lanteri (1998) realizaron un análisis cladístico de este género, en el que postulan un origen híbrido de dichos linajes, basándose en que la incongruencia entre los conjuntos de datos empleados en el análisis (secuencias del gen COI y caracteres morfológicos) se observa principalmente en los linajes de reproducción sexual.

Otro aspecto que ha despertado un gran interés en el estudio de la partenogénesis, en los últimos años, ha sido la asociación entre especies partenogenéticas y la bacteria endosimbionte *Wolbachia* (Huigens *et al.*, 2000). Esta bacteria se ha encontrado en un gran número de especies de Nemátodos y Artrópodos, incluyendo Chelicerados, Crustáceos, Tracheados (Collembola), e Insectos (Neurópteros, Hemípteros, Hymenópteros, Psocópteros, Thysanópteros y Coleópteros), lo cual permitiría inferir una coevolución muy antigua para la asociación huésped eucariota-simbionte procariota (Warren *et al.*, 1995). Esta bacteria sería la responsable de la alteración de la gametogénesis y posterior origen de partenogénesis en varias especies. Hasta el presente la inducción de partenogénesis por *Wolbachia* ha sido demostrada sólo para hembras de himenópteros de la serie parasítica con haplodiploidía (familias Trichogrammatidae, Pteromalidae, Eucilidae y Aphelinidae).

Dentro de Curculionoidea, *Wolbachia* se ha encontrado en el gorgojo de la alfalfa de USA, *Hypera postica* (Hyperinae) (Leu *et al*, 1989), en *Aramigus tessellatus* (Werren *et al*, 1995) y en Scolytinae (Peleg & Norris, 1972 a y b). Recientemente, miembros de este grupo de investigación, han reportado la presencia de *Wolbachia* en otra especie del complejo *Pantomorus – Naupactus*, *Asynonychus cervinus* (Rodríguez *et al*, 2004). Hasta el presente, no se ha comprobado que la bacteria sea responsable de la inducción de partenogénesis de estos gorgojos, pero produciría “incompatibilidad citoplásmica” (CI) en *Hypera postica*. La CI determina la muerte de los embriones o que estos dejen muy poca descendencia cuando se realizan ciertos cruzamientos, por ejemplo de hembras no infectadas con *Wolbachia* y machos infectados, o de hembras y machos que tiene diferentes cepas de *Wolbachia*. Además, dado que la CI produciría reducción del flujo génico entre poblaciones, se ha propuesto que podría favorecer su divergencia y por lo tanto constituiría un factor de especiación (Werren, 1998).

En esta tesis se estudiará de manera preliminar la evolución de la partenogénesis en el complejo *Pantomorus – Naupactus*, intentando contribuir al estudio de la evolución del carácter en Curculionidae y a explicar sus posibles causas.

1.3 Características biológicas y daños a los cultivos.

Las especies del complejo *Pantomorus-Naupactus* se consideran polífagas, ya que tienen la capacidad de alimentarse sobre diferentes grupos vegetales dentro de las Angiospermas. Sin embargo, a medida que se profundizan los estudios sobre asociaciones biológicas y evolución de fitófagos y sus huéspedes o asociados, se ponen en evidencia preferencias alimentarias por determinadas familias vegetales (Marvaldi *et al.*, 2002); por ejemplo, las especies de Naupactini que se distribuyen en las provincias biogeográficas Chaqueña y Pampeana, prefieren las leguminosas, solanáceas y asteráceas (Lanteri *et al.*, 2002a)

Estos gorgojos cumplen su ciclo de vida generalmente en un año, aunque en ambientes con temperaturas más elevadas el período se puede acortar, y en áreas más frías se puede extender a dos años. La mayor parte del ciclo transcurre en el suelo, en estado de larva, la cual se alimenta de los tejidos externos de las raíces de las plantas afectando principalmente la corteza y el floema; la pupación también es subterránea. Los picos de emergencia de adultos se suceden desde el principio de la primavera hasta fines del otoño, de modo que durante todo el período estival hay adultos alimentándose sobre el follaje y larvas dañando las raíces (Lanteri, 1994).

Una vez emergidos de la celda pupal, los adultos pierden los procesos mandibulares caducos típicos de los Entiminae que les facilitan dicha emergencia, y comienzan a alimentarse de las partes verdes de la planta (preferentemente bordes de las hojas y brotes tiernos). Pasado un período de pre-oviposición, comienza la cópula y la oviposición, que puede realizarse en el suelo (oviposición hipodáfica), o sobre las plantas (oviposición epifítica), por lo general en grietas donde los huevos se ocultan de posibles depredadores (Lanteri *et al*, 2002b).

Las mayoría de las especies del complejo *Pantomorus-Naupactus* realizan puestas de huevos en masa, cementados con una sustancia viscosa que se endurece al secar. El número más frecuente de huevos por postura oscila entre 10 y 25, pero puede llegar a más de 70, dependiendo de las plantas que hayan servido como alimento al adulto. Las leguminosas determinan puestas de numerosos huevos, no así las gramíneas (Lanteri, 1994).

El daño más significativo que estas especies pueden causar a distintos cultivos y/o plantaciones lo provocan las larvas. La acción de sus potentes mandíbulas determina surcos característicos en las raíces y en las zonas atacadas se forma un tejido cicatrizante y de protección, el cual falta en los surcos recientes que resultan así susceptibles a la contaminación por agentes patógenos (Lanteri, 1994). En algunos casos en que aumenta mucho la densidad poblacional, los adultos pueden causar una intensa defoliación que también resulta perjudicial para las plantas.

La mayor parte de las especies analizadas en este estudio forman parte del denominado “grupo de gorgojos de la alfalfa” (Brewer & Varas, 1973; Lanteri, 1994), integrado por alrededor de 22 especies, que en conjunto causan un gran perjuicio a los alfalfares del área pampeana de la Argentina (provincias de Bs. As, Córdoba, Entre Ríos, La Pampa y Santa Fe). Los alfalfares constituyen un hábitat adecuado y una fuente de alimento rica y semipermanente para estos gorgojos, que suelen invadir y establecerse en dichos cultivos, disminuyendo notablemente la producción, principalmente cuando el aumento de sus poblaciones se asocia con otros factores tales como presencia de malezas y otras plagas o enfermedades (Lanteri, 1994). Por esta razón el grupo de gorgojos de la alfalfa, se considera una plaga primaria, junto con los pulgones y las orugas cortadoras y defoliadoras (Itria, 1964; Harcourt *et al*, 1986).

Algunos de los “gorgojos de la alfalfa” (*Aramigus tessellaus*, *Asynonychus cervinus*, *Atrichonotus taeniatulus*, *Graphognathus leucoloma*, *G. minor*) también suelen causar daños en otros cultivos del área pampeana como soja, girasol y cereales; e

inclusive han sido introducidos accidentalmente en países de otras latitudes (Australia, Nueva Zelandia, Europa, Estados Unidos y Sudáfrica) donde se comportan como serias plagas (Lanteri, 1994; Lanteri *et al*, 1997; Lanteri *et al*, 2002b). Por ejemplo, en los Estados Unidos, *Graphognathus leucoloma* y *G. minor* se conocen con el nombre vulgar de “white- fringed weevils” y son muy dañinas para las legumbres, principalmente porotos; y *A. cervinus* se conoce como “rose weevil”, por sus daños en plantas de invernáculo.

Debido a su frecuente asociación ecológica con árboles y arbustos, algunos *Naupactus* suelen causar daños en frutales, plantas de jardín y vid (*N. verecundus* y *N. xanthographus*), y/o son perjudiciales para cítricos en la mesopotamia Argentina y en Brasil (*N. ambiguus*, *N. dissimulator*, *N. navicularis*) (Lanteri *et al*, 2002b). La especie empleada como outgroup en el análisis cladístico, *Teratopactus nodicollis*, también se considera dañina para los cítricos (Lanteri *et al*, 2002b), como así también *Asynonychus cervinus*, especie actualmente cosmopolita presente tanto en ambientes abiertos (forma partenogenética) como de selva o bosque (forma sexual) (Lanteri, 1993; Lanteri & Normark, 1995).

2. HIPÓTESIS PUESTAS A PRUEBA.

2.1 En el campo de la sistemática.

- *Naupactus* sería un género parafilético, a partir del cual han surgido diversos linajes que habrían acumulado independientemente un gran número de caracteres apomórficos. Varios de estos linajes han sido descriptos como géneros diferentes.

- *Pantomorus*, en sentido amplio, sería un grupo polifilético basado en caracteres convergentes, principalmente la reducción de la zona humeral de los élitros y la ausencia de alas metatorácicas. Dichos cambios estarían asociados con la colonización de ambientes de vegetación abierta.

2.2 En relación con la congruencia de caracteres.

- Congruencia entre la matriz de datos correspondiente a las secuencias de ADN mitocondrial y la matriz de datos morfológica confeccionada por Lanteri (Apéndice).

2.3 En relación con la evolución de caracteres supuestamente adaptativos.

- Ocurrencia independiente de la partenogénesis en el grupo en estudio y su asociación con linajes que han colonizados ambientes de vegetación abierta, marginales para la distribución del complejo *Pantomorus-Naupactus*.

3. OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar un análisis de parsimonia de las especies del *complejo Pantomorus-Naupactus*, utilizando secuencias del gen COI, bajo diferentes esquemas de pesado.
- Llevar a cabo el mismo tipo de análisis sobre la matriz de datos morfológicos.
- Realizar un análisis combinado o simultáneo de la evidencia morfológica y molecular.
- Evaluar la congruencia taxonómica, comparando las topologías de los cladogramas basados en datos morfológicos y moleculares, y discutir sus principales diferencias.
- Evaluar la congruencia de caracteres de los conjuntos de datos moleculares y morfológico, mediante el método de ILD de Farris *et al.* (1994).
- Analizar la evolución de caracteres posiblemente adaptativos (*e.g.* presencia de partenogénesis apomítica) y su correlación con factores ambientales, mediante la optimización de dichos caracteres sobre el cladograma resultante del análisis combinado.

4. ESTRATEGIA Y MATERIALES DE ESTUDIO

Se seleccionaron 16 especies del complejo *Pantomorus-Naupactus* que constituyen una buena representación de la diversidad del grupo en el área comprendida entre el sur de Brasil, Paraguay, centro-norte de Argentina y Uruguay, incluyendo áreas de monte o selva en galería de los ríos Paraná, Uruguay y de La Plata (provincias biogeográficas paranaense y chaqueña), y áreas de vegetación abierta (provincia biogeográfica pampeana).

De estas especies una pertenece al género monotípico *Asynonychus*, una a *Aramigus*, dos a *Graphognathus*, dos a *Eurymetopus*, cuatro a *Pantomorus* y seis a *Naupactus*. Además se estudió la especie *Teratopactus nodicollis* (Heller), utilizada como outgroup en el análisis cladístico. *Teratopactus* es un género afín a *Naupactus* que se distribuye en Brasil, Paraguay y Argentina, registrando la mayor diversidad específica en Brasil (Lanteri, 1981). Los datos de distribución y asociaciones con plantas huéspedes de todas las especies estudiadas se brindan en la tabla 5.

Se obtuvieron secuencias de las dos mitades del gen mitocondrial de Citocromo Oxidasa I para un ejemplar por cada especie del complejo *Pantomorus-Naupactus* y del outgroup. Se realizó el análisis filogenético de las mismas, bajo diferentes métodos de pesado, utilizando además los datos morfológicos provistos por Lanteri. (Apéndice1).

Tabla 5: Asignaciones genéricas y distribuciones geográficas de las especies del complejo *Pantomorus* – *Naupactus*. Se indican también las diferentes asociaciones con plantas hospederas.

Especie	Asignación genérica	Distribución	Asociación con plantas hospederas
<i>Aramigus tessellatus</i> (Say 1824)	<i>Asynonychus</i> <i>Eurymetopus</i> <i>Naupactus</i> <i>Pantomorus</i>	Argentina, sur de Brasil y Uruguay. Introducida en Chile, México y EE. UU.	Bordes de la selva Paranaense en galería y pastizales de la provincia Pampeana. Alfalfa, trigo, avena y cebada.
<i>Asynonychus cervinus</i> (Boheman 1840)	<i>Aramigus</i> <i>Naupactus</i> <i>Pantomorus</i>	Argentina y Brasil. Introducida en Chile, EE.UU, Europa, Hawaii, Sudáfrica y Australia.	Bordes de la selva Paranaense en galería y pcia. Pampeana. Cítricos, alfalfa, maíz, gramíneas y plantas de jardín.
<i>Eurymetopus birabeni</i> Kuschel 1945		Argentina y Uruguay. Introducida en Australia.	Pastizales de la pcia. Pampeana. Leguminosas.
<i>Eurymetopus fallax</i> Boheman 1840		Argentina, sur de Brasil y Uruguay.	Pastizales de la pcia. Pampeana. Alfalfa y cereales en general.
<i>Naupactus ambiguus</i> Boheman, 1840	<i>Asynonychus</i> <i>Pantomorus</i>	Argentina, Brasil y Paraguay.	Vegetación de las pcias. Pampeana y Chaqueña. Alfalfa y cítricos.
<i>Naupactus cinereidorsum</i> Hustache 1947		Argentina y Uruguay.	Vegetación de las pcias. Pampeana y Chaqueña. Alfalfa y girasol.
<i>Naupactus dissimulator</i> Boheman, 1840		Argentina, Paraguay Brasil y Uruguay.	Selva Paranaense en galería. Cítricos.
<i>Graphognatus leucoloma</i> Boheman, 1840	<i>Pantomorus</i> <i>Naupactus</i>	Argentina, Brasil y Uruguay. Introducida en USA, México, Chile, Sudáfrica y Australia	Pastizales de la pcia. Pampeana y Chaqueña. Alfalfa, papa y maíz.
<i>Graphognatus minor</i> (Buchanan 1942)	<i>Naupactus</i> <i>Pantomorus</i>	Argentina, Uruguay. Introducida en USA.	Pastizales de la pcia. Pampeana.
<i>Naupactus navicularis</i> Boheman, 1840		Argentina y Brasil.	Vegetación de la pcia. Paranaense.
<i>Naupactus verecundus</i> Hustache 1947		Argentina, Brasil y Paraguay. Introducida en Chile	Vegetación arbustiva de las provincias del Monte y Chaqueña. Vid y alfalfa.
<i>Naupactus xanthographus</i> (Germar 1824)		Argentina, Paraguay, Uruguay y Brasil. Introducida en Japón y USA.	Vegetación arbórea de la pcia. Chaqueña. Cítricos, vid y alfalfa.
<i>Pantomorus auripes</i> Hustache 1947	<i>Naupactus</i>	Argentina y sur de Brasil.	Pastizales de la pcia. Pampeana. Alfalfa y papa.
<i>Pantomorus cinerosus</i> (Boheman 1833)	<i>Naupactus</i>	Argentina, sur de Brasil y Uruguay.	Vegetación de la selva misionera (Pcia. Paranaense) y de las provincias Chaqueña y Pampeana. Alfalfa.
<i>Pantomorus ruizi</i> (Brèthes 1925)	<i>Asynonychus</i> <i>Naupactus</i>	Argentina y Chile.	Dicotiledóneas de las pcias del Monte, Patagónica y Pampeana. Alfalfa.
<i>Pantomorus viridisquamosus</i> (Boheman 1859)	<i>Asynonychus</i> <i>Naupactus</i>	Argentina, sur de Brasil y Uruguay.	Pastizales de la pcia. Pampeana. Alfalfa y soja.

Tabla 6. Información taxonómica de los géneros que constituyen el complejo *Pantomorus* – *Naupactus*.

Género y especie tipo	Número de especies y referencias	Designaciones taxonómicas alternativas
<i>Aramigus</i> Horn Especie tipo: <i>A. tessellatus</i> (Say)	8 especies (Lanteri & Díaz, 1994; Morrone 1999)	Subgénero o sinónimo de <i>Pantomorus</i> (Buchanan, 1939; Wibmer & O'Brien, 1986).
<i>Asynonychus</i> Crotch Especie tipo: <i>A. cervinus</i> (Boheman)	1 spp. (Morrone, 1999).	Subgénero o sinónimo de <i>Pantomorus</i> (Buchanan, 1939; Wibmer & O'Brien, 1986). Sinónimo de <i>Naupactus</i> (Alonso-Zarazaga and Lyal, 1999).
<i>Eurymetopus</i> Schoenherr Especie tipo: <i>E. fallax</i> Boheman	7 especies (Lanteri, 1984; Morrone, 1999)	
<i>Graphognathus</i> Buchanan Especie tipo: <i>G. leucoloma</i> (Boheman)	3 especies (Wibmer & O'Brien, 1986).	Subgénero de <i>Pantomorus</i> (Buchanan, 1939). Sinónimo de <i>Naupactus</i> (Lanteri & Marvaldi, 1995; Morrone, 1999; Alonso-Zarazaga & Lyal, 1999).
<i>Naupactus</i> Dejean Especie tipo: <i>N. rivulosus</i> (Olivier)	168 especies (O'Brien & Wibmer, 1982; Wibmer & O'Brien, 1986). 215 especies (Morrone, 1999).	No incluye especies tradicionalmente asignadas a <i>Pantomorus</i> . Incluye especies de América del Sur asignadas tradicionalmente a <i>Pantomorus</i> .
<i>Pantomorus</i> Schoenherr. Especie tipo: <i>P. albosignatus</i> Boheman	80 especies (O'Brien & Wibmer, 1982; Wibmer & O'Brien, 1986). 35 especies (Morrone, 1999).	Incluye las especies de <i>Pantomorus</i> de América del Norte, Central y del Sur y especies clasificadas como <i>Aramigus</i> , <i>Asynonychus</i> , <i>Galapaganus</i> Lanteri y <i>Phacepholis</i> Horn. Incluye sólo las especies de México y América Central

5. RESULTADOS.

5.1 Análisis de la diferenciación de las secuencias.

Se secuenciaron 999 pares de bases del gen de Citocromo Oxidasa I, correspondientes a las posiciones 260-1258 en la mayoría de las 17 especies estudiadas, excepto para *Naupactus verecundus* y la segunda mitad de *Aramigus tessellatus* cuyas secuencias ya se encontraban en el Genbank bajo los números de acceso U25534 y AF211490 (Sequeira *et al*, 2000; Normark & Lanteri, 1998). Las secuencias obtenidas en este trabajo fueron depositadas en el Genbank bajo los números de acceso AF211489, AF211491, AY770383-89, y AY790875-82.

Las proporciones de nucleótidos obtenidas en las secuencias analizadas fueron de 37.8% T, 17.2% C, 29.7% A, y 15.3% G. El alto porcentaje de A+T presentado (67.5%) es típico para COI en muchos otros insectos, incluidos los curculiónidos (Langor & Sperling, 1997), siendo este porcentaje mucho mayor para las terceras posiciones de codón que para la primera y segunda posiciones.

La divergencia nucleotídica total obtenida fue de 0.128 ± 0.007 , lo cual concuerda con valores esperados usualmente en estudios interespecíficos en insectos (Howland & Hewitt, 1995; Langor & Sperling, 1997; Lunt *et al*, 1996),

La traducción de las secuencias de ADN a aminoácidos, mediante el código de ADN mitocondrial para invertebrados (Clary & Wolstenholme, 1985), no presentó codones “stop” ni cambios en el marco de lectura. Esto descarta la amplificación de un pseudogen, ya que se asume que una secuencia pertenece a un gen del genoma mitocondrial, y no a un pseudogen cuando no codifica para codones “stop” ni presenta eventos de inserción/ deleción que produzcan gaps en el alineamiento y/o corrimientos en el marco de lectura (Sorenson & Fleischer 1996, Zhang & Hewit 1996, Bensasson *et al.*, 2000).

Las secuencias de aminoácidos obtenidas, además, se ajustaron perfectamente al patrón de aminoácidos propuesto por Lunt y colaboradores (1996) para el gen de COI en insectos: no presentaron cambios en las zonas conservadas (donde el patrón de aminoácidos se mantiene constante a lo largo de los diferentes grupos de insectos, debido a una fuerte presión de selección), y toda la diferenciación aminoacídica presentada se ubicó en las zonas de aminoácidos variables que presentan presiones de selección menores.

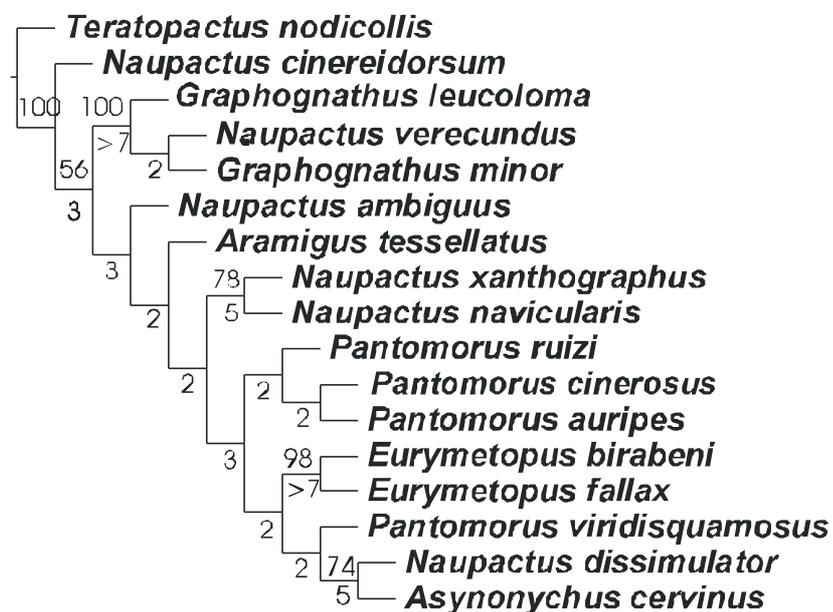
5.2 Análisis de parsimonia

5.2.1 Datos moleculares

5.2.1.a Análisis bajo pesos iguales

El análisis de los datos moleculares, bajo pesos iguales, dió como resultado 1 solo árbol más parsimoniosos de 1242 pasos, con un índice de consistencia $CI = 0,44$ y un índice de retención $RI = 0,31$.

Figura 3. Cladograma obtenido del análisis bajo pesos iguales de la matriz de datos molecular. Los valores de Jackknife se indican arriba las ramas y los de Bremer support debajo de las mismas.



Los clados formados por *N. xanthographus* – *N. navicularis* y *E. fallax*- *E. birabeni* presentan los valores más altos de soporte. También muestran buen soporte de ramas *G. leucoloma*, que aparece como especie hermana del clado *G. minor* – *N. verecundus* y *Asynonychus cervinus* como hermana de *N. dissimulator*.

5.2.1.b Análisis bajo pesos implicados.

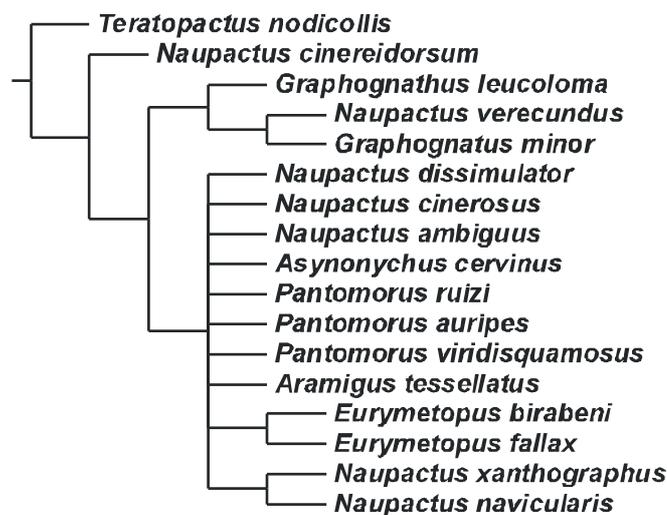
El análisis bajo pesos implicados de los datos moleculares no generó una solución estable. Se obtuvieron diferentes árboles para las distintas constantes de concavidad. Aquellas que pesan menos fuertemente en contra de los caracteres más homoplásicos ($K=4$, $K=5$, $K=6$) dieron como resultado un mismo árbol igual al obtenido para el análisis bajo pesos iguales (fig. 3). Las constantes de concavidad

K=2=3 generaron otro árbol de topología distinta, al igual que K=1 que dio como resultado dos árboles de máximo ajuste. Los valores de ajuste obtenidos para cada K se muestran en la tabla 7. En la figura 4 se muestra el consenso del total de los árboles obtenidos

Tabla 7: Valores de ajuste obtenidos bajo el método de pesos implicados de los datos moleculares. Los valores que generan árboles iguales se muestran en *itálica*.

Constante de concavidad (K)	Valor de ajuste (fit) obtenido
K=1	2 árboles de 1094,8
K=2	1 árbol de 1496,6
K=3	1 árbol de 1750
K=4	<i>1 árbol de 1920,7</i>
K=5	<i>1 árbol de 2042,8</i>
K=6	<i>1 árbol de 2139,9</i>

Fig 4. Consenso de las diferentes topologías obtenidas a partir de los datos moleculares analizados bajo el método de pesos implicados con distintas constantes de concavidad.



Se observa que *N. cinereidorsum* aparece como especie hermana del grupo *G. leucoloma* (*N. verecundus* - *G. minor*) en la parte basal del cladograma. El resto de las especies forman una politomía a excepción de los clados *N. xanthographus* - *N. navicularis* y *E. fallax* - *E. birabeni* que son los que presentaban mayores soportes en el análisis bajo pesos iguales.

5.2.1.c Análisis bajo costos de transformación diferenciales.

Se evaluaron diferentes costos de la relación transversión/transición, dado que, como se mencionó previamente, fijar *a priori* un costo determinado para transversiones y transiciones sin una filogenia previa sería arbitrario. En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las relaciones de costo probadas.

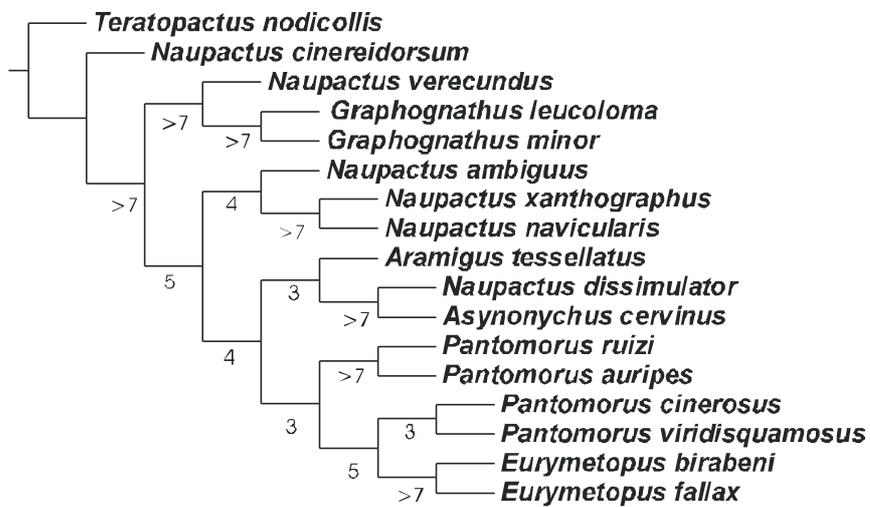
Tabla 8. Resultados del análisis bajo distintos costos de tv/ts de la matriz de datos molecular. En itálica se identifican los árboles con la misma la topología.

TV/TS	Árboles obtenidos
1/0	4 árboles de 559 pasos
2/1	1 árbol de 1810 pasos
4/1	<i>1 árbol de 2929 pasos</i>
8/1	<i>1 árbol de 5165 pasos</i>
10/1	<i>1 árbol de 6283 pasos</i>

En la tabla puede observarse que, al analizar la matriz molecular otorgando costo = 0 a las transiciones, el número de árboles obtenidos es mayor, lo cual genera un resultado con bajo nivel de resolución. Esto estaría indicando que si bien las transiciones sufren sustituciones múltiples, que derivan de la saturación de este tipo de cambio, las mismas no deben excluirse *a priori* del análisis, ya que aportan un grado importante de resolución al cladograma. Para un costo 2/1 se obtiene uno solo de estos cuatro árboles, pero esta topología no es estable, ya que no es generada por costos de tv/ts mayores.

Una topología única y estable para los datos moleculares se obtiene a partir de un valor de tv/ts $\geq 4/1$, obteniéndose un mismo y único árbol, el cual se muestra en la figura 5. Los valores de *CI* y *RI* obtenidos para esta topología fueron de 0,44 y 0,30 respectivamente.

Fig. 5: Cladograma obtenido en el análisis de la matriz de datos moleculares a partir de una relación de costos tv/ts \geq 4/1.



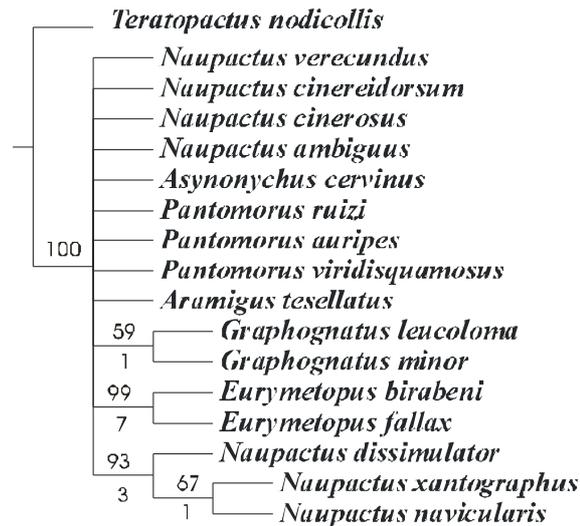
Los valores de Bremer support obtenidos muestran que este análisis recupera nuevamente con altos valores de soporte los grupos *N. xanthographus* – *N. navicularis* y *E. fallax*- *E. birabeni*. *Naupactus verecundus* aparece como especie hermana del clado *G. minor* – *G. leucoloma* y *Aramigus tessellatus* como hermana del clado *N. dissimulator* - *Asynonychus cervinus*. Se obtiene un nuevo grupo con altos valores de soporte, constituido por *P. ruizi* y *P. auripes*. Además se obtienen buenos valores de soporte para las ramas internas del cladograma que son las que determinan las relaciones más basales, lo cual no había sido obtenido en los demás tipos de análisis.

5.2.2 Datos morfológicos.

5.2.2.a Análisis bajo pesos iguales.

El análisis de los datos morfológicos bajo pesos iguales dio como resultado 34 árboles de 74 pasos, con un índice de consistencia $CI = 0,62$ y un índice de retención $RI = 0,66$. El consenso de estos 34 árboles se presenta en la figura 6.

Fig 6. Consenso estricto de los árboles obtenidos del análisis bajo pesos iguales de la matriz morfológica.



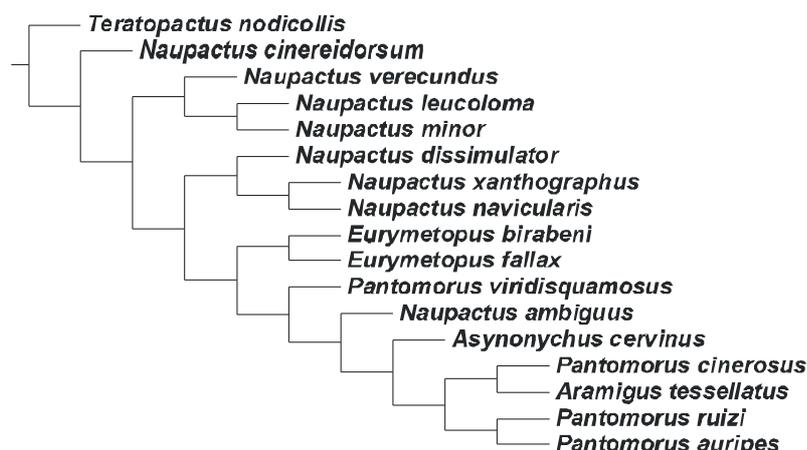
El consenso muestra un árbol muy poco resuelto, donde sólo quedan establecidos tres clados con altos valores de soporte: el clado formado por *G. leucoloma*-*G. minor*; el clado de *N. dissimulator* como hermana del grupo *N. xanthographus* -*N. navicularis*; y el clado constituido por las dos especies de *Eurymetopus*, *E. birabeni*-*E. fallax*.

Si *a priori* se excluyeran del análisis caracteres supuestamente convergentes, como los relacionados con la capacidad de vuelo (por ej. el carácter 15: reducción de los hombros elitrales), el número de árboles obtenidos baja a 4; lo cual demuestra que efectivamente estos caracteres son los que producen mayor homoplasia y hacen más difícil obtener una única topología. La solución a este problema provino de la utilización del método de pesos implicados, que otorga menor peso a los caracteres más homoplásicos durante las búsquedas, eliminando así la necesidad de excluir caracteres *a priori*.

5.2.2.b Análisis bajo pesos implicados.

El análisis de datos morfológicos bajo pesos implicados resultó en un único árbol ($CI = 0,61$ y $RI = 0,65$) el cual se muestra en la figura 7.

Fig. 7. Topología del único árbol obtenido del análisis bajo pesos implicados de la matriz morfológica.



En el árbol obtenido se recuperan los tres clados mejor soportados en el análisis bajo pesos iguales (Fig 6) y se obtiene una topología estable para las relaciones entre el resto de las especies que quedaban sin resolver en dicho análisis.

En este árbol también se recuperan los grupos de mayor soporte obtenidos en el árbol molecular a partir de costos de transformaciones $tv/ts \geq 4/1$ (Fig. 5), excepto el clado *N.dissimulator-A.cervinus*. En este caso *N. dissimulator* aparece como especie hermana del clado *N.xanthographus-N.navicularis*, al igual que en el análisis de caracteres morfológicos bajo pesos iguales. Otra diferencia con el árbol molecular es que el clado de *Eurymetopus* no aparece en la zona apical del cladograma, sino en el medio.

Los valores de ajuste obtenidos para cada constante de concavidad se muestran en la tabla 9. Si bien los valores de ajuste a partir de las diferentes constantes implementadas en el método son diferentes porque el valor de la pendiente de concavidad es distinto, la topología del árbol obtenido para cada una de las seis constantes fue la misma.

Tabla 9. Valores de “fit” o ajuste para cada constante de concavidad del árbol obtenido del análisis bajo pesos implicados, de la matriz morfológica. Todos los árboles tienen la misma topología (en itálica).

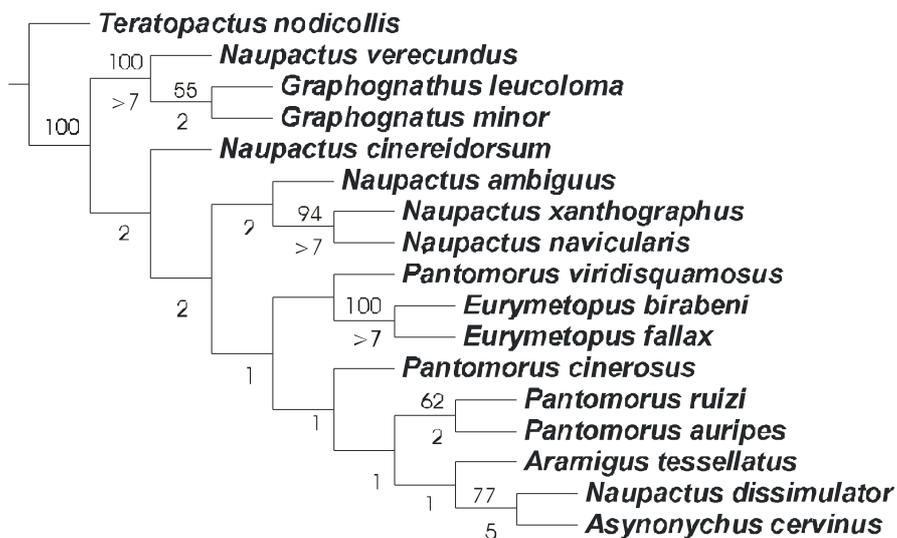
Constante de concavidad (K)	Valor de ajuste (fit) obtenido
K=1	<i>1 árbol de 171,4</i>
K=2	<i>1 árbol de 193,2</i>
K=3	<i>1 árbol de 206,4</i>
K=4	<i>1 árbol de 214,9</i>
K=5	<i>1 árbol de 220,7</i>
K=6	<i>1 árbol de 225,3</i>

5.2.3 Datos combinados.

5.2.3.a Análisis bajo pesos iguales.

El análisis simultáneo (Nixon & Carpenter, 1996), de la matriz morfológica y la matriz molecular, bajo pesos iguales, arrojó como resultado 1 árbol de 1328 pasos con un $Ci = 0,45$ y un $RI = 0.33$, el cual se muestra en la figura 8.

Figura 8. Cladograma obtenido del análisis bajo pesos iguales de la matriz combinada de datos moleculares y morfológicos. Los valores de Jackknife se indican sobre las ramas y los de Bremer support debajo de las mismas.



El análisis bajo pesos iguales de los datos combinados da como resultado un cladograma similar al obtenido a partir del análisis de los datos moleculares bajo una relación de costos $tv/ts \geq 4/1$. Puede observarse que los clados terminales obtenidos son los mismos, lo que diferencia a los árboles son las posiciones relativas de los distintos grupos entre sí, es decir las relaciones más basales, las cuales no presentan buenos valores de soporte en este análisis. En este caso, *N. cinereidorsum* no aparece como especie más basal y el clado de *Eurymetopus* no aparece en la punta de cladograma sino en el medio, en coincidencia con los datos morfológicos.

5.2.3.b *Análisis bajo pesos implicados.*

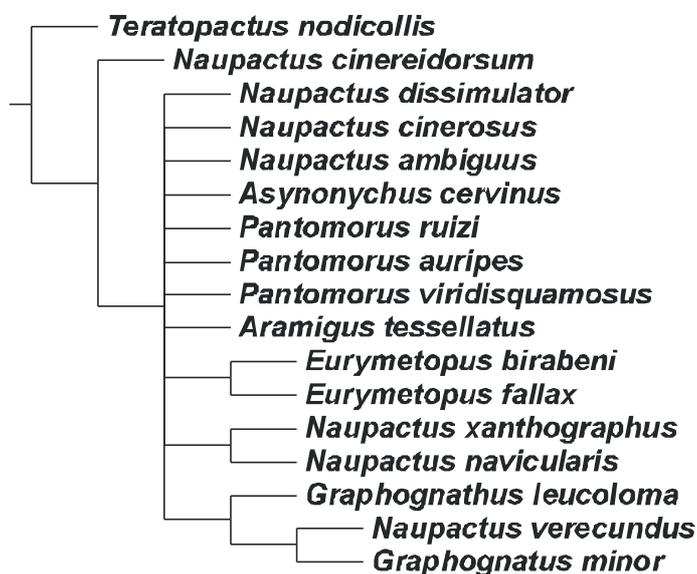
El análisis combinado de los datos moleculares y morfológicos bajo el método de pesos implicados, no generó soluciones estables, obteniéndose un árbol distinto para cada constante de concavidad. El consenso estricto de los 6 árboles se muestra en la figura 9.

Los valores de ajuste de cada árbol se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Valores de “fit” o ajuste de los distintos arboles obtenidos para cada constante de concavidad, en el análisis bajo pesos implicados de la matriz combinada.

Constante de concavidad (K)	Valor de ajuste (fit) obtenido
K=1	1 árbol de 1246,6
K=2	1 árbol de 1670,1
K=3	1 árbol de 1936,0
K=4	1 árbol de 2116,9
K=5	1 árbol de 2246,0
K=6	1 árbol de 2350,4

Figura 9. Consenso estricto de los 6 árboles obtenidos para cada constante de concavidad en el análisis bajo pesos implicados de la matriz molecular y morfológica combinadas.



El consenso es igual al obtenido en este mismo análisis a partir de los datos moleculares, excepto que el clado *N. verecundus* (*G. minor* – *G. leucoloma*) no mantiene una posición estable y pasa a formar parte de la politomía.

5.2.3.c *Análisis bajo costos de transformación diferenciales*

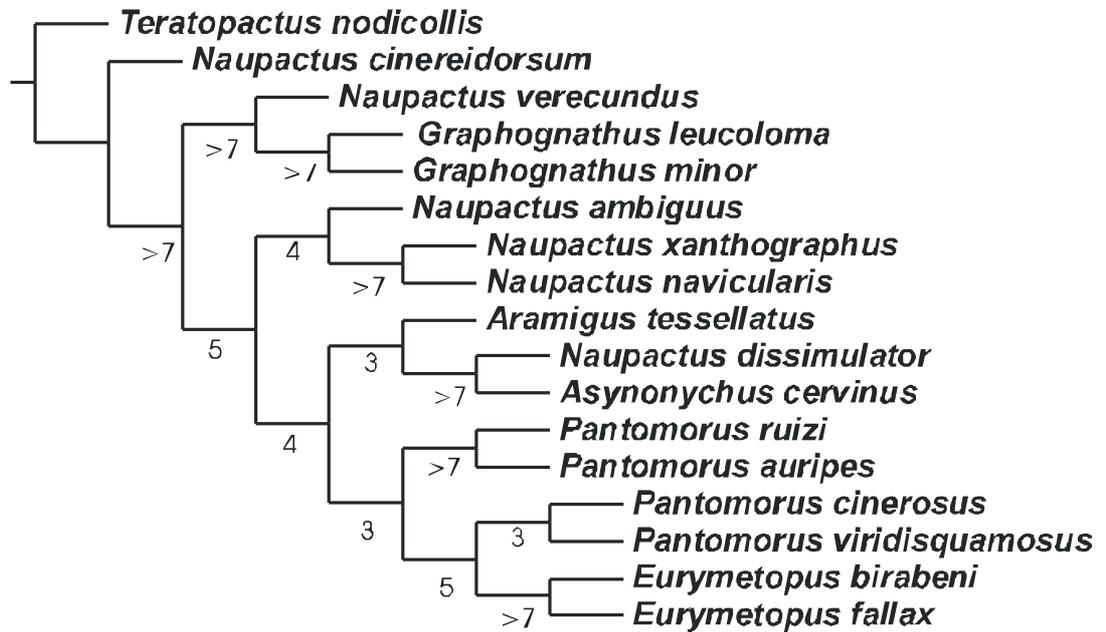
El análisis de la matriz combinada bajo costos diferenciales de la relación tv/ts da como resultado una misma topología cuando sólomente son tenidas en cuenta las transversiones ($tv/ts=1/0$) y cuando la relación de costos $tv/ts \geq 4/1$. Dichos resultado se muestran en la tabla 11. La topología obtenida presentó un $CI = 0.44$ y un $RI = 0.32$ y se muestra en la figura 10.

Tabla 11. Resultados del análisis de los datos combinados bajo costos diferenciales para transversiones y transiciones. Los árboles con la misma topología están indicados en itálica.

TV/TS	Árboles obtenidos
1/0	<i>1 árbol de 585 pasos</i>
2/1	2 árboles de 1921
4/1	<i>1 árbol de 3094 pasos</i>
8/1	<i>1 árbol de 5434 pasos</i>
10/1	<i>1 árbol de 6604 pasos</i>

Es importante destacar que el análisis de la matriz combinada teniendo en cuenta sólo las transversiones ($tv/ts = 1/0$) también converge a la misma solución; la cual se pierde al tener en cuenta las transiciones bajo un costo $tv/ts=2/1$, pero se recupera luego para costos de $tv/ts \geq 4/1$. Lo interesante es que este resultado está indicando que al combinar la información de las transversiones del ADN con los datos morfológicos (es decir la matriz combinada bajo costos de $tv/ts = 1/0$), se obtiene el mismo resultado que otorgando una relación de costos para transiciones y transversiones adecuada (en este caso $tv/ts \geq 4/1$).

Figura 10. Cladograma obtenido del análisis de datos combinados para relaciones de $tv/ts = 1/0$ y $\geq 4/1$. Los valores de Bremer support se indican bajo cada rama.



Esta topología es la misma que la obtenida bajo costos de $tv/ts \geq 4/1$ a partir de los datos moleculares (Fig. 5). Por lo tanto, para costos de $tv/ts \geq 4/1$ los resultados se estabilizan obteniéndose un único y mismo árbol tanto para los datos moleculares como combinados, y en consecuencia, consideramos a esta topología como la hipótesis mejor soportada por toda la evidencia disponible.

5.3 Análisis de congruencia entre los datos moleculares y morfológicos.

5.3.1 Congruencia taxonómica.

La congruencia taxonómica o topológica entre datos moleculares y morfológicos se refleja en los clados en común que genere el análisis de ambos conjuntos de datos.

Dos clados son recuperados siempre, tanto bajo pesos iguales como bajo pesos diferenciales, en el análisis de los datos morfológicos y en el de los moleculares. Uno de ellos está conformado por las dos especies de *Eurymetopus* (*E. fallax* y *E. birabeni*); el otro, es el clado integrado por dos especies típicas del género *Naupactus* (*N. xanthographus* y *N. navicularis*).

Un grupo que también se rescata en los consensos a partir de datos moleculares y morfológicos, tanto bajo pesos iguales o implicados, es el conformado por las especies *G. leucoloma*, *G. minor* y *N. verecundus*. Sin embargo, a partir de los datos moleculares, aparece *G. leucoloma* como especie hermana del clado formado por *G. minor* y *N. verecundus*; mientras que a partir de datos morfológicos, las especies hermanas son *G. minor* y *N. leucoloma*. El análisis simultáneo bajo pesos implicados mantiene el resultado de los datos moleculares, pero bajo pesos iguales y bajo diferentes costos de transformación para tv/ts se recupera la opción obtenida a partir de los datos morfológicos.

Otro caso para destacar es el de *N. cinereidorsum*. Esta especie aparece en todos los análisis como la más cercana al outgroup y especie hermana de todo el resto, excepto en el árbol obtenido en el análisis bajo pesos iguales de la matriz combinada y en el consenso de los árboles morfológicos obtenidos bajo pesos iguales, donde su posición queda sin resolver.

El bajo número de clados compartidos en el análisis bajo pesos iguales no se debe tanto al conflicto entre datos morfológicos y moleculares, sino más bien al conflicto interno de cada set de datos en el análisis bajo estas condiciones. En el análisis bajo pesos iguales, los datos morfológicos generaron 34 árboles dando como resultado un árbol consenso muy poco resuelto para ser comparado con el árbol molecular obtenido.

Si en el análisis morfológico bajo pesos iguales el carácter 15 fuera removido *a priori*, el número de árboles baja de 34 a 4, demostrando que los caracteres relacionados con la capacidad de volar producen mucha homoplasia y hacen más difícil encontrar una topología óptima. En concordancia, en el análisis bajo pesos implicados (que otorga menor peso a los caracteres más homoplásicos) se obtuvo un único árbol a

partir de los datos morfológicos que fue considerado como la hipótesis morfológica óptima.

Si bien el método de pesos implicados mejora el análisis de caracteres morfológicos (y evita el problema de caracteres convergentes como el 15, sin que sea necesario excluirlos *a priori* del análisis), el mismo método aplicado a los datos moleculares no generó una solución estable obteniéndose un árbol diferente para cada constante de concavidad evaluada en el método.

El número de grupos en común entre caracteres moleculares y morfológicos sí aumenta al comparar el árbol morfológico de pesos implicados con el árbol molecular obtenido para diferentes costos de tv/ts. (Ver fig. 11). En ambos árboles se recuperan además de los ya nombrados, el clado *P. ruizi* – *P. auripes* y *N. verecundus* como especie hermana del clado *G. minor* - *G. leucoloma*. El mayor grado de congruencia con los datos morfológicos del árbol molecular bajo tv/ts $\geq 4/1$ con respecto al del árbol molecular bajo pesos iguales es concordante con que este esquema de pesado haya sido elegido como solución óptima.

5.3.2 Congruencia de caracteres.

La incongruencia entre los caracteres moleculares y morfológicos, evaluada mediante el método de ILD de Farris *et al* (1994), resultó ser no significativa.

El número de pasos extra requerido por el análisis combinado en relación con la suma de los largos obtenidos de los análisis separados fue de 12. Al normalizarlo por el número de pasos del análisis combinado se obtuvo un valor de

$$\frac{1328 - (1242+74)}{1328} = 0,0090$$

1328

De las 999 particiones al azar, 811 dieron valores menores que el de 12 pasos extras obtenido para las matrices originales. El p de la prueba se obtuvo como

$$p = 1 - \frac{811}{999 + 1} = 0.1890$$

999 + 1

lo cual indica una probabilidad de 0.189 de que 0,0090 sea mayor que 0 debido al azar. Dado que esta probabilidad es mayor que una probabilidad de error de 0.05, se considera que las diferencias con 0 son no significativas. Por lo tanto la matriz molecular y morfológica no son significativamente incongruentes.

6. DISCUSION.

6.1 Distintos métodos de pesado.

Del análisis bajo pesos iguales de la matriz molecular y morfológica por separado es posible constatar que, si bien los árboles obtenidos a partir de datos moleculares muestran valores más bajos de *CI* y *RI* que los obtenidos a partir de datos morfológicos, lo cual indica una mayor cantidad de homoplasia, la matriz molecular genera un menor número de árboles más parsimoniosos permitiendo un mayor grado de resolución en los árboles consenso.

El método de parsimonia busca minimizar la homoplasia (mínimo conflicto entre los caracteres), sin embargo, árboles con considerable homoplasia (bajos valores de *CI* y *RI*) pueden alcanzar un mayor grado de resolución, como ocurrió en este trabajo con la matriz de datos moleculares.

Goloboff, (1991) define como “decisividad” de una matriz, al grado por el cual los datos permiten la elección entre los distintos árboles posibles. Es la mayor decisividad la necesaria para plantear una hipótesis evolutiva y no la baja cantidad de homoplasia. Por lo tanto, si bien la matriz morfológica analizada bajo pesos iguales presenta menores niveles de homoplasia (mayor *CI*) que la molecular, la decisividad de la matriz molecular es mayor, ya que genera un solo árbol más parsimoniosos en lugar de los 34 generados por la matriz morfológica.

Este método resultó efectivo para la matriz de datos morfológicos, generando un sólo árbol más parsimonioso, en vez de los 34 obtenidos bajo pesos iguales, pero no fue así para los datos moleculares, ya que a partir de ellos no se generó una solución estable para las distintas constantes de concavidad, lo cual se repitió en el análisis combinado.

El otro método de pesado diferencial aplicado a los caracteres moleculares (asignando diferentes costos de transformación a las transversiones y transiciones del ADN), sí generó soluciones estables. El hecho de haber obtenido una solución estable a partir de datos moleculares con un valor de $tv/ts \geq 4/1$ estaría indicando que se ha llegado a disminuir suficientemente o a compensar el efecto negativo de la saturación de las transiciones. Es importante destacar que bajo este esquema de pesado no se anuló la información que las transiciones aportan al análisis, ya que cuando se utilizó un esquema de pesado excluyéndolas del mismo ($tv/ts=1/0$) se obtuvieron soluciones irresueltas. Sin embargo al excluir las transiciones, pero en combinación con los datos

morfológicos (matriz combinada bajo $tv/ts=1/0$), se obtuvo la misma solución de los datos moleculares bajo $tv/ts \geq 4/1$, lo cual estaría indicando que agregar al análisis de transversiones los datos morfológicos es equivalente a agregarle las transiciones bajo un esquema de pesado $tv/ts \geq 4/1$. En ambos casos se obtiene la misma topología, que es también la generada por los datos combinados bajo $tv/ts \geq 4/1$. Esta topología (Figs. 5 y 10) es la más estable y mejor soportada por toda la evidencia, por lo tanto constituye la hipótesis filogenética propuesta en este trabajo.

6.2 La hipótesis filogenética propuesta y su congruencia con la morfología.

Si bien los datos morfológicos y moleculares se analizaron de manera separada, para evaluar la congruencia entre los mismos a través de los distintos tipos de análisis, en todos los casos se realizó el análisis combinado a fin de obtener la hipótesis con mayor poder explicativo (Nixon & Carpenter, 1996). El análisis combinado de datos moleculares y morfológicos, bajo un esquema de pesado diferencial adecuado ($tv/ts = 1/0 \geq 4/1$), generó la topología más estable (Fig. 10), la cual es coincidente con el análisis de datos moleculares bajo $tv/ts \geq 4/1$ (Fig. 5) y además muestra los clados recuperados en los demás análisis con mayores valores de soporte. Por lo tanto esta topología ha sido considerada la hipótesis filogenética de mayor poder explicativo y con máximo poder de resolución.

Dicha topología muestra que las especies tradicionalmente asignadas a *Naupactus* (*N. cinereidorsum*, *N. verecundus*, *N. xanthographus*, *N. navicularis*) se ubican más cercanas a la raíz, que el resto de las especies asignadas a *Pantomorus*, o a géneros afines; pero claramente se observa que el cladograma presenta clados anidados y *Pantomorus* y *Naupactus* no forman dos clados separados como se esperaría si fueran dos géneros monofiléticos. Esto corrobora la hipótesis propuesta por Lanteri & Morrone (1995) y Lanteri & Normark (1995), que postula a *Naupactus* como un género parafilético, que incluiría grupos de especies muy diferenciados, como los pertenecientes a los géneros sinónimos y/o afines del complejo *Pantomorus-Naupactus*.

En la figura 11 se muestra, a la derecha, la topología elegida como la hipótesis óptima (datos moleculares y combinados bajo $tv/ts \geq 4/1$) y se la compara con el mejor árbol de morfología, obtenido con el método de pesos implicados, sobre el cual se indica la optimización de los caracteres morfológicos.

En ambos árboles el taxón que aparece como más basal es *N. cinereidorsum*. Esta es una especie muy típica de *Naupactus*, con la base elitral bisinuada, que presenta

hombros y alas metatorácicas bien desarrolladas. En el resto de las especies la base elitral es levemente bisinuada o recta, y los hombros y alas metatorácicas (carácter 15) son reducidos o ausentes (Fig. 11 izquierda). Es claro que si estos caracteres se excluyeran del análisis morfológico *N. cinereidorsum* perderá su posición basal, pero es muy importante destacar que dicha posición se recupera en el árbol molecular (Fig. 11 derecha).

El clado que sigue a *N. cinereidorsum* en nivel de anidamiento, es una secuencia filogenética (*N. verecundus* (*G. leucoloma*-*G. minor*)) recuperada tanto a partir del árbol molecular como morfológico. *G. leucoloma* y *G. minor* (junto con la especie *G. peregrinus*) fueron tradicionalmente designadas como género *Graphognatus* por Buchanan (1939, 1942). *Graphognatus* a su vez, fue tratado por Wibmer & O'Brien (1986), como subgénero de *Pantomorus*. La designación como *Graphognathus* de *G. minor* y *G. leucoloma* debido a la reducción de los hombros elitrales y la falta de alas metatorácicas, acerca a ambas especies al género *Pantomorus*. Sin embargo, los demás caracteres morfológicos, incluyendo los de los genitales, que se utilizan como caracteres diagnósticos de *Naupactus*, por ejemplo las setas en el tubo del ovipositor, son los mismos que en las especies de *Naupactus* (Lanteri, 1981, Lanteri & O'Brien, 1990). Por esta razón, Lanteri & Marvaldi (1995) crean el "grupo de especies de *N. leucoloma*", reubicando las especies asignadas a *Graphognatus* dentro de *Naupactus*, y postulan que no hay justificación para separarlas de dicho género. La sinonimia entre *Naupactus* y *Graphognathus*, planteada por Lanteri y Marvaldi (1995) queda corroborada en el presente estudio y se observa que *G. minor* y *G. leucoloma* aparecen muy lejanas con respecto a las especies asignadas a *Pantomorus*, lo cual también descarta la hipótesis de Wibmer & O'Brien (1986) que trataba a *Graphognatus* como subgénero de *Pantomorus*. Según Lanteri y Marvaldi (1995) el "grupo de especies de *Naupactus leucoloma*" se encuentra integrado por *G. leucoloma*, *G. minor*, *G. peregrinus* (Buchanan), *N. albolateralis* Hustache y *N. tucumanensis* Hustache. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, *N. verecundus* formaría también parte del "grupo *leucoloma*", dado que su relación con el par *G. leucoloma* - *G. minor* es recuperada en todos los análisis con altos valores de soporte.

El clado que sigue en grados sucesivos desde la raíz, en ambos árboles, muestra dos especies típicas de *Naupactus*: *N. xanthographus* - *N. navicularis*. Esta relación está justificada morfológicamente por el pronoto levemente transversal y las corbículas de las tibias posteriores cerradas (caracteres 12 y 21), así como por numerosos caracteres

moleculares. En el árbol molecular (derecha), el clado (*N. xanthographus*-*N. navicularis*) se encuentra unido a *N. ambiguus*, mientras que en el árbol morfológico (izquierda) aparece el grupo *N. dissimulator* (*N. xanthographus*-*N. navicularis*). Este último se encuentra bien justificado por caracteres morfológicos, especialmente por la presencia de un par de tubérculos subapicales de los élitros (caracter 18). Sin embargo, en el árbol molecular *N. dissimulator* es la especie hermana de *Asynonychus cervinus* y esta relación concuerda con el hecho de que ambas especies comparten también similitudes morfológicas, tales como las características del revestimiento tegumentario y conformación de las antenas, élitros y espermateca (Lanteri, *et al.*, 1989).

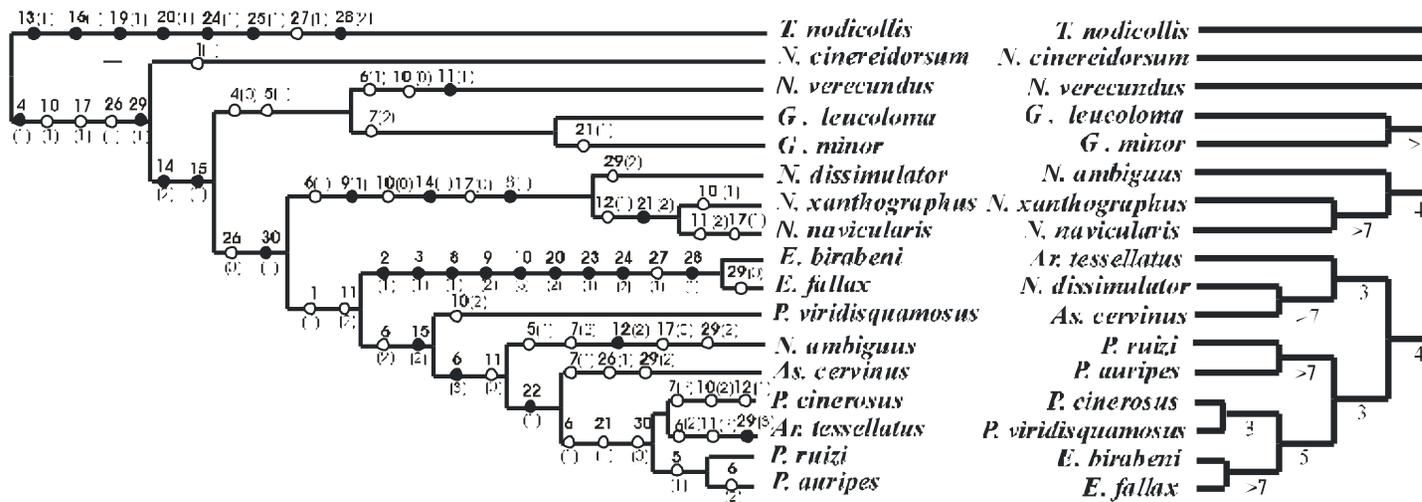
El clado *N. dissimulator* – *Asynonychus cervinus* se presenta a su vez, como el grupo hermano de *A. tessellatus*, siendo esta última una especie que no presentó una ubicación estable a lo largo de los diferentes análisis. La posición cercana entre los géneros *Aramigus* y *Asynonychus* es coincidente con la opinión de muchos especialistas que los consideraban sinónimos subjetivos (Buchanan, 1939; O'Brien & Wibmer, 1982; Wibmer & O'Brien, 1986). Si bien las últimas revisiones (Lanteri *et al.*, 1989) demostraron que los nombres *Asynonychus* y *Aramigus* son válidos y corresponden a taxa diferentes, ambos se encuentran cercanamente relacionados. Sin embargo, las 7 especies que conforman el género *Aramigus* se asocian también a *Pantomorus* por su tamaño y la ausencia de alas y hombros, mientras que las dos especies de *Asynonychus* (*A. cervinus* y *A. godmanni*) (Lanteri, 1986) se asocian a especies de *Naupactus* (Lanteri *et al.*, 1989). Esta ambigüedad se hizo evidente en el conflicto que presentaron las posiciones alternativas de *Aramigus* en los distintos análisis.

Figura 11. Congruencia taxonómica entre los resultados óptimos de datos morfológicos y de ADN.

Derecha: topología óptima para los datos moleculares obtenida a partir de los diferentes costos de transformación para $tv/ts \geq 4/1$. Esta topología es coincidente con la obtenida para los datos combinados con costos de transformación $tv/ts = 1/0$ y $\geq 4/1$, por lo cual fue elegida como la hipótesis que explica mejor toda la evidencia disponible.

Izquierda: topología óptima para la morfología obtenida a partir de las diferentes constantes del método de pesos implicados.

Sobre las ramas se muestra la optimización de los caracteres morfológicos utilizando la opción de tipo acelerado o ACCTRAN. La descripción de los mismos se encuentra en la tabla 13 del Apéndice.



La mayoría de las especies usualmente asignadas a *Pantomorus*, de acuerdo con caracteres morfológicos tales como la ausencia de hombros (carácter 15), aparecen en este estudio ubicadas en grados sucesivos entre las especies basales de *Naupactus* y el último taxón del cladograma o *Eurymetopus*. Este resultado ayuda a demostrar que el concepto tradicional de *Pantomorus* (Buchanan, 1939; Hustache, 1947; Wibmer & O'Brien, 1986) corresponde a un grupo artificial que en realidad incluye especies de *Aramigus*, *Asynonychus* y *Naupactus*. Por ejemplo, *Pantomorus sensu* Buchanan (1939) incluía especies aquí mencionadas como *Graphognathus leucoloma*, *G. minor*, *Asynonychus cervinus* y *Aramigus tessellatus*. En cambio, *Asynonychus sensu* Hustache (1947) incluía *P. viridisquamosus*, *N. ambiguus*, *A. cervinus* y *A. tessellatus*. La posición inestable de estas especies en los distintos análisis realizados es consistente con sus numerosos cambios taxonómicos y nomenclaturales, como lo demuestra el hecho de que *A. tessellatus* aparece relacionado al par *N. dissimulator* - *Asynonychus cervinus* en el árbol molecular, mientras que en el árbol morfológico es la especie hermana de *Pantomorus cinerosus*.

Más allá de esta condición artificial del género *Pantomorus*, dentro del mismo es posible identificar algunos clados o grupos naturales, por ejemplo el “grupo de especies de *auripes*” definido por Lanteri y colaboradores (1991). Este grupo incluye cinco especies (Lanteri, 1995a), dos de las cuales (*P. ruizi* y *P. auripes*) fueron analizadas en este trabajo y resultaron formando un clado bien soportado tanto por datos moleculares como morfológicos, aunque con diferentes posiciones en los distintos cladogramas. (Fig. 11). El denominado “grupo de especie de *P. auripes*” por Lanteri *et al.*, (1991) presenta como principales caracteres diagnósticos la disposición de las escamas y setas del revestimiento tegumentario; la morfología general del rostro, pronoto y élitros y la conformación de los genitales y el aparato bucal. Lanteri (1995a), propone a *P. ruizi* como la especie hermana del grupo de especies de *P. auripes* y decide considerarla parte del grupo, a pesar de las pequeñas diferencias señaladas por Morrone & Lanteri (1991). *Pantomorus ruizi* difiere de las especies del “grupo *auripes*” en el largo de los antenitos funiculares; los palpos labiales y el ovipositor son más largos y el conducto espermatecal no está engrosado en el extremo proximal (Lanteri, 1995a). Dado que *P. ruizi* presenta un alto grado de diferenciación en su morfología externa, su ubicación sistemática siempre fue muy discutida. (Morrone & Lanteri, 1991). Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran la hipótesis de Lanteri, (1995a) ubicándola como especie hermana de *P. auripes*.

Naupactus cinerosus y *P. viridisquamosus* se presentan formando un clado terminal, relacionado con el grupo de *P. auripes* - *P. ruizi*. La relación entre *P. viridisquamosus* y el grupo de especies de *P. auripes* fue puesta en evidencia por Lanteri y Loiácono (1990) en base a su similitud en el tamaño y la coloración, el pronoto subcilíndrico, las antenas medianamente largas y la región humeral de los élitros y alas metatorácicas no desarrolladas. A su vez *P. viridisquamosus* difiere del grupo de *P. auripes* principalmente por presentar setas elitrales cortas, anchas y recumbentes, y porque los lados del pronoto y los élitros están más curvados (Lanteri, 1995a).

Eurymetopus es un género de fácil reconocimiento taxonómico, cuyas especies aparecieron formando un clado fuertemente soportado en todos los análisis moleculares y morfológicos. Los principales caracteres que lo identifican morfológicamente se relacionan con los genitales de la hembra (caracteres 2-3, 8-10, 20, 23-24, 27-28). La monofilia de las especies asignadas a *Eurymetopus* en el análisis de la matriz morfológica era un resultado esperado, debido a que las mismas presentan buenos caracteres morfológicos diagnósticos, que las diferencian fácilmente del resto de las especies del complejo. Lo interesante es que estas especies se mantuvieron como grupo monofilético, con altos valores de soporte, también en los análisis realizados a partir de datos moleculares sóloamente, inclusive a pesar de que la secuencia de ADN de *Eurymetopus fallax* contenía una gran cantidad de datos faltantes. La posición del clado de *Eurymetopus* no es estable en los diferentes análisis, apareciendo en el extremo terminal en el árbol molecular (Fig. 11 derecha), y en el árbol morfológico, en el medio entre las especies asignadas a *Naupactus* (basales) y a *Pantomorus*, *Aramigus* y *Asynonychus* (terminales) (Fig. 11 izquierda). Lo que sí queda corroborado es que *Eurymetopus* (al igual que *Aramigus*) constituyen linajes que, aunque muy diferenciados, forman parte del complejo *Pantomorus-Naupactus*.

Como conclusión del presente análisis cladístico puede decirse que, se rechaza la hipótesis de monofiletismo de los géneros *Pantomorus* y *Naupactus*, y se corrobora que *Pantomorus* sería un grupo polifilético basado en caracteres morfológicos convergentes (Lanteri & O'Brien, 1990; Lanteri & Normark, 1995), cuyas especies, junto a las asignadas a los géneros considerados afines, sinónimos o subgéneros como *Aramigus*, *Eurymetopus*, *Asynonychus* y *Graphognatus*, formarían linajes diferenciados dentro del grupo parafilético *Naupactus* (Lanteri & Morrone, 1995).

Una solución posible para el problema del complejo *Pantomorus* y *Naupactus*, sería considerar el complejo entero como un solo género, transfiriendo las especies de América del Sur de *Pantomorus* a *Naupactus*, en concordancia a lo propuesto por Morrone (1999). Esta transferencia sería una solución parcial ya que, según Morrone (1999), las 35 especies de *Pantomorus* de América Central y México mantendrían su nombre. Sin embargo, estas especies también podrían representar linajes derivados de las especies mexicanas de *Naupactus*, así como también el género de América del Norte, *Phacepholis* Horn (Lanteri, 1990). Para una solución definitiva, sería conveniente incluir en el análisis cladístico ejemplares de *Phacepholis*, de las especies de *Pantomorus* de México y América Central y también otros géneros de América del Sur como *Atrichonotus* Buchanan.

Con respecto a los géneros de América del Sur del complejo analizados en este estudio, no sólo *Asynonychus* y *Graphognathus* deberían considerarse sinónimos, para mantener a *Naupactus* monofilético, sino también *Aramigus* y *Eurymetopus*.

Por el momento, la hipótesis filogenética propuesta en este análisis, permite un reconocimiento preliminar de los grupos naturales dentro del complejo y avanza hacia una clasificación natural para el complejo *Pantomorus*-*Naupactus*.

6.4 Evolución del modo de reproducción partenogenético en el grupo.

El reconocimiento de grupos monofiléticos dentro del complejo *Pantomorus-Naupactus* es significativa, no sólo desde el punto de vista taxonómico, sino también para propósitos teóricos relacionados con el estudio de la partenogénesis animal. A este respecto, el análisis cladístico contribuye a poner a prueba la hipótesis sobre el origen de la partenogénesis dentro de un grupo dado (Lanteri, 1995a; Lanteri & Normak, 1995; Normak & Lanteri, 1998).

La partenogénesis apomíptica es muy común entre los gorgojos de rostro corto y su ocurrencia ha sido confirmada en más de 60 especies de numerosas tribus (Tomiuk & Loeschcke, 1992; Saura *et al.*, 1993; Lanteri & Normark, 1995; Normark, 1996b). Este tipo de reproducción ha sido comprobada por estudios citogenéticos en tres de las especies mencionadas en este estudio: *Graphognathus leucoloma*, *Aramigus tessellatus* y *Asynonychus cervinus* (Normark, 1996b; Hardwick *et al.*, 1997; Mander *et al.*, 2003), pero además se sospecha la existencia de este tipo de reproducción en otras especies y/o linajes del complejo *Pantomorus-Naupactus* (Lanteri & Normark, 1995).

Todos los insectos partenogenéticos de Naupactini son ápteros y sus músculos de vuelo se encuentran reducidos o ausentes, así como también sus hombros elitrales y alas metatorácicas. Esta condición, que parecería ser una pre-adaptación para la adquisición del modo de reproducción partenogenético, está presente en todas las especies de América del Sur asignadas a *Pantomorus*, así como en las especies pertenecientes a *Aramigus*, *Asynonychus*, *Eurymetopus* y *Graphognathus*. Entre las especies estudiadas en el análisis filogenético aquí presentado, sólo la especie que resultó más basal, *N. cinereidorsum*, posee la capacidad completa de volar; el resto son parcial o totalmente no voladoras. Además sólo en las poblaciones de las especies más típicas de *Naupactus*: *N. cinereidorsum*, *N. verecundus*, *N. xanthographus* y *N. dissimulator*, los machos están bien representados. En el resto de las especies muestreadas, los machos son escasos o inexistentes, lo cual sugiere una alteración en el tipo de reproducción sexual.

Para propósitos teóricos es importante identificar si los linajes partenogenéticos tienen taxa hermanos de reproducción sexual o si se trata de clados enteramente compuestos por especies partenogenéticas (Lanteri & Normark, 1995; Normark & Lanteri, 1998). Dentro del complejo *Pantomorus - Naupactus*, las especies que han sido corroboradas como partenogenéticas podrían representar linajes derivados de diferentes especies que presenten partenogénesis geográfica (Vandel, 1928). Las especies con

partenogénesis geográfica presentarían poblaciones bisexuales en las áreas de origen de la distribución, como los bosques subtropicales de América del Sur, y linajes partenogenéticos en áreas recientemente colonizadas, como las praderas de América del Sur y de otros continentes en los que estas especies han sido introducidas y quedaron establecidas. Por ejemplo, dentro del “grupo de especies de *N. leucoloma*”, la especie basal *N. verecundus* es bisexual, *N. leucoloma* exhibe partenogénesis geográfica y *N. minor* es probablemente estrictamente partenogenética. (Lanteri & Marvaldi, 1995; Lanteri & Normark, 1995).

En el clado *N. dissimulator* - *Asynonychus cervinus*, recuperado sólo a partir de los datos moleculares, *N. dissimulator* es bisexual y *Asynonychus cervinus* muestra partenogénesis geográfica (Lanteri, 1993). Las poblaciones sexuales de ambas especies hermanas son parcialmente simpátricas en los bosques subtropicales de Argentina y Brasil, pero los linajes partenogenéticos de *A. cervinus* han sido introducidos y se han establecido en numerosos países muy lejanos a su área de distribución original (Lanteri & Normark, 1995; Lanteri *et al.*, 2002 a; Mander *et al.*, 2003).

Aramigus tessellatus forma parte de un complejo de especies unisexuadas y con linajes partenogenéticos muy diferenciados, la mayoría de los cuales son triploides (Normark, 1996 a b; Normark & Lanteri 1998). Dentro del género *Aramigus* existen especies de reproducción sexual como *A. globoculus* Lanteri y *A. intermedius* Lanteri, así como especies partenogenéticas como *A. conirostris* (Hustache), la cual es pentaploide (Lanteri & Díaz, 1994; Normark & Lanteri, 1996, 1998). En el árbol obtenido a partir de los datos moleculares *A. tessellatus* aparece en el mismo clado que *Asynonychus cervinus*, pero en el árbol morfológico se presenta en el extremo del cladograma, cercana a otras especies en las que no se han muestreado machos hasta el momento (*P. cinerosus*, *P. ruizi* y *P. auripes*).

Es interesante notar que la bacteria *Wolbachia pipientis* transmitida por herencia citoplasmática materna ha sido hallada en *A. tessellatus*, por Warren *et al* (1995) y más recientemente en *A. cervinus* (Rodríguez *et al.*, 2004). Este parásito induce alteraciones reproductivas en una variedad de artrópodos, tales como desarrollo partenogenético en los huéspedes infectados, conversión de machos infectados en hembras funcionales e incompatibilidad citoplasmática (Huigens *et al.*, 2000). La distribución de *Wolbachia* en el complejo *Pantomorus* – *Naupactus* y los efectos de este parásito en el sistema reproductivo de sus especies son los estudios próximos a seguir; por esta razón, la

identificación de grupos monofiléticos dentro de un grupo de especies de tanta importancia representa un importante paso en futuros estudios de biología evolutiva.

7. CONCLUSIONES.

El análisis cladístico presentado en esta tesis, basado en datos moleculares y morfológicos, rechaza la hipótesis de monofiletismo *Pantomorus* y *Naupactus*, y corrobora la propuesta de Lanteri & Morrone (1995) y Lanteri & Normark (1995), que propone a *Pantomorus* como un grupo artificial basado en caracteres convergentes como la reducción de los hombros y alas metatorácicas. En concordancia con dichos autores, se postula a los grupos de especies pertenecientes a *Pantomorus* y a géneros sinónimos o afines al complejo (ej. *Asynonychus*, *Graphognathus*, *Aramigus*, *Eurymetopus*) como linajes derivados dentro del gran grupo parafilético *Naupactus*.

Para definir a *Naupactus* monofilético debería ampliarse el análisis a las especies de *Pantomorus* de América Central y géneros de América del norte como *Phacepholis*.

Las implicancias taxonómicas particulares del análisis presentado son:

- La especie típica de *Naupactus*, *N. cinereidorsum*, aparece más basal que otras especies “menos típicas” del género, y estas últimas, a su vez, más basales que las asignadas a *Pantomorus* y/o a los subgéneros o géneros afines al complejo.
- La decisión de considerar a *G. leucoloma* y *G. minor* como pertenecientes a un grupo dentro de *Naupactus* (Lanteri & Marvaldi, 1995), está bien soportada por datos moleculares y morfológicos. Los resultados sugieren que *N. verecundus* también podría ser incluida en el "grupo de especies de *leucoloma*" descrito por dichas autoras.
- La relación de especies hermanas de *N. xanthographus* y *N. navicularis* sugiere que ambas forman parte de un grupo dentro de *Naupactus*. De acuerdo a la morfología, *N. dissimulator* podría pertenecer a este grupo, pero los datos moleculares la ubican más cercana a *Asynonychus cervinus*, debido probablemente a la herencia materna.
- La posición de *Naupactus ambiguus*, aunque inestable, es claramente más cercana a *Naupactus*, que a las especies clasificadas como *Pantomorus* o *Asynonychus*.

- *Aramigus tessellatus* no presenta una posición estable. En el árbol molecular óptimo, se relaciona con el par *Naupactus dissimulator* - *Asynonychus cervinus*, en cambio, en el mejor árbol morfológico aparece como especie hermana de *Pantomorus cinerosus*.
- El clado *N. dissimulator* - *Asynonychus cervinus* es recuperado por los datos moleculares, lo cual contribuye a justificar la sinonimia de *Asynonychus* y *Naupactus*. En el árbol morfológico óptimo, *P. viridisquamosus*, *N. ambiguus* y *A. cervinus* están dispuestos en grados sucesivos en el cladograma, en concordancia con el concepto de *Asynonychus sensu* Hustache (1947).
- El "grupo de especies de *auripes*" (Lanteri, 1995) es recuperado por los datos moleculares, dado que *P. auripes* - *P. ruizi*, son miembros de este grupo y presentan una relación estable.
- Las especies de *Eurymetopus* conforman un clado muy bien soportado, en la zona apical del cladograma. Este género se presenta monofilético tanto a partir de datos morfológicos (Lanteri & Morrone, 1995) como moleculares.

8. APÉNDICE

Tabla 12. Matriz de datos morfológica confeccionada por Lanteri. Los datos faltantes se muestran como “?”.

<i>Teratopactus nodicollis</i>
00000 00000 00100 10011 00011 01200
<i>Aramigus tessellatus</i>
10010 20001 20022 01000 11000 00030
<i>Asynonychus cervinus</i>
10010 31001 00022 01000 01000 10021
<i>Eurymetopus birabeni</i>
11110 00123 20021 01002 00120 0111?
<i>Eurymetopus fallax</i>
11110 00123 20021 01002 00120 0110?
<i>Graphognathus leucoloma</i>
00001 01001 00021 01000 00000 10010
<i>Graphognathus minor</i>
00001 01001 00021 01000 10000 1001?
<i>Naupactus ambiguus</i>
10011 32001 02022 00000 00000 00001
<i>Naupactus cinereidorsum</i>
10010 00001 00000 01000 00000 10010
<i>Nsupactus dissimulator</i>
00010 10010 00011 00100 00000 00021
<i>Naupactus navicularis</i>
00010 10010 21011 01100 20000 0001?
<i>Naupactus verecundus</i>
00001 10000 10021 01000 00000 10010
<i>Naupactus xanthographus</i>
00010 10011 01011 00100 20000 00011
<i>Pantomorus auripes</i>
10011 20001 00022 01000 11000 0001?
<i>Pantomorus cinerosus</i>
10010 12002 01022 01000 11000 0001?
<i>Pantomorus ruizi</i>
10011 10001 00022 01000 11000 0001?
<i>Pantomorus viridisquamosus</i>
10010 20002 20022 01000 00000 00011

Tabla 13. Lista de caracteres morfológicos del complejo *Pantomorus-Naupactus* analizados por Lanteri.

Caracteres del revestimiento tegumentario

- 1) Setas del rostro dirigidas hacia el surco medio (0), dirigidas hacia delante (1)
- 2) Antenas setosas (0), escamosas (1)
- 3) Revestimiento elitral con escamas contiguas y setas (0), con escamas imbricadas y setas escamiformes (1)
- 4) Escamas cubriendo toda la superficie elitral (0), con bandas desnudas de escamas en sutura y flancos (1)
- 5) Setas elitrales recumbentes a suberectas, cortas a medianas (0), erectas, largas (1)
- 6) Escutelo escamoso, blanco (0), setoso (1), glabro (2), inconspicuo (3)

Morfología externa

- 7) Ojos convexos (0), levemente convexos (1), muy convexos (2)
- 8) Rostro con quillas laterales (0), sin quillas laterales (1)
- 9) Escapo de grosor mediano, excede el margen posterior del ojo (0), angosto, excede ampliamente el margen posterior del ojo (1), muy grueso, no llega al margen posterior del ojo (2)
- 10) Antenito 2°, 2 a 3 veces la longitud del 1° (0), poco más largo que el 1° (1), igual al 1° (2), poco más corto que el 1° (3)
- 11) Pronoto moderadamente rugoso (0), fuertemente tuberculado (1), liso (2)
- 12) Pronoto transversal (0), levemente transversal (1), fuertemente transversal (2)
- 13) Pronoto sin tubérculos laterales (0), con tubérculos laterales (1)
- 14) Base elitral bisinuada (0), levemente bisinuada (1), recta (1)
- 15) Hombros muy amplios (0), reducidos (1), ausentes (2)
- 16) Hombros sin tubérculos (0), con tubérculos (1)
- 17) Intervalos elitrales levemente convexos (0), planos (1)
- 18) Tubérculos subapicales de los élitros ausente (0), presentes (1)
- 19) Coxas anteriores contiguas (0), separadas (1)
- 20) Denticulos en la superficie interna de las tibias, solo en el primer par (0), en los tres pares de tibias (1), ausentes en los tres pares de tibias (2)
- 21) Corbículas de las tibias posteriores abiertas (0), levemente cerradas (1), cerradas (2)
- 22) Peines de las tibias posteriores de igual largo o el apical levemente más largo (0), peine dorsal más largo (1)

23) Tarsitos 1° y 2° muy elongados (0), tarsito 1° poco elongado, tarsito 2° transversal (1)

Genitales femeninos

24) Esternito VIII de la hembra subromboidal (0), suboval (1), subpentagonal (2)

25) Ovipositor con dos *baculi* ventrales (0), con dos pares de *baculi*, ventrales y dorsales (1)

26) Hileras de setas laterales a los *baculi* del ovipositor ausentes (0), presentes (1)

27) Estilos presentes (0), ausentes (1)

28) Hemiesternitos levemente esclerotizados, valviformes (0), esclerotizados, en forma de uña corta (1), fuertemente esclerotizados, en forma de uña larga (2)

29) Nodus de la espermoteca reducido (0), cónico (1), tubular largo, sin prominencia posterior (2), tubular largo, con prominencia posterior (3)

Genitales masculinos

30) Apice del aedeagus en punta (0), redondeado, con dos puntas laterales (1)

Figura 12. Caracteres de los genitales en el complejo *Pantomorus-Naupactus*.

a-c: esternito VIII de la hembra. a) oval; b) subromboidal; c) subpentagonal.
d-g: ovipositor de la hembra. d) con líneas de setas a cada lado de los *baculi* del ovipositor, hemiesternitos moderadamente esclerotizados, estilo presente; e) con línea de setas ausente; f) hemiesternitos muy esclerotizados, cortos, estilo ausente; g) hemiesternitos largos.
h-k: espermateca de la hembra. h) con nódulos vestigiales; i) con nódulos cónicos; j) con nódulos tubulares, sin prominencia basal; k) con nódulos tubulares, con prominencia basal.
l-m: Aedeagus del macho. l) con ápice en punta; m) con ápice redondeado con dos puntas laterales.
Escala: 1mm (figs. a-g, l-m); 0.25 mm (figs. h-i); 0.50 mm (figs. j-k).

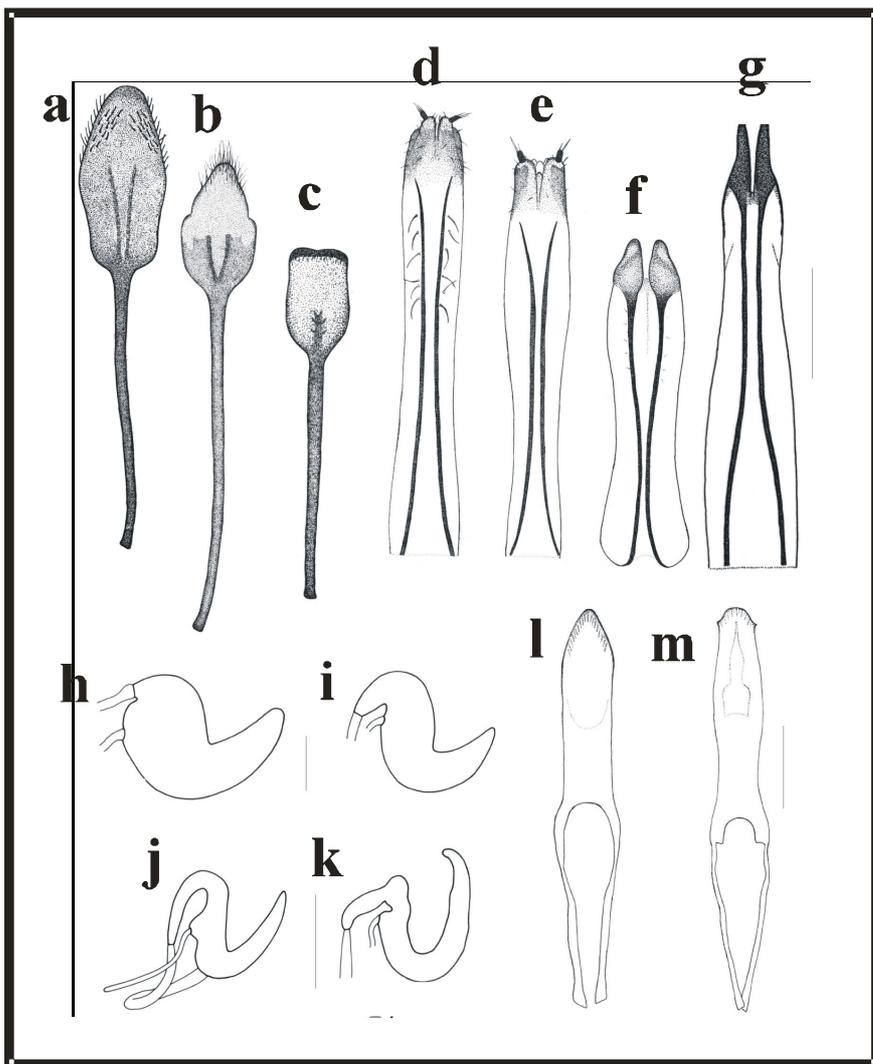
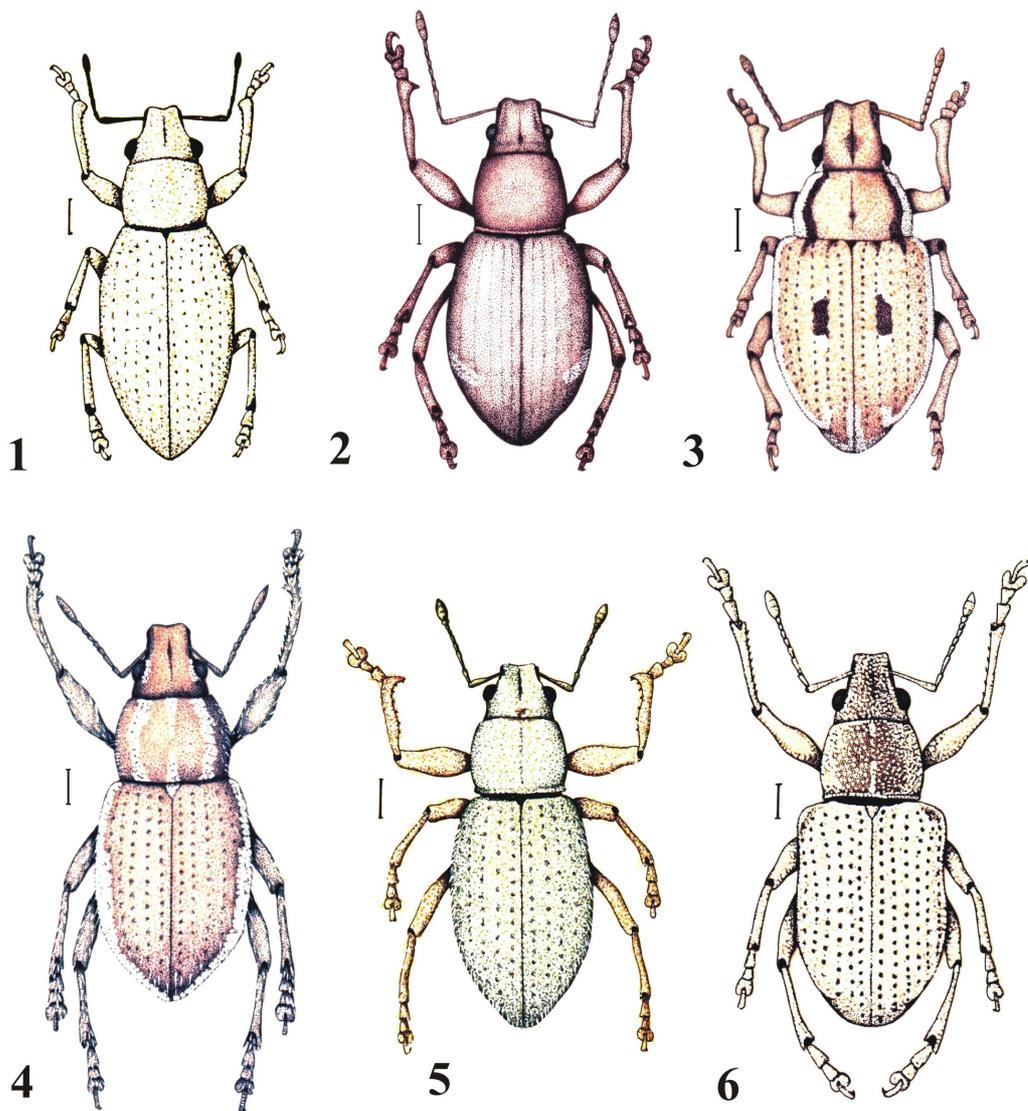


Fig.13: Láminas de la especies representativas de la diversidad dentro del complejo *Pantomorus* –*Naupactus*.
1, *Aramigus tessellatus* (Say); 2, *Asynonychus cervinus* (Boheman); 3, *Eurymetopus fallax* Boheman; 4, *Graphognathus leucoloma* (Boheman); 5, *Pantomorus auripes* Hustache; 6, *Naupactus cinereidorsum* Hustache.
Escalas: 1 mm.



CAPÍTULO IV

Estudio filogeográfico en el picudo del algodonero *Anthonomus grandis*

1. ANTECEDENTES.

1.1 Datos biológicos y daños al cultivo del algodón.

El picudo del algodouero *Anthonomus grandis* Boheman pertenece a la subfamilia Curculioninae, con alrededor de 6200 especies de distribución cosmopolita, cuyas larvas endofíticas se desarrollan generalmente en flores y frutos de numerosas familias de dicotiledóneas. Dentro de Curculioninae la tribu de mayor importancia económica es Anthonomini, pues incluye varias especies plaga, entre ellas *Anthonomus grandis*, que es uno de los insectos más destructivos del mundo.

La invasión del cinturón algodouero de los Estados Unidos de América, por parte del picudo, entre fines del siglo XIX hasta principios del siglo XX, ocasionó daños tan importantes, que determinó que la mayoría de los productores del área abandonaran dicho cultivo.

En Brasil, las pérdidas en la producción algodouera, en años posteriores a la detección del picudo fueron del 90% en el nordeste y del 60% en los estados de Paraná y Sao Paulo. En consecuencia Brasil pasó de ser un país exportador a ser el segundo país importador de algodón. Asimismo, la producción se encareció en un 30% debido a la necesidad de emplear insecticidas y otros métodos de control, y más de un millón de trabajadores de las cosechas de algodón quedaron sin trabajo. En Paraguay, la situación es similar, y dicho país produce actualmente un 50% menos de algodón, de lo que producía antes de la irrupción del picudo.

En la Argentina, el área algodouera está comprendida entre los 23 y los 31 grados de latitud sur, y los 54 y 69 grados de longitud oeste. El cultivo se realiza en una franja que se extiende desde la provincia de Santiago del Estero, en el noroeste, hasta la provincia de Misiones en el noreste. De la totalidad de las exportaciones algodoueras, aproximadamente el 42% se encuentra en la provincia de Chaco, el 18% en Formosa, el 15% en Santiago del Estero, el 11% en Corrientes y el 7 % en Santa Fe.

Los programas de monitoreo y control implementados por el SENASA, desde que el picudo del algodouero fuera detectado por primera vez en el país, están destinados principalmente a impedir su ingreso desde áreas algodoueras de países vecinos (Paraguay y Brasil), sin embargo la plaga ya se ha extendido ampliamente en la Argentina, aunque la densidad de sus poblaciones no es tan elevada. De acuerdo con los

registros conocidos, habría dos vías principales de ingreso desde países vecinos, una desde Brasil hacia Misiones (provincia donde fuera detectado por primera vez en 1993) y otra desde Paraguay hacia Formosa (el primer registro para dicha provincia se produjo en 1994). Los picudos colectados en zonas algodoneras de Corrientes en el año 2000, procederían principalmente de Misiones, y los encontrados recientemente en Chaco, provendrían de Formosa.

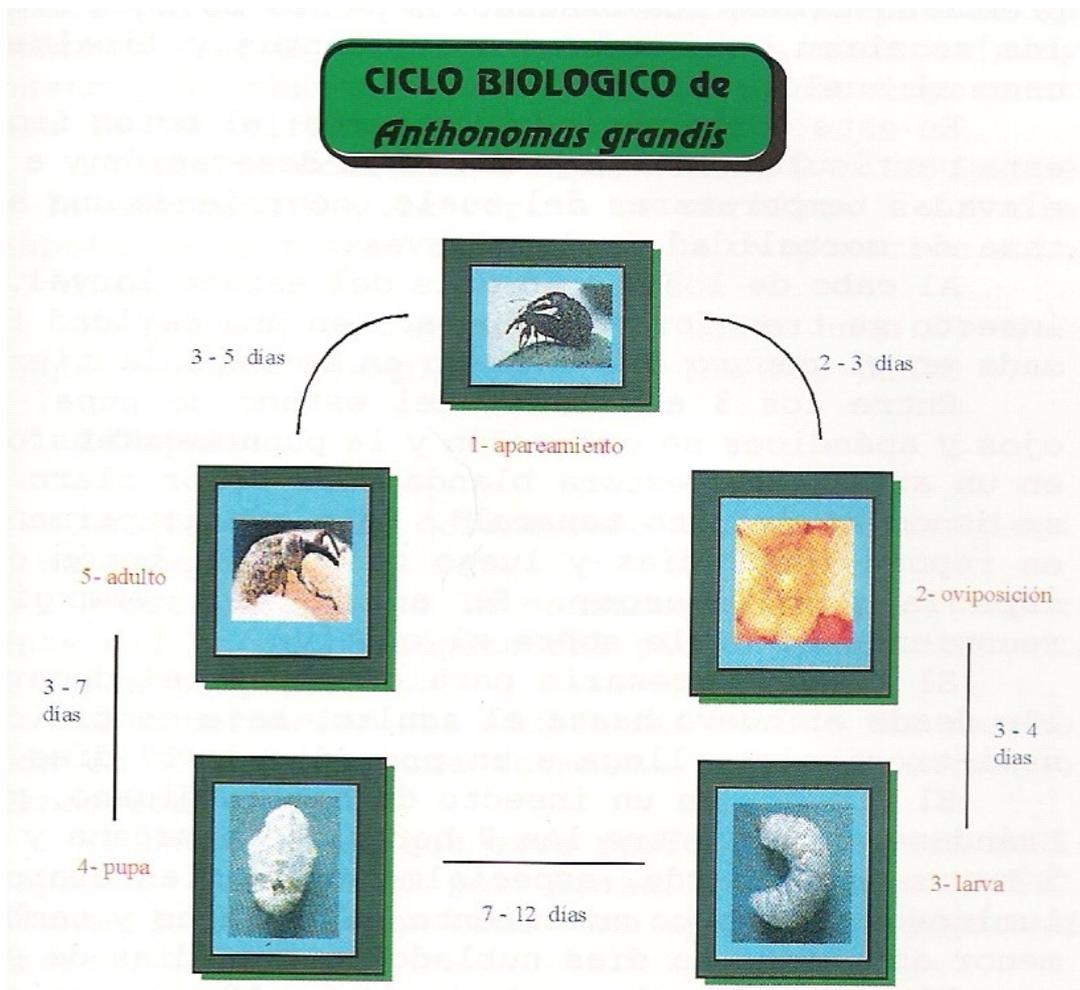
La alta tasa reproductiva del picudo del algodonero, su capacidad de desarrollarse en distintos huéspedes y su adaptación a diferentes condiciones ambientales (aun aquéllas muy extremas), sumada a su gran capacidad de vuelo, explican la gran dispersión de la especie a lo largo de todo el continente americano y su peligrosidad como plaga. Las hembras del picudo del algodonero depositan un huevo por postura, en los botones florales o capullos del algodonero y de otras malváceas. Eligen el área de oviposición con sus antenas y hacen un orificio con sus mandíbulas para introducirlo. Se ha calculado un promedio de seis posturas por día, de modo que al cabo de su vida una hembra puede oviponer hasta 300 huevos (promedio de 100-120). La eclosión de los huevos ocurre generalmente 2-3 días después de la oviposición. Una vez emergidas, las larvas comienzan a alimentarse del polen, otras partes de las flores, las semillas y/o las fibras, destruyéndolas. Dado que su desarrollo es endofítico, se encuentran muy protegidas de los depredadores. La temperatura y la humedad tienen una gran incidencia en la supervivencia de las larvas, por ejemplo a 30 °C el desarrollo desde huevo hasta la emergencia del adulto tarda 17-18 días, si la temperatura es de 21°C, en cambio, ese tiempo se alarga a 36 días. Se han registrado tres estadios larvales y 7-10 generaciones anuales (Ahmad & Burke, 1972).

Los machos producen una feromona de agregación que atrae tanto a hembras como machos, los cuales vuelan hacia los lugares donde hay mayor concentración de feromonas (por esta razón una de las formas de monitorear las poblaciones de la plaga es precisamente mediante trampas de feromonas). Para sintetizar y liberar la feromona los machos necesitan alimentarse, de modo que cuanto más se alimenten, mayor será su capacidad de atracción. Es precisamente el algodonero, la planta cuya concentración de terpenos y terpenoides le permite sintetizar al picudo una mayor cantidad de feromona. Las hembras también necesitan alimentarse antes de copular, y minutos después de la cópula comienzan a oviponer.

En zonas templado-frías los picudos hibernan en la hojarasca, malezas, capullos caídos u otros lugares de refugio. Entonces cesa la gametogénesis, decrece el contenido

de agua y la frecuencia respiratoria, y aumenta el contenido de grasas. Al menos 5-10% logra sobrevivir en estas condiciones hasta que las condiciones de temperatura y humedad sean más favorables. Algunos autores mencionan también una diapausa estival, que les permitiría sobrevivir en ambientes extremadamente áridos como el desierto de Sonora en México y suroeste de EE.UU, y en el nordeste brasileño. Esos picudos oviponen casi exclusivamente en capullos y no en flores, comportamiento que ha sido mencionado como una adaptación a ambiente áridos.

Figura 14. Ciclo de vida de *A. grandis*. Fuente: Manessi, 1997



1.2 Diferenciación intraespecífica.

Anthonomus grandis es una especie muy variable desde el punto de vista morfológico, y cabe suponer que, de tener menor vagilidad o no mediar flujo génico entre poblaciones distantes gracias al cultivo del algodón, probablemente se hallaría diferenciada al menos a nivel de subespecies. Burke (1968) estudió la diferenciación morfológica del picudo y llegó a la conclusión de que existirían tres formas, más o menos bien diferenciadas en América del Norte y México, entre las cuales se observan también muchos estados intermedios. Según este autor, la forma “mexicana”, a la que pertenecen los picudos del sur de México, sería la más ancestral, y a partir de ella habrían derivado la forma “thurberia” del noroeste de México y suroeste de EE.UU, asociada principalmente con *Gossypium thurberi* y la forma del “sudeste de EE.UU.” que fue la que produjo la gran infestación del cinturón algodonero del sudeste de EE.UU a fines del siglo XIX y principios del siglo XX (Fig. 14).

En lo que respecta a su diferenciación genética, el picudo ha sido muy poco estudiado, especialmente si se toma en cuenta su importancia como plaga en América. Roehrdanz & North (1992) y Roehrdanz (2001) realizaron análisis de fragmentos de restricción de ADN mitocondrial en poblaciones de EE.UU y México, con el objeto de caracterizar genéticamente las formas del picudo descritas por Burke, habiendo obtenido resultados preliminares promisorios. Dichos autores plantearon que el análisis de la diferenciación del ADN mitocondrial podría contribuir además, a poner a prueba hipótesis alternativas con respecto al cambio de huéspedes desde plantas nativas al algodón cultivado:

- Si el cambio de huéspedes desde malváceas silvestres hacia el algodón fuera muy reciente o si se hubiera dado en una pequeña población, por efecto de cuello de botella, cabría esperar una escasa diferenciación a nivel de los haplotipos mitocondriales.
- Si los picudos que se desarrollan habitualmente en plantas silvestres pudieran realizar un cambio de huésped, hacia el algodón, cada vez que les fuera posible, entonces cabría encontrar una considerable diferenciación en las poblaciones de estos picudos.

1.3 Lugar de origen de la especie.

Los primeros estudios realizados en el picudo del algodónero (Townsend, 1895; Coad, 1915) ya proponían a México como lugar de origen de *A. grandis*. Posteriormente, Burke (1968) y Burke *et al.* (1986) apoyaron esta hipótesis, que fue corroborada recientemente por Jones & Burke (1997) y Jones (2001) desde un punto de vista filogenético. Estos autores proponen que *A. grandis* se encuentra relacionada con un grupo de cuatro especies de anthonominos que se distribuyen en México y América Central. Las cuatro especies, que constituyen el denominado “grupo de *A. grandis*” (Jones & Burke, 1997), además del picudo, son: *A. hunteri* Burke & Cate, *A. mallyi* Jones & Burke, *A. palmeri* Jones & Burke y *A. townsendi* Jones & Burke. A diferencia de estas cuatro especies, el picudo del algodónero presenta un área de distribución mucho más extensa y también un rango de plantas huéspedes más amplio dentro de las malváceas, preferentemente de la tribu Gossypieae.

La información relativa a las relaciones filogenéticas inferidas para el “grupo de *A. grandis*” y a sus plantas huéspedes, ha sido fundamental para plantear una hipótesis sobre el origen y posterior dispersión del picudo. Fryxell & Lukefahr (1967) y Burke *et al.* (1986) propusieron a *Hampea* como huésped originario del picudo. Jones & Burke (1997) consideraron a *Hampea* como huésped ancestral de todo el “grupo de *A. grandis*”, dado que todas las especies del grupo se desarrollan en plantas de este género, distribuido desde el sur de México hasta Colombia (Jones *et al.*, 1997). Las especies del “grupo de *A. grandis*” son monófagas para especies de *Hampea* (tabla 14), y *A. grandis* constituye una excepción pues puede emplear como hospederos alternativos a malváceas de otros géneros además de *Hampea*, como *Gossypium*, *Cienfuegossia*, *Hibiscus* y *Thespesia* (Fryxell & Lukefahr, 1967; Burke & Cate, 1979, Burke *et al.*, 1986; Jones & Burke, 1997) (tabla 15).

Dado que la mayor diversidad específica del huésped ancestral *Hampea* se hallaría en las selvas del sur de México, Burke *et al.* (1986) plantearon que esta zona de tierras bajas y húmedas, y clima cálido, sería el lugar de origen del picudo (Fig. 15).

Tabla 14: Especies afines a *A. grandis*, distribución y plantas hospederas, según Jones & Burke (1997).

Especie	Distribución	Hospedero
<i>Anthonomus hunteri</i>	México (Yucatán)	<i>Hampea trilobata</i>
<i>Anthonomus mallyi</i>	Costa Rica	<i>Hampea appendiculata</i>
<i>Anthonomus pameri</i>	México (Chiapas)	<i>Hampea longipes</i> <i>Hampea montebellensis</i>
<i>Anthonomus townsendi</i>	México (Chiapas)	<i>Hampea mexicana</i> <i>Hampea latifolia</i>

Tabla 15: Distribución geográfica actual y hospederas de *Anthonomus grandis*.

- México, principalmente en las selvas del sur del país, y a lo largo de ambas costas, Pacífica y del Golfo de México. Se registró por primera vez en 1843. Se halla en cultivos de algodón y en numerosas malváceas silvestres de los géneros *Gossypium*, *Cienfuegosia*, *Hampea*, *Thespesia* e *Hibiscus*.
- EE.UU, a lo largo de todos los estados del sur del país, desde California (costa oeste) hasta Florida (costa este). Se registró por primera vez en 1892 en Texas, donde se halla asociada con algodón y con *Cienfuegosia drumondii*. En Arizona y Nuevo México se asocia con *Gossypium hirsutum* y con *Gossypium thurberi*, esta última especie, endémica del área y de Sonora en México. Fue erradicado de la mayor parte del cinturón algodonnero (desde Texas hacia el este), donde no existen huéspedes nativos, pero persiste desde Texas hacia California.
- Países de América Central, incluyendo islas del Caribe como Cuba, Haití y República Dominicana. Se registró en el área a partir de 1932. En Cuba se asocia exclusivamente con *Gossypium barbadense*.
- Países de América del Sur. Venezuela (1949), Colombia (1951), Brasil (1983), Paraguay (1991), Argentina (1993 Misiones, 1994 Formosa, 2000 Corrientes, 2003 Chaco), Bolivia (1997). En Venezuela y Paraguay se la encontró asociada con especies de *Cienfuegosia*, además de *Gossypium hirsutum*.

1.4 La dispersión hacia el norte.

La dispersión hacia el norte del picudo (Fig. 15), supone un cambio o ampliación en el rango de huéspedes desde *Hampea* a *Gossypium* (género al cual pertenece el algodón cultivado, *G. hirsutum*, y otros algodones silvestres como *G. barbadense*) y *Cienfuegosia*. Dichos géneros presentan varias especies y razas que se distribuyen a lo largo de las costas del Pacífico y del Golfo de México, evitando el área central del Altiplano Mexicano, y se habrían diferenciado principalmente durante el Pleistoceno (Fryxell, 1965). Tomando en cuenta estas estimaciones, Burke *et al.* (1986) plantearon que la dispersión del picudo desde el sur de México hacia el norte habría

ocurrido durante dicho período geológico, lentamente y junto con sus plantas huéspedes, pertenecientes a la tribu Gossypieae.

Las diferencias morfológicas entre los picudo de México y los de EE.UU (“forma thurberia” en el oeste y “forma del sudeste” en el este) refuerzan la idea de que la migración inicial hacia el norte habría ocurrido tempranamente en la historia de la especie, y que este evento precedió, seguramente, el cultivo extensivo del algodón por parte del hombre. El picudo habría avanzado hacia el norte en la medida que sus huéspedes silvestres se lo permitieron: *Gossypium hirsutum*, *G. thurberi* en el desierto de Sonora, y *Cienfuegosia drumondii* en Texas (Burke & Clark, 1976), y también en la medida que las poblaciones colonizadoras fueron capaces de adaptarse a nuevas condiciones ambientales, muy diferentes a las originales (clima mucho más frío y seco).

Burke *et al* (1986) también plantearon que, a diferencia de la dispersión natural hacia el norte, la colonización del cinturón algodónero de EE.UU, desde Texas hasta la costa Atlántica, ocurrió en forma muy rápida (desde 1898 hasta 1916). Resulta evidente que esta invasión fue posible gracias al cultivo extensivo del algodón en el área, sin embargo, dichos autores también destacaron la importancia de la selección natural operando durante mucho tiempo sobre las poblaciones de Arizona y Texas (probablemente desde fines del Pleistoceno) y favoreciendo la adaptación de los picudos a las nuevas condiciones ambientales. Sin la presencia de picudos pre-adaptados a dichas condiciones, tampoco hubiera sido posible la invasión del cinturón algodónero de Estados Unidos.

Fig. 15: Mapa de distribución de especies tetraploides de *Gossypium* en América Central.
Fuente: Adaptación de la figura 54 de Fryxell. The Natural History of Cotton Tribe. (1979).

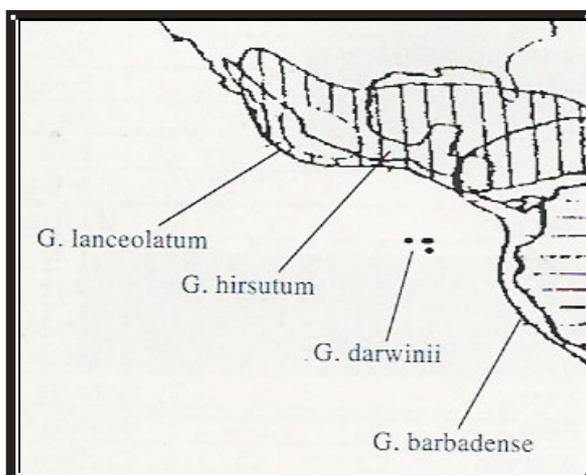
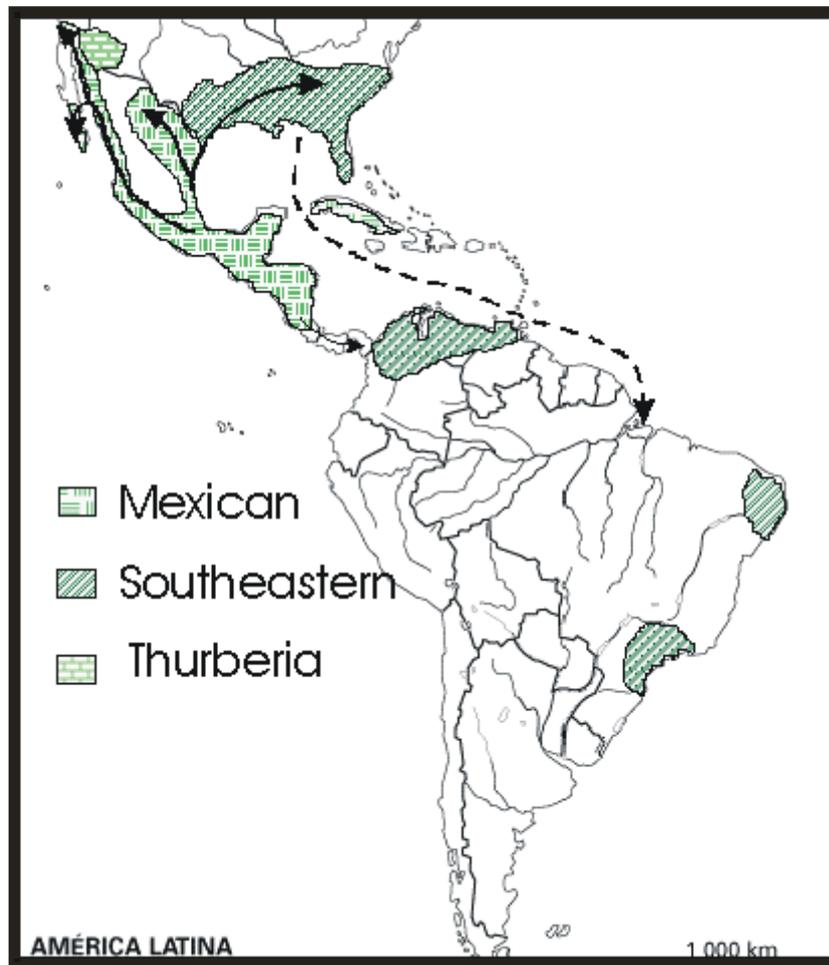


Figura 16. Mapa mostrando la distribución de morfotipos de picudo y su dispersión en América.
Fuente: Burke *et al.* (1986).



1.5 Hipótesis sobre el origen de las poblaciones en América del Sur.

Hasta el presente se han propuesto dos hipótesis alternativas sobre la presencia de *Anthonomus grandis* en América del Sur: la primera de ellas es la de Burke *et al.* (1986) que postula que el picudo habría ingresado a América del Sur debido al comercio del algodón, y se basa en los registros disponibles de la irrupción de la plaga en las áreas de cultivo y en la similitud morfológica de los picudos de Brasil con los picudos del sudeste de EE.UU. La hipótesis alternativa es la que plantearon Scataglini *et al.* (2000) y propone que el picudo se habría dispersado naturalmente desde México hacia América del Sur, en tiempos geológicos, y que su irrupción como plaga se habría producido principalmente debido al cultivo extensivo del algodón. Esta hipótesis no descarta que también se hayan producido introducciones de picudos desde otros países como EE.UU, debido al comercio del algodón.

1.5.1 Hipótesis de sucesivas introducciones debido al comercio del algodón.

La presencia del picudo del algodonero en América del Sur ha sido asociada con importaciones ligadas al cultivo del algodón, desde mediados del siglo XX. Los datos disponibles indican que el picudo se registró por primera vez en Venezuela en 1949. Estos picudos se asemejaban a la “forma del sudeste”, por lo que se consideró que hubo una introducción accidental desde EE.UU. Sin embargo es interesante notar que pese a esa supuesta introducción reciente, los picudos de Venezuela ya se habían adaptado a un hospedero nativo, *Cienfuegosia affinis*.

En Colombia *A. grandis* se halló sobre algodón cultivado en 1951. Esta infestación pudo haber provenido de Venezuela, sin embargo los picudos de Colombia y Venezuela difieren entre sí morfológicamente, y por lo tanto, representarían introducciones separadas.

Treinta y cuatro años después de la primera infestación en Venezuela (1949) la plaga aun no había irrumpido en Brasil. Esto recién ocurrió en 1983, cuando se reportó el picudo en febrero en el estado de Sao Pablo (sudeste) y en julio en el estado de Pernambuco (nordeste). En 1984 ya se había extendido al estado de Rio Grande do Norte y en 1985 al estado de Ceará. Entonces ya habían sido infestadas 800.000 hectáreas de cultivo y las pérdidas causadas por el insecto se hallaban cerca del 75%.

En abril de 1991 el picudo se detectó en Paraguay y para febrero de 1993 ya se hallaba a 200 km del límite fronterizo con la Argentina. Debido al ingreso del picudo al Paraguay se intensificaron en nuestro país las actividades de monitoreo del insecto a

través del diseño de una red nacional de trampas de feromonas que abarcó las provincias de Misiones, Chaco, Corrientes, Santa Fé y Formosa con especial énfasis en Misiones. Entre enero y agosto de 1993, el “Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal” del SENASA puso en operación una red de 2.660 trampas en las provincias antes mencionadas, en áreas específicas de vigilancia, como zonas de frontera y áreas de cultivo.

El primer ejemplar de la plaga fue coleccionado en abril de 1993, en trampas de feromonas ubicadas en el Parque Nacional Iguazú, provincia de Misiones. En junio de 1994, *A. grandis* se detectó por primera vez en lotes de algodón, en el noreste de la provincia de Formosa, departamentos de Pilcomayo y Pilagás. A partir de entonces las capturas producidas en la denominada zona roja de la provincia de Formosa fueron constantes, debido probablemente al ingreso desde zonas aldoneras de Paraguay.

A fines de abril de 1996, se produjeron las primeras capturas de picudo en la provincia de Corrientes, cerca del límite con Misiones, en un área sin cultivo de algodón. Finalmente, en el 2003, se registró la captura de los primeros picudos en Margarita Belén, Chaco, que es la provincia de mayor producción aldonera de la Argentina (cerca del 80%), lo cual cambió nuevamente la frontera de avance de la plaga.

1.5.2 Hipótesis de la dispersión natural desde México hasta América del Sur.

Esta hipótesis surgió a partir de los resultados obtenidos por Scataglini *et al* (2000), en un estudio de poblaciones de América del Sur de picudos mediante la técnicas de RAPD (Polimorfismos del ADN amplificados al azar).

Los autores caracterizaron poblaciones de Argentina, Brasil y Paraguay y las compararon con posibles poblaciones fuente de México y EE.UU, analizando un promedio de diez individuos por muestra. Las muestras estudiadas pertenecieron a tres localidades de Argentina: Puerto Península (Pe), Parque Iguazú (Ig) y Laguna Naick-Neck (Nn); dos localidades de Brasil: Carajá (Cj) y Londrina (Lo); dos de Paraguay: Caacupé (Ca) e Yjhovy (Yj); una de México: Tecomán (Me), y una muestra proveniente de un laboratorio de Estados Unidos del estado de Mississippi (USA). La mayoría de las muestras correspondieron a áreas aldoneras, excepto la del Parque Nacional Iguazú (área protegida de vegetación nativa) y Pto. Península. Se utilizó también una muestra de *A. vestitus*, proveniente de Ecuador (Ec), como referencia interespecífica.

En el árbol de Neighbour-Joining obtenido a partir del estudio de RAPD, las

poblaciones de Argentina, Puerto Península y Laguna Naick Neck, son intermedias entre las de Brasil (Londrina y Carajá) y Paraguay (Caacupé e Yjhovvy), excepto la población de Puerto Iguazú, genéticamente más cercana a la de México que a las restantes poblaciones de América del Sur (Fig. 17).

En concordancia, las poblaciones de Tecomán (México) y del Parque Nacional Iguazú (Argentina) presentaron la mayor diferenciación genética, medida como porcentaje de loci polimórficos y niveles de heterocigosis (tabla 16), lo cual es una característica típica de poblaciones antiguas (Brussard, 1984).

Al analizar posteriormente muestras del Parque Nacional Iguazú que le fueran enviadas por la Dra. Lanteri, el Dr. H Burke advirtió que algunos de estos especímenes presentaban características intermedias entre la “forma mexicana” y la “forma del sudeste”.

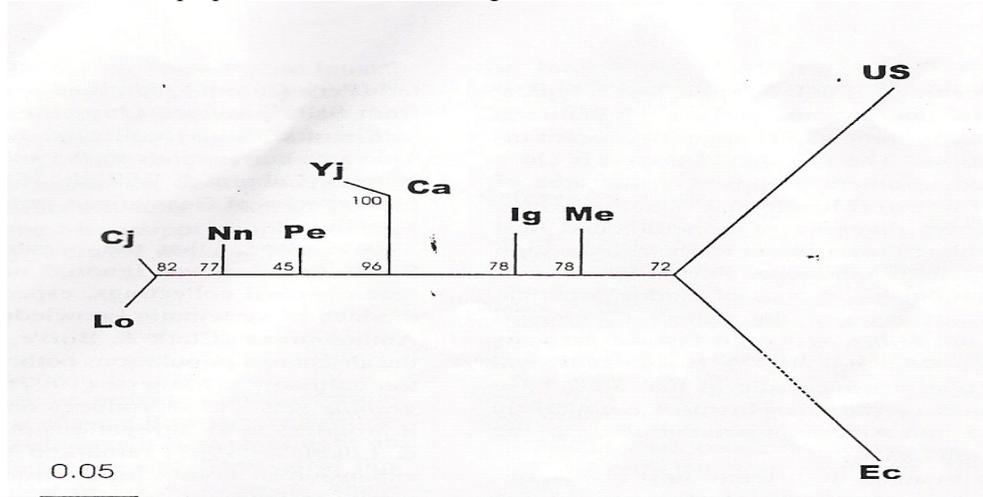
Estos resultados llevaron a suponer a los autores que al menos algunos linajes de picudos habrían llegado a América del Sur en tiempos geológicos, previos al cultivo extensivo del algodón, hipótesis que fue puesta a prueba en el actual trabajo de tesis.

Tabla 16: Diferenciación genética obtenida en el estudio de RAPD de Scataglini *et al* 2000.

H: Heterocigocis media por *locus* RAPD. P: Porcentaje de *loci* polimórficos.

	Ig. (Arg.)	Pe. (Arg.)	Nn. (Arg.)	Ca. (Par.)	Yj. (Par.)	Lo. (Bras.)	Cj. (Bras.)	Me (Mex.)	US (USA)	A. vest
H	0.173± 0.030	0.151± 0.032	0.169± 0.034	0.181± 0.034	0.134± 0.033	0.117± 0.033	0.118± 0.032	0.238± 0.035	0.229± 0.035	0.230± 0.036
P	60.98	41.46	43.90	51.22	31.71	26.83	29.27	60.98	53.66	58.54

Fig. 17: Arbol de Neighbour-joining obtenido en el estudio de RAPDs de Scataglini *et al* (2000). El largo de las ramas es proporcional a las distancias genéticas. En los nodos se indican los valores de bootstrap.



2. HIPÓTESIS PUESTA A PRUEBA.

- Ocurrencia de poblaciones de *Anthonomus grandis* ancestrales en América del Sur.

3. OBJETIVOS PARTICULARES.

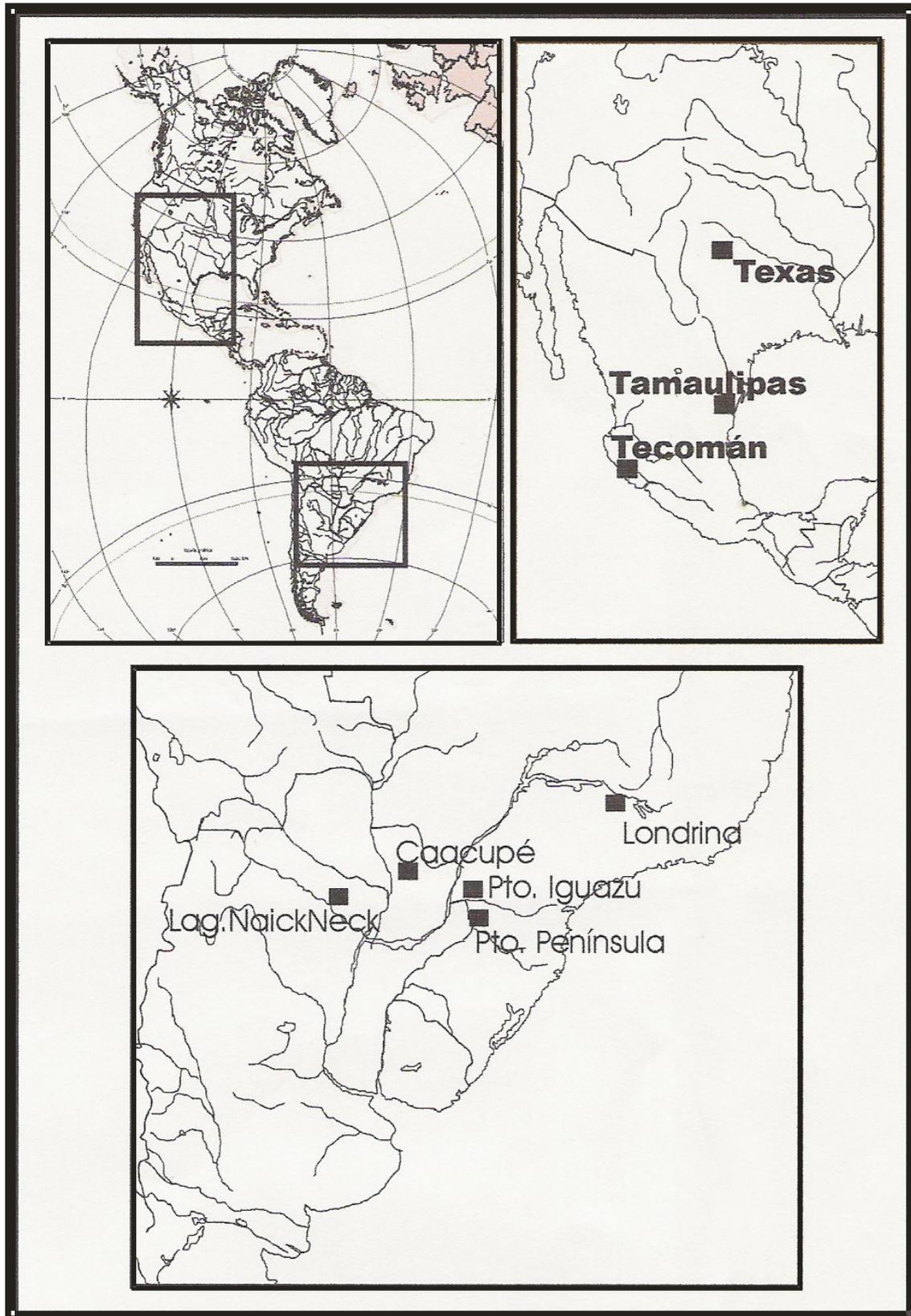
- Analizar la diferenciación de las secuencias de los genes mitocondriales de Citocromo Oxidasa I (COI) y Citocromo Oxidasa II (COII).
- Establecer las relaciones genealógicas entre los haplotipos hallados, utilizándolos como unidades terminales de un análisis de parsimonia.
- Realizar un análisis filogeográfico teniendo en cuenta la diferenciación, genealogía, frecuencias y distribución geográfica de los haplotipos.

4. ESTRATEGIA Y MATERIALES DE ESTUDIO.

- Se llevó a cabo un análisis filogeográfico a partir de secuencias de ADN correspondientes a fragmentos de los genes mitocondriales de Citocromo Oxidasa I y Citocromo Oxidasa II, analizando un promedio de 9 y 6 individuos por población respectivamente.
- Se estudiaron 7 poblaciones: tres pertenecientes a Argentina (Laguna Naick-Neck, Pto. Península y Parque Iguazú); una a Paraguay (Caacupé); una a Brasil (Londrina); una a Estados Unidos (Lubbock, del estado de Texas) y una perteneciente a México: Tecomán, en el caso del gen COI y Tamaulipas, en el caso del gen COII. La mayor parte de las muestras fueron tomadas sobre campos de algodón, excepto las correspondientes a Pto. Península y Parque Nacional Iguazú, que provienen de zonas de vegetación nativa.

- Como outgroup se utilizó un ejemplar de la especie *A. vestitus* Boheman, conocida como “picudo peruano del algodón”, distribuida en Ecuador y norte de Perú (Burke & Cross, 1966).

Fig 18. Mapa de localidades muestreadas en el estudio filogeográfico con secuencias de ADN. Se muestran en detalle las ubicaciones para América del Norte y del Sur.



5. RESULTADOS.

5.1 Diferenciación en las secuencias de genes mitocondriales.

5.1.1 En el gen de COI.

Se obtuvo un total de 61 secuencias de 279 pares de bases correspondientes a las posiciones 296 a 574 del gen de COI. Las mismas presentaron 136 sitios variables, los cuales generaron 23 haplotipos diferentes (ver el punto 5.2.1 diversidad haplotídica). Las diferentes secuencias obtenidas fueron depositadas en el Genbank bajo los números de acceso AY266610-31.

Las proporciones totales de nucleótidos obtenidas en las secuencias fueron: 33,7% de T, 19,2% de C, 32,2% de A y 14,9% de G. Las frecuencias nucleotídicas mostraron un alto predominio de bases A y T, alcanzando un promedio de 69,9 % entre individuos; en concordancia con los porcentajes registrados en otros Curculionidae (Langor & Sperling, 1997). Este predominio fue mucho más notorio para las terceras posiciones (85,6%) que para las primeras (59,3%) o las segundas posiciones (52,7%).

La divergencia intraespecífica total (sin incluir a *A. vestitus*) fue de 0.053+/- 0.005, siendo la población de Iguazú la que mostró el mayor nivel de diferenciación nucleotídica (tabla 17). Si bien los valores de divergencia nucleotídica obtenidos son más altos que los esperados en estudios intraspecíficos en insectos (Howland & Hewitt, 1995; Langor & Sperling, 1997; Lunt *et al*, 1996), muchos trabajos realizados en especies de gorgojos a partir de ADN mitocondrial han reportado también altos valores de divergencia. Normark (1996) encontró más de 9% de divergencia intraespecífica en un estudio de seis morfotipos pertenecientes a una especie de gorgojos de rostro corto de América del Sur. El gorgojo de América del Norte *Pinus strobi* conforma un complejo de cuatro linajes o especies extremadamente similares morfológicamente, que presentan una muy alta divergencia en su ADN mitocondrial: 16% de divergencia a partir de datos de RFLP y 7,5% a partir de datos de secuencias. La especie de gorgojo de la alfalfa euroasiática *Hipera postica* (Gyllenhall) ha mostrado más de 5% de divergencia en su ADN mitocondrial (Jones, 2001).

Además, los valores de divergencia intraespecífica reportados en este estudio se hallan muy por debajo del nivel de divergencia promedio de los haplotipos de *A. grandis*, con respecto a los de *A. vestitus*.

Las secuencias aminoacídicas correspondientes al gen COI no presentaron codones “stop” ni cambios en el marco de lectura con respecto a las secuencias

propuestas por Lunt *et al.* (1996) para otros insectos. La distribución de las zonas conservadas y variables del gen también coinciden con las obtenidas por los citados autores (Fig. 19 arriba), excepto en las dos columnas identificadas con flechas en que, en vez de los aminoácidos conservados esperados (D y S), se observan cambios a ac. glutámico (E) y alanina (A) respectivamente, en la mayor parte de las secuencias, excepto en algunos individuos correspondientes a la población del Parque Iguazú.

5.1.2 En el gen de COII.

Se obtuvo un total de 42 secuencias de 327 pares de bases correspondientes a las posiciones 256 a 582 del gen de COII. Las mismas presentaron 171 sitios variables, los cuales generaron 15 haplotipos diferentes (ver el punto 5.2.2 diversidad haplotídica). Las diferentes secuencias fueron depositadas en el Genbank bajo los números de acceso AY267841-56.

Las frecuencias nucleotídicas totales fueron: 31,8% de T, 18,2 % de C, 34,5 % de A y 14,6 % de G; mostrando un alto porcentaje de A y T promediando un 67,3% entre individuos. El predominio de A y T fue mayor para las terceras posiciones (79,8%) que para las primeras (56,9) y segundas posiciones (65%).

La divergencia intraespecífica total resultante fue de 0.087+/-0.008, siendo alta en comparación con las de otros insectos (Liu & Beckenbach, 1992) al igual que la obtenida para COI. La mayor divergencia nucleotídica correspondió a las poblaciones de Iguazú (Arg.) y Tamaulipas (México) (ver tabla 17). Los valores de divergencia para Tamaulipas podrían estar sobrestimados debido al pequeño tamaño de la muestra mexicana, sin embargo, son congruentes con la diferenciación morfológica presentada por esta muestra con respecto a las demás poblaciones.

Las secuencias aminoacídicas correspondientes al gen COII no presentaron codones “stop” ni cambios en el marco de lectura con respecto a las secuencias propuestas por Liu & Beckenbach (1992) para otros insectos. La distribución de las zonas conservadas y variables del gen también coinciden con las obtenidas por dichos autores (Fig. 19, abajo).

Fig. 19: Traducción a aminoácidos de las secuencias obtenidas para COI (arriba) y COII (abajo). El sombreado corresponde a los sitios de aminoácidos conservados en distintos géneros y familias de insectos, propuestos por Lunt *et al.* (1996) y Liu & Beckenbach (1992) para COI y COII respectivamente. Las flechas indican cambios en sitios de aminoácidos conservados.

A. v.	MSFWLLPPS	TLLILSSIIGKAGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHLAGISS	ILGANNFIST	ILN	KPLGMKLD	QMLFVWAVKITA
A1	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGTGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Tx1	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGACTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Tx2	MSFWLLPPS	TLLILMSIVSRGAGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Te1	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGAGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Te2	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGAGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Te3	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGAGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Te4	MSFWLLPPS	TLLILMSIVSRGAGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Te5	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGAGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Te6	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGAGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Te7	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGAGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Lo1	MSFWLLPPS	TLLILSMIVSRGTGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Lo2	MSFWLLPPS	TLLILSMIVSRGTGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Lo3	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGTGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Pe1	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGTGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Ig1	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGAGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Ig2	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGTGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Ig3	MSFWLLPPS	SLIFSSMVEGVTGTGTWTVYPP	AAAIA	REGASVDLAI	FSLHLAGVSS	ILGAVNFIT	VIN	RSYGMTD	QMLFVWAVKITA
Ig4	MSFWLLPPS	TLLILSSMVDNAGTGTGTWTVYPP	LAGAIA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGAVNFIT	TAIN	XXXSMND	QMLFVWAVKITA
Ig5	MSFWLLPPS	TLLILSSMVDNAGTGTGTWTVYPP	LAGAIA	REGASVDLAI	FSLHLAGVSS	ILGAVNFIT	TAIN	RSESMTD	QMLFVWAVKITA
Ig6	MSFWLLPPS	TLLILSSIVSRGTGTGTWTVYPP	SSNLA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Ig7	MSFWLLPPS	TLLILSSMIVSRGTGTGTWTVYPP	SSNSA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA
Ig8	MSFWLLPPS	TLLILSSMIVSRGTGTGTWTVYPP	SSNMA	REGASVDLAI	FSLHMAGISS	ILGANNFIST	VLN	KPSSSSLE	QMLFVWAVKITA



A. v.	MLDENLNFMI	SIRTI	GHQWYNS	YEYS	YKMLE	FDSYMI	PTNBLNKWF	RVL	DVDRN	RMTV	FFNCQIR	MIVT	SADV	IHS	WTI	PAL	GVKI	DGT	P	GLN	QTN	FNLN	RIGL	FLF				
A2	ILDETSNPLI	TIKALG	HQWYNS	YEYS	YKMLE	FDSYMI	PTNLEKWNF	RLL	DVDRN	RLIV	FFNCQIR	MIVT	SADV	IHS	WAV	PSL	GVKI	DGT	P	GLN	QTN	FNLN	CTGL	FLY				
Tx3	ILDETSNPLI	TIKALG	HQWYNS	YEYS	YKMLE	FDSYMI	PTNLEKWNF	RLL	DVDRN	RLIV	FFNCQIR	MIVT	SADV	IHS	WAV	PSL	GVKI	DGT	P	GLN	QTN	FNLN	CTGL	FLY				
Tx4	ILDETSNPLI	TIKALG	HQWYNS	YEYS	YKMLE	FDSYMI	PTNLEKWNF	RLL	DVDRN	RLIV	FFNCQIR	MIVT	SADV	IHS	WAV	PSL	GVKI	DGT	P	GLN	QTN	FNLN	CTGL	FLY				
Te1	MVEESWEAMY	TIKIFGR	HQWYNS	YEYS	DFVDIE	FDTYMK	FNSDLSE	NSE	RLL	EVDNR	RTVL	EMNT	EV	VLTS	AS	DVLS	WAV	PAL	GI	KVD	DAT	P	GLN	QST	FMIN	RPG	TF	FG
Ta2	MVZKLWEAKK	TIKIFGR	HQWYNS	YEYS	DFVDIE	FDTYMK	FNSDLSE	NSE	RLL	EVDNR	RTVL	EMNT	EV	VLTS	AS	DVLS	WAV	PAL	GI	KVD	DAT	P	GLN	QST	FMIN	RPG	TF	FG
Lo4	MLDKTSNPLI	TIKALG	HQWYNS	YEYS	YKMLE	FDSYMI	PTNLEKWNF	RLL	DVDRN	RLIV	FFNCQIR																	
Pe2	MLDETSNPLI	TIKALG	HQWYNS	YEYS	YKMLE	FDSYMI	PTNLEKWNF	RLL	DVDRN	RLIV	FFNCQIR	MIVT	SADV	IHS	WAV	PSL	GVKI	DGT	P	GLN	QTN	FNLN	CTGL	FLY				
Ig9	MLDETSNPLI	TIKALG	HQWYNS	YEYS	YKMLE	FDSYMI	PTNLEKWNF	RLL	DVDRN	RLIV	FFNCQIR	MIVT	SADV															
Ig10	MLDETSNPLI	TIKALG	HQWYNS	YEYS	YKMLE	FDSYMI	PNNBLKWNF	RLL	DVDRN	RLIV	FFNCQIR	MIVT	SADV	IHS	WAV	PSL	GVKI	DGT	P	GLN	QTN	FNLN	CTGL	FLY				
Ig11	MLDETSNPLI	TIKALG	HQWYNS	YEYS	YKMLE	FDSYMI	PNNBLKWNF	RLL	DVDRN	RLIV	FFNCQIR	MIVT	SADV	IHS	WAV	PSL	GVKI	DGT	P	GLN	QTN	FNLN	CTGL	FLY				
Ig12	MLHETSNPLI	TIKALG	HQWYNS	YEYS	YKMLE	FDSYMI	PTNBLKWNF	RLL	DVDRN	RLIV	FFNCQIR	MIVT	SADV	IHS	WAV	PSL	GVKI	DGT	P	GLN	QTN	FNLN	CTGL	FLY				
Ig13	MIKTIWEP	SVTLKALG	HQWYNS	YEYS	DFMNV	FDSYMI	PTNBLTVDS	RLL	DVDRN	RVIL	EMNS	QIR	ILV	TAA	DVLS	WAV	PSL	GVKI	DGT	P	GLN	QTN	FNLN	REGL	FLY			
Ig14	MIKTIWEP	SVTLKALG	HQWYNS	YEYS	DFMNV	FDSYMI	PTNBLTVDS	RLL	DVDRN	RVIL	EMNS	QIR	ILV	TAA	DVLS	WAV	PSL	GVKI	DGT	P	GLN	QTN	FNLN	REGL	FLY			
Ig15	MIKTIWEP	SVTLKALG	HQWYNS	YEYS	DFMNV	FDSYMI	PTNBLTVDS	RLL	DVDRN	RVIL	EMNS	QIR	ILV	TAA	DVLS	WAV	PSL	GVKI	DGT	P	GLN	QTN	FNLN	REGL	FLY			

5.2 Diversidad haplotídica.

5.2.1 En el gen de COI.

La distribución y frecuencias de los 23 haplotipos hallados en las poblaciones estudiadas se muestran en la tabla 17.

Las poblaciones de Iguazú (Misiones, Argentina) y Tecomán (suroeste de México). registraron mayor número de haplotipos (ocho y siete, respectivamente) que las restantes poblaciones, las cuales presentaron entre uno y cuatro haplotipos muy similares entre sí. Asimismo estas últimas tienen un haplotipo en común, muy frecuente, que denominados A1, el cual está ausente en las poblaciones de Tecomán e Iguazú.

De las poblaciones que presentaron el haplotipo A1 algunas fueron monomórficas para el mismo (Caacupé en Paraguay, y Laguna Naick-Neck en Formosa, Argentina); mientras que otras (Pto. Península de Argentina, Londrina de Brasil y Texas de EE.UU) presentaron de uno a tres haplotipos más, cercanos a A1.

5.2.2 En el gen de COII.

Las distribuciones y frecuencias de los 15 haplotipos hallados en las poblaciones estudiadas se muestran en la tabla 17.

Para COII se obtuvo el mismo patrón de frecuencias de haplotipos que para COI. Todas las poblaciones, excepto Iguazú y la población mexicana (en este caso de Tamaulipas, en el nordeste del país), presentaron un haplotipo en común y con alta frecuencia, el cual denominamos A2. Algunas de estas poblaciones fueron monomórficas para A2 (Caacupé, en Paraguay), mientras que otras (Texas en EE.UU; Londrina en Brasil; Puerto Península en Misiones, Argentina y Laguna Naick- Neck, en Formosa, Argentina) presentaron uno o dos haplotipos además de A2, muy poco diferenciados con respecto a éste.

Las poblaciones de Iguazú y México no presentaron ningún haplotipo en común con el resto de las poblaciones y en su lugar mostraron haplotipos muy diferenciados entre sí y del resto de las poblaciones. En Iguazú, se obtuvo una alta diversidad de haplotipos (siete diferentes), lo cual no se pudo evaluar detalladamente en la muestra procedente de Tamaulipas, de la cual solamente se pudo extraer ADN de dos individuos (tabla17).

Localidades	Acrónimos	Estados/ Países	Vegetación	Nº	Frecuencia de haplotipos	Diversidad nucleotídica media
Lubbock	Tx	Texas, USA	Cultivo de algodón	9 (COI)	4 A1, 4 Tx1, 1 Tx2.	0.0092+/- 0.0043
				8(COII)	6 A2, 1 Tx3, 1 Tx4.	0.0027+/- 0.0019
Tecomán	Te	Colima, México	Cultivo de algodón	10 (COI)	1 Te1, 1 Te2, 1 Te3, 1 Te4, 4 Te5, 1 Te6, 1 Te7.	0.0150+/-0.0034
Río Bravo	Ta	Tamaulipas México	Cultivo de algodón	2 (COII)	1 Ta1, 1 Ta2.	0.0510+/-0.0178
Londrina	Lo	Paraná, Brazil	Cultivo de algodón	10 (COI)	7 A1, 1 Lo1, 1 Lo2, 1 Lo3.	0.0058+/- 0.0022
				7 (COII)	6 A2, 1 Lo4.	0.0048+/- 0.0027
Caacupé	Ca	Cordillera, Paraguay	Cultivo de algodón	10 (COI)	10 A1	0
				7 (COII)	7 A2	0
Laguna Naick Neck	Nn	Formosa, Argentina	Cultivo de algodón	7 (COI)	7 A1	0
				5 (COII)	3 A2, 2 Pe2	0.0033+/-0.0033
Puerto Península	Pe	Misiones, Argentina	Area de plantas nativas, próxima a cultivos de algodón	6 (COI)	5 A1, 1 Pe1	0.0062+/- 0.0027
				5 (COII)	3 A2, 2 Pe2	0.0033+/- 0.0033
Parque Nacional Iguazú	Ig	Misiones, Argentina	Area protegida de vegetación nativa	8 (COI)	1 Ig1, 1 Ig2, 1 Ig3, 1 Ig4, 1 Ig 5, 1 Ig6, 1 Ig7, 1 Ig8.	0.2496+/-0.0243
				7 (COII)	1 Ig9, 1 Ig10, 1Ig 11, 1 Ig12, 1Ig13, 1Ig14, 1Ig15.	0.2504+/-0.0316

Tabla 17: Frecuencia y diversidad haplotídica para COI y COII en las localidades mostradas.

5.3 Análisis de parsimonia de los haplotipos.

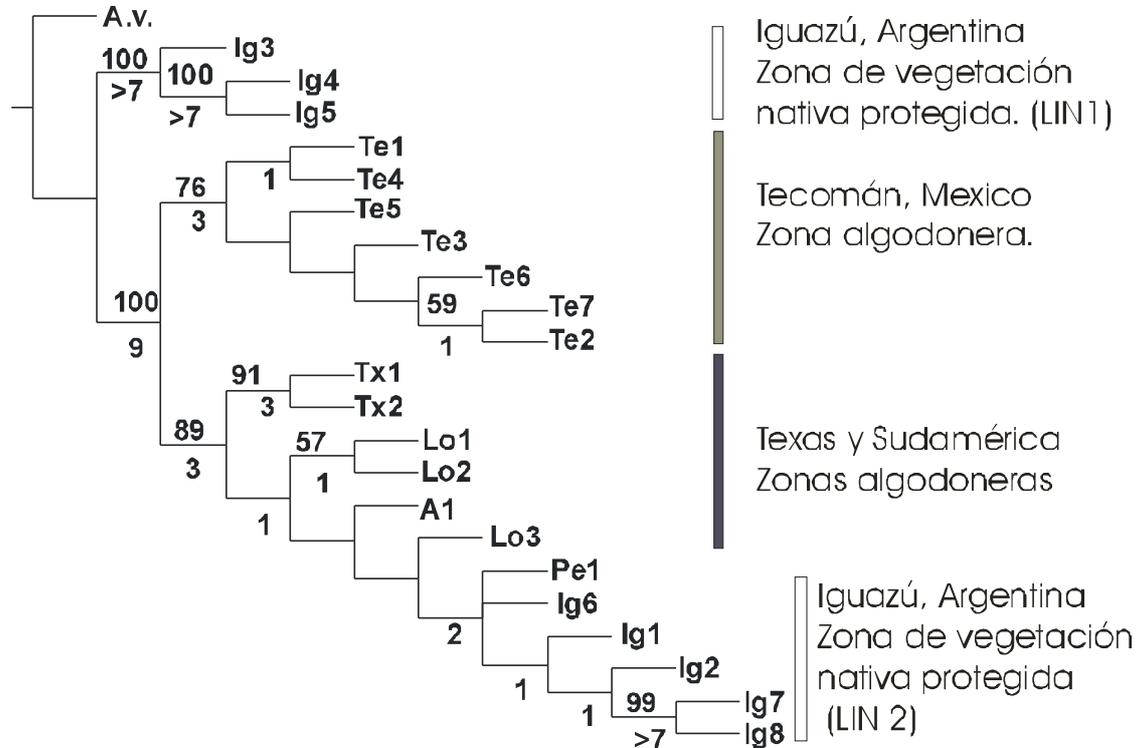
5.3.1 En el gen de COI.

El análisis de los 23 haplotipos del gen COI mostró que, de los 136 sitios variables, 102 resultaron ser caracteres informativos para el análisis de parsimonia.

Como resultado de dicho análisis se obtuvieron dos árboles más cortos de 255 pasos con un índice de consistencia $CI = 0.76$ y un índice de retención $RI = 0.77$. La figura 20 muestra el cladograma de consenso estricto entre dichos árboles, los cuales sólo difieren en la posición del haplotipo Pe1.

Los valores de “Bremer support” señalan altos valores de apoyo para uno de los clados de Iguazú (designado como LIN1) y su grupo hermano, que incluye los restantes haplotipos. En dicho grupo se observan dos clados con buenos valores de soporte: el conformado por los haplotipos de Tecomán y el de las poblaciones que presentan al haplotipo A1. Las ramas ubicadas en la base de los haplotipos Te5 (Tecomán) y A1 no se encuentran apoyadas por ningún carácter.

Fig 20: Cladograma consenso de los dos árboles obtenidos a partir de las secuencias del gen COI. Se indican los valores de soporte de ramas: Jackknife (arriba) y Bremer support (abajo)



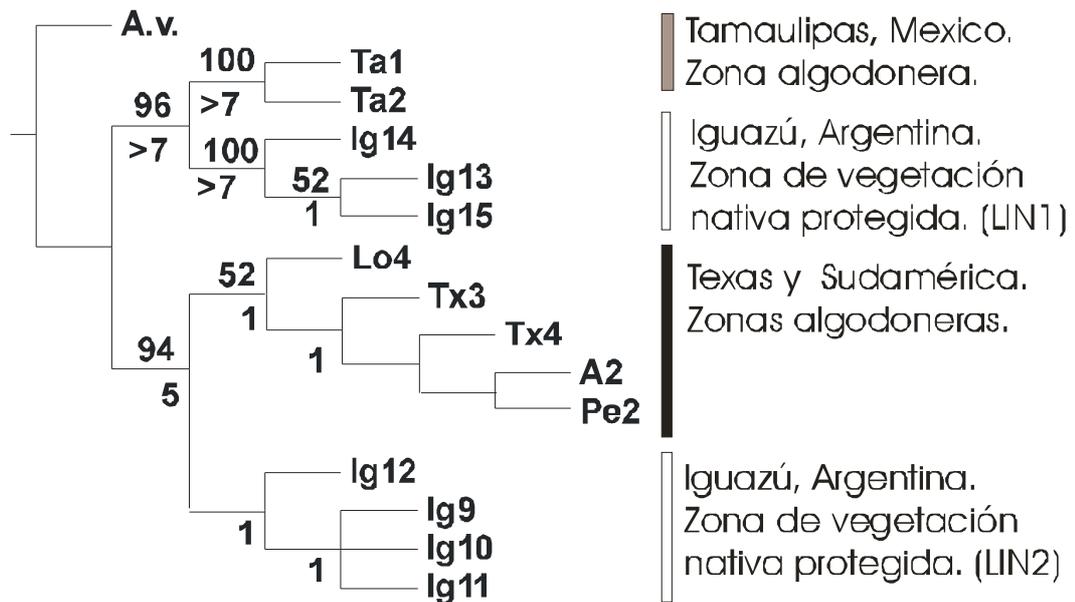
5.3.2 En el gen de COII.

Al analizar los 15 haplotipos del gen COII se determinó que, de los 171 sitios variables, 144 resultaron ser informativos para el análisis de parsimonia.

Como resultado de dicho análisis se obtuvieron dos árboles de 300 pasos con un índice de consistencia $CI = 0.74$ y un índice de retención $RI = 0.80$. La figura 21 muestra el cladograma de consenso estricto entre dichos árboles, los cuales sólo difieren en las posiciones relativas de los haplotipos Ig9, Ig10 e Ig11.

Los valores de “Bremer support” señalan altos valores de apoyo para el grupo que incluye a los haplotipos de Tamaulipas y uno de los linajes de Iguazú (LIN1). Este clado se muestra claramente separado del clado de los haplotipos de Texas y América del Sur de zonas algodonerías, el cual presenta menores valores de soporte, incluyendo las ramas que sostienen a A2, que no tienen ningún apoyo.

Fig 21. Cladograma consenso de los dos árboles obtenidos a partir de las secuencias del gen COII. Se indican los valores de soporte de ramas: Jackknife (arriba) y Bremer support (abajo)



En los cladogramas obtenidos para los genes COI y COII se observan patrones de relaciones filogenéticas similares. Los haplotipos de la misma población se agrupan juntos, excepto aquéllos pertenecientes a la población de Iguazú que se agrupan en dos clados distintos lejanamente relacionados, los cuales se designaron como LIN1 y LIN2.

En el cladograma del gen COI (Fig. 20), LIN1 es el clado hermano del resto de los haplotipos, que forman un grupo con dos subgrupos, el primero incluye los haplotipos de Tecomán (México) y el segundo incluye los haplotipos de Texas y los restantes de América del Sur. En el árbol del gen de COII (Fig. 21) también se observan dos clados principales, el primero incluye el LIN1 de Iguazú y los haplotipos de México (Tamaulipas) como grupos hermanos, y el segundo incluye el LIN2 de Iguazú como grupo hermano de los restantes haplotipos (de Texas y de América del Sur).

Puede observarse que en el árbol del gen COI, los haplotipos de Texas y los provenientes de campos de algodón de América del Sur forman un grupo parafilético con respecto a LIN 2, mientras que en el árbol de COII forman un grupo monofilético, hermano de LIN2.

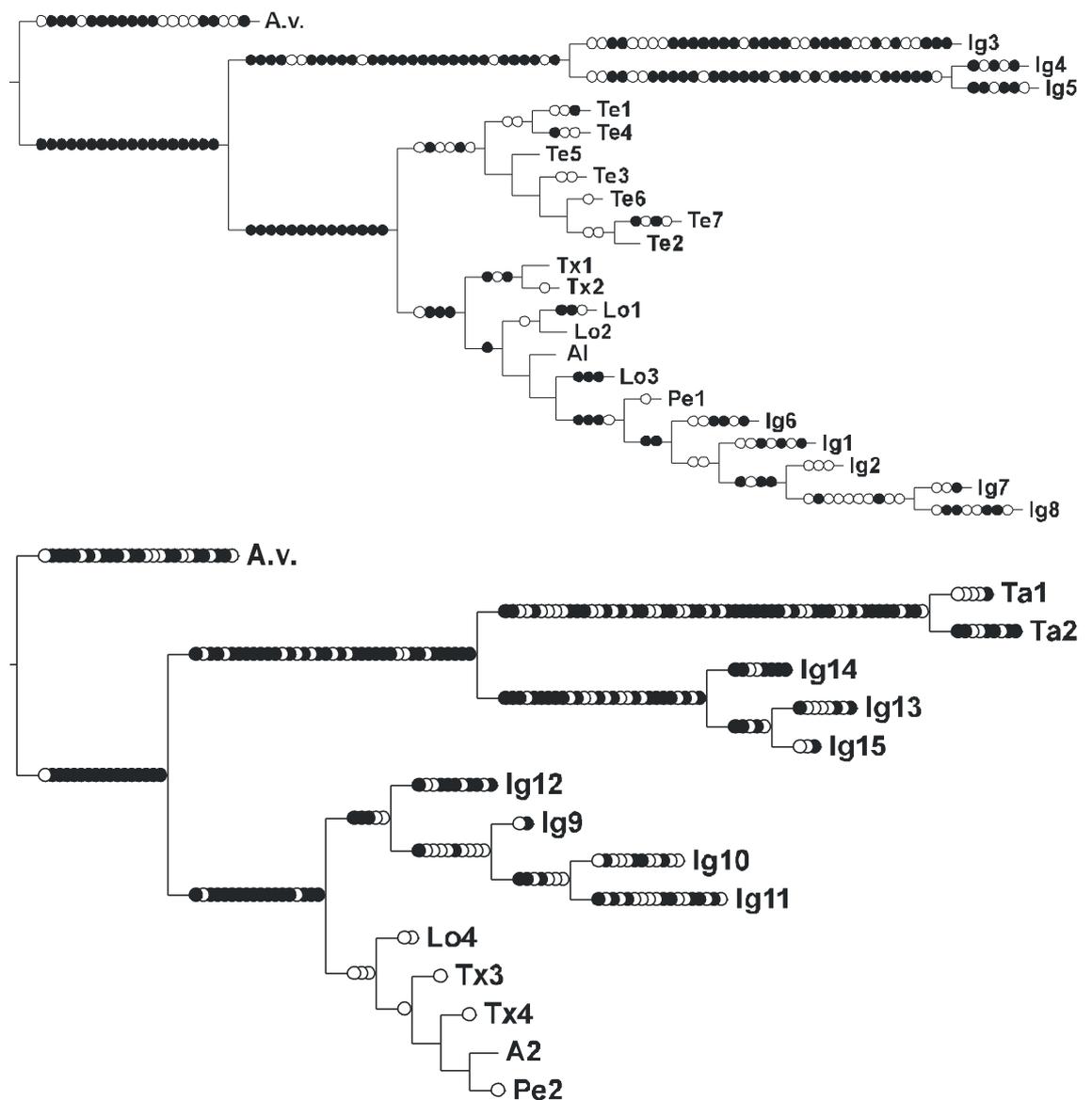
De acuerdo a la teoría de la coalescencia, cuando en una población se establece una barrera en el flujo génico, inicialmente las relaciones entre los haplotipos de las dos poblaciones divergentes, para cualquier gen dado, van a ser polifiléticas. Con el tiempo, los haplotipos que persisten incrementarán el grado de parentesco dentro de cada población, transformándose en parafiléticos. El último grado de diferenciación es la monofilia recíproca, en el cual todos los haplotipos de cada una de las poblaciones hijas tienen su ancestro común dentro de su misma población (Avise, 2000).

En el cladograma correspondiente a COII, los haplotipos de Texas y de América del Sur alcanzaron el estado de monofilia recíproca con respecto a LIN2 de Iguazú, pero en COI, este grupo se mantiene aún parafilético con respecto a LIN2. En consecuencia, podría decirse que el tiempo en que se estableció la barrera de flujo génico entre el LIN2 y los haplotipos de Texas y América del Sur es probablemente cercano al mínimo necesario para alcanzar el status de monofilia de ambos grupos, ya que éste ha sido alcanzado en el árbol del gen COII, pero todavía no en el árbol del gen de COI.

5.4 Optimización de caracteres, largo de ramas y tasas evolutivas

En la figura 22 se muestran las optimizaciones de los caracteres (opción ACCTRAN o acelerada) para uno de los dos árboles obtenidos para COI y COII respectivamente.

Fig. 22. Cladogramas de COI y COII mostrando la optimización de caracteres sobre las ramas. Se utilizó el tipo de optimización ACCTRAN o acelerada



La figura 22 muestra que, tanto en el árbol del gen COI como en el de COII, el clado que presenta al haplotipo A no está soportado por sinapomorfías, y además el

haplotipo A no presenta autapomorfías (tiene largo 0) por lo tanto dichas ramas se colapsarán en los filogramas, dejando al haplotipo A en el nodo. Esto se verifica tanto para la optimización de tipo acelerado como para la de tipo retrasado, es decir que no se trata de un caso de optimización ambigua, sino que para cualquier tipo de optimización estas ramas no presentan caracteres que las sostengan. Lo mismo ocurre en el árbol de COI, con el clado que tiene al haplotipo Te5 de Tecomán, en la base. En concordancia, puede observarse que estas ramas no soportadas por ningún carácter, son las que no presentan valores de soporte en los cladogramas de las figuras 20 y 21.

Por el contrario, el clado LIN 1 de Iguazú y el clado de Tamaulipas (México) y sus haplotipos, son los que han acumulado mayor cantidad de cambios tanto en su base (sinapomorfías) como en sus ramas terminales (autapomorfías). Podría argumentarse que la relación entre los haplotipos que presentan ramas largas, como los de Iguazú (LIN1) y Tamaulipas, pueden deberse a un artificio del método y que dichos haplotipos se reúnen en un mismo clado debido al fenómeno designado como atracción de ramas largas (= “long branch attraction”) descrito por Felsenstein (1978), en cuyo caso el método de parsimonia no sería efectivo. El modelo de atracción de ramas largas presupone que la causa más probable de similitud entre dos taxa de ramas largas que aparecen relacionados, no es la ancestralidad común, sino la convergencia (Goloboff, 1998a) y que alguno de ellos podría estar más cercanamente emparentado con otros taxones. Sin embargo parece improbable que este efecto haya ocurrido en el presente análisis, dado que en el árbol de COI, donde no se muestreó Tamaulipas, los haplotipos de Iguazú LIN1 también aparecen formando un clado muy distante de todos los demás haplotipos (de Texas y de América del Sur).

Los haplotipos de Iguazú del LIN2 también presentan ramas bastante largas, aunque menores que LIN1. Entre los restantes haplotipos (con ramas terminales cortas), los que presentan mayor cantidad de autapomorfías son los de Londrina (Lo1 y Lo3 en COI) y uno de los de Tecomán (Te7).

El largo de una rama, está dado por la cantidad de cambios acumulados. La cantidad de cambio está determinada por la tasa o velocidad evolutiva de los caracteres sobre esa rama, así como por el tiempo de divergencia. En consecuencia, según los resultados obtenidos, podría inferirse que los haplotipos de Iguazú (LIN1) y de Tamaulipas son más antiguos que el resto, o bien, que tienen una edad similar pero su tasa evolutiva es mucho más rápida. La cantidad de cambio acumulada tanto en los LIN 1 de Iguazú como en Tamaulipas, es tan alta con respecto a la presentada por las demás

poblaciones, que no podría explicarse solamente por tasas evolutiva mayores. Evidentemente el patrón presentado está determinado mayormente por el tiempo de divergencia de estos haplotipos, aunque también podrían presentar alguna diferencia en sus tasas evolutivas. De hecho, en este trabajo no se han supuesto tasas de evolución constantes y en consecuencia tampoco se ha utilizado la técnica del reloj molecular.

El hecho de que el patrón de largo de ramas para todos los haplotipos sea coincidente en los cladogramas de COI y COII, es decir que en dos análisis independientes las cantidades de cambio para los distintos haplotipos fueron las mismas, corrobora la hipótesis de que, en este análisis, un mayor largo de ramas evidencia un tiempo de divergencia mayor; ya que si el patrón obtenido se debiera mayormente a diferencias en las tasas evolutivas, estas no tendrían porqué guardar relación en los diferentes genes. Si bien no es posible aplicar este razonamiento a la población de Tamaulipas, ya que la misma fue analizada sólo en el caso del gen COII, su condición de ancestralidad se deduce rápidamente de su ubicación geográfica, pues se encuentra justamente en el país considerado como originario para la especie.

En resumen, el mayor largo de ramas que presentan los haplotipos de Iguazú y de México: LIN1 y Tamaulipas en mayor grado, y LIN2 y Tecomán en menor grado, evidencia una condición de ancestralidad de los mismos. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente para el análisis de diversidad de los haplotipos.

5.4 Análisis de los filogramas.

Fig 23: Filograma obtenido para los haplotipos del gen COI. Los haplotipos correspondientes a las distintas poblaciones se muestran en diferentes colores. Las superficies de los círculos y la longitud de las líneas son proporcionales a la frecuencia de haplotipos y a los largos de rama, respectivamente.

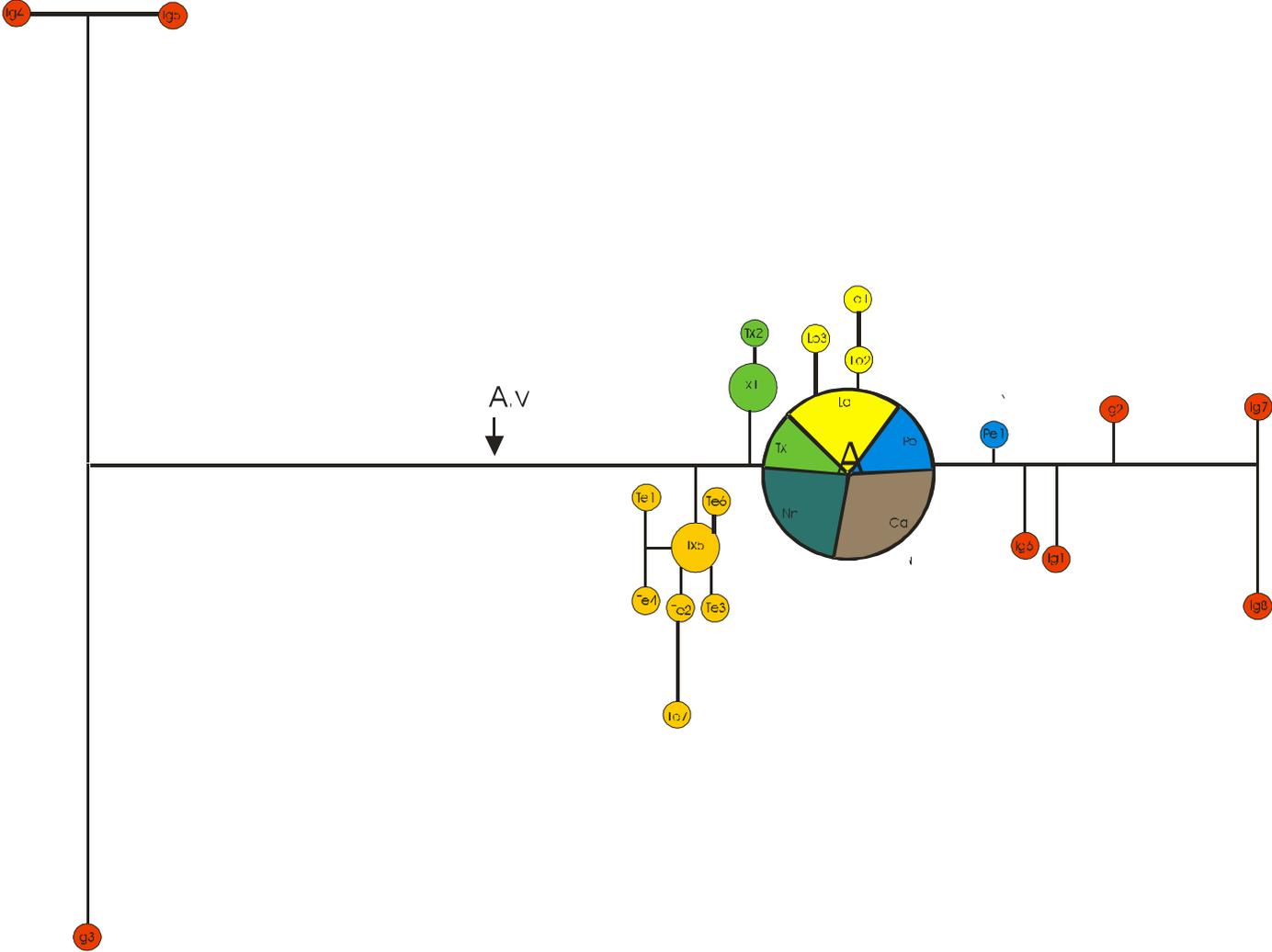
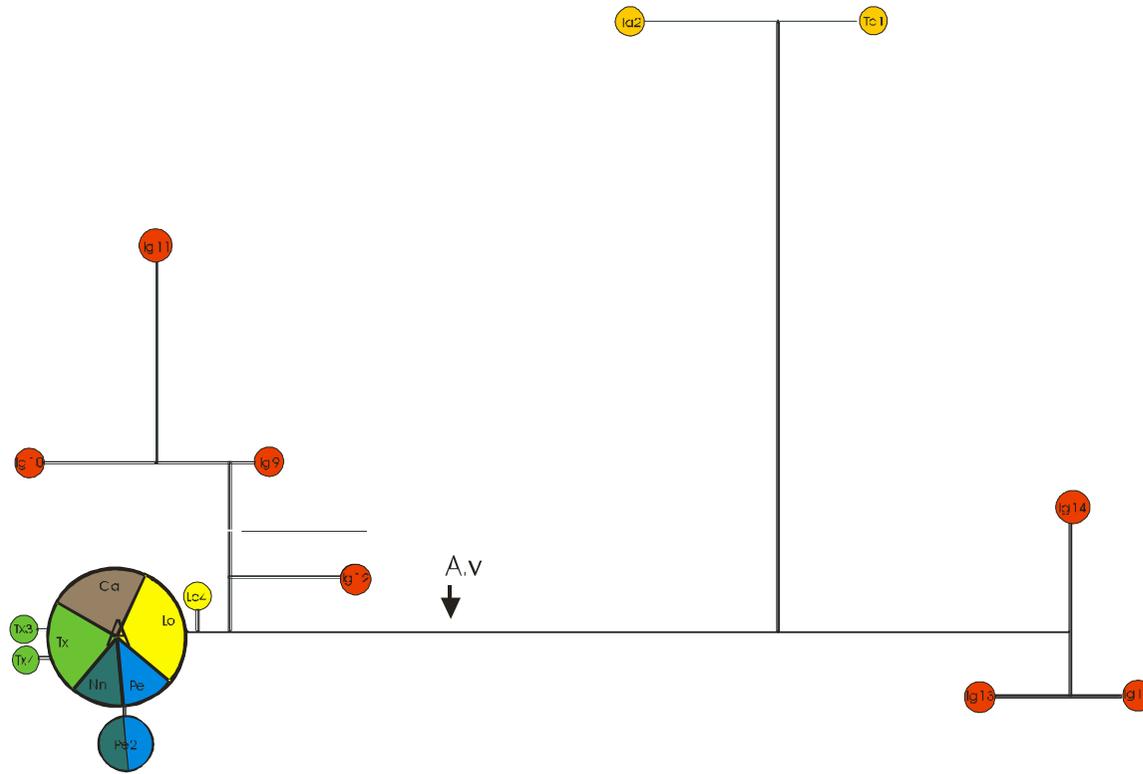


Fig 24: Filograma obtenido para los haplotipos del gen COII. Los haplotipos correspondientes a las distintas poblaciones se muestran en diferentes colores. Las superficies de los círculos y la longitud de las líneas son proporcionales a la frecuencia de haplotipos y a los largos de rama, respectivamente.



Los filogramas obtenidos para los haplotipos del gen de COI y COII (Figs. 23 y 24 respectivamente) resumen toda la información analizada previamente. De esta manera, el análisis filogeográfico permite poner en evidencia los diferentes grados de estructuración poblacional de las especies y detectar los posibles eventos históricos que dieron lugar a la misma (Avice *et al.*, 1987). En este caso, *A. grandis* aparece como una especie fuertemente estructurada y es por eso que se observan distintos filogrupos separados por varios pasos mutacionales.

En primer lugar, los filogramas muestran que los haplotipos cuyas ramas no estaban soportadas en los cladogramas (A en COI y COII, y Te5 en COI) toman una posición central en la red y a partir de ellos surgen haplotipos derivados. Los haplotipos centrales suelen presentar una mayor frecuencia y muchas veces también una amplia distribución geográfica. Este es el caso del haplotipo A, que se muestra en alta frecuencia y ampliamente disperso en todas las muestras recolectadas sobre algodón o cercanas a zonas algodonerías, en Texas y América del Sur. A su vez, dentro del filogrupo del haplotipo A, los haplotipos derivados se separaron por pocos pasos mutacionales, como se observa en las poblaciones de Texas, Londrina, Pto. Península y Laguna Naick-Neck, en esta última sólo en el caso del gen COII, ya que es monomórfica para A en COI.

Tanto en el filograma de COI como en el de COII, se puede observar que los haplotipos de México y los correspondientes al LIN1 y LIN2 de Iguazú se encuentran formando diferentes filogrupos, los cuales aparecen separados por “gaps” de muchos pasos mutacionales. Estos “gaps” podrían estar correlacionados también con una mayor distancia geográfica, en el caso de las poblaciones mexicanas, pero en el caso de los linajes del Parque Nacional Iguazú, estaría evidenciando otro tipo de aislamiento de largo plazo, como por ejemplo eventos de fragmentación histórica. A su vez, la presencia de varios haplotipos muy diferenciados dentro de un mismo filogrupo, como los del LIN1 de Iguazú y Tamaulipas y, en menor grado, los del LIN2 de Iguazú y Tecmán, evidencian un tiempo relativo mayor de divergencia en estas poblaciones.

6. DISCUSION.

6.1.1.a.1.1.1

¿Poblaciones ancestrales de picudo en América

del Sur?

De los resultados del análisis filogeográfico de secuencias de los genes COI y COII referidos a poblaciones del picudo del algodón (diversidad y diferenciación haplotídica, filogenia de dichos haplotipos y filogeografía) se infiere que en América del Sur habría poblaciones de *A. grandis* ancestrales, asociadas con áreas de reserva de vegetación nativa. Esto se evidencia en la muestra del Parque Nacional Iguazú y posiblemente ocurre en distintas áreas de Brasil, Bolivia, y/o países del norte de América del Sur como Colombia, de los cuales no se han estudiado muestras.

Un estudio complementario al aquí presentado, Guzmán (2004) demuestra, mediante la técnica de RAPDs de alta resolución, que no se encuentra un patrón claro de diferenciación genética entre poblaciones de América del Sur de picudo coleccionadas sobre plantas nativas vs. poblaciones de algodón. Sin embargo, una muestra de este estudio coleccionada en un área de reserva de la selva paranaense, Urugua-í, mostró una muy alta diferenciación en relación al resto de las poblaciones, presentándose como población ancestral. Este hecho refuerza la hipótesis de que las poblaciones ancestrales de *A. grandis* en América del Sur, (como Iguazú y Urugua-í) se encontrarían en zonas de vegetación nativa protegidas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio filogeográfico corroboran la hipótesis propuesta por Scataglini *et al.* (2000) basada en los resultados de la técnica de RAPDs. Es decir que la explicación más plausible para el origen y dispersión del picudo en América del Sur sería muy similar a la que plantearon Burke y colaboradores (1986) para América del Norte, en el sentido que en América del Sur también se habrían producido por un lado dispersiones (o expansiones de rango) en el pasado geológico, asociadas con huéspedes nativos, y por otro, una expansión muy rápida, asociada con el cultivo del algodón, en tiempos históricos recientes.

Estos resultados tienen implicancias teóricas y prácticas muy importantes. Un aspecto importante a considerar, si se propone que hubo una dispersión natural del picudo en América del Sur desde tiempos geológicos, es la referida a que *Hampea* es el huésped natural del “grupo de *A. grandis*” y por lo tanto del picudo (Jones *et al.* 1997;

Jones, 2001). Dado que este género de plantas no se extiende más allá del sur de Colombia, para explicar la presencia de poblaciones ancestrales de *A. grandis* en América del Sur es necesario invocar otros huéspedes antiguos, como por ejemplo *Gossypium* y *Cienfuegosia*, malváceas no sólo más extendidas a lo largo de toda América, sino también más antiguas (este punto se ampliará más adelante en esta discusión).

Entre las implicancias prácticas de los resultados obtenidos cabe señalar su importancia para adoptar estrategias más efectivas tendientes al control de la plaga. Por ejemplo, en la Argentina, el control de las poblaciones de picudo en la provincia de Misiones no fue tan intensivo como en Formosa, debido a que las autoridades fitosanitarias estimaron que, aunque había ingreso de picudos desde zonas algodoneras de países vecinos, estos no se propagarían en la provincia porque en ella prácticamente no se cultiva algodón.

Los resultados de la técnica de RAPDs y del análisis de secuencias de ADN mitocondrial contribuyeron a predecir que el picudo podía expandirse en Misiones, pese a los esfuerzos por impedir el ingreso de picudos desde Brasil y Paraguay, debido a la presencia de poblaciones genéticamente muy diferentes a las de los países vecinos (como la de Iguazú), probablemente ya establecidas en la provincia en plantas silvestres. Lamentablemente en este caso la predicción no fue tomada en cuenta, y el picudo se dispersó ampliamente en Misiones y avanzó sobre zonas algodoneras de Corrientes.

6.2 ¿Cómo y cuándo *A. grandis* alcanzó su distribución actual?

El análisis filogeográfico de los haplotipos de COI y COII, sugiere que el picudo habría alcanzado una amplia distribución en el continente americano, desde América del Sur hasta México, en tiempos geológicos previos al cultivo extensivo del algodón.

6.2.1 Los filogrupos más ancestrales: Iguazú y Tamaulipas

El árbol de COII, en el cual LIN1, el linaje más antiguo de Iguazú, es el grupo hermano de la muestra de Tamaulipas (noreste de México), corroboraría la hipótesis de una antigua conexión de las poblaciones de picudos localizadas en los límites sur y norte de las selvas americanas, a lo largo de las áreas costeras de América Central y del Golfo de México. Iguazú es parte de las selvas de la provincia Paranaense del dominio Amazónico (*sensu* Cabrera & Willink, 1980) o de la subregión Paranaense (*sensu* Morrone, 2001), y Tamaulipas es una unidad biogeográfica asignada actualmente a la

región Neártica (Morrone, 2001), pero que se sitúa en el límite de los neotrópicos y está caracterizada por numerosas especies representadas en las selvas de América Central y del Sur (Dice, 1943).

La alta divergencia presentada por la población de Tamaulipas es coincidente con la estimación de Burke *et al* (1986), sobre la edad mínima de permanencia de *A. grandis* en México (Plioceno tardío), basada en el estudio de fósiles de *Anthonomini* encontrados en ámbar dominicano (Iturralde-Vinent & McPhee, 1996). Este alto grado de divergencia es también presentado por los haplotipos del LIN1 de Iguazú, lo cual estaría evidenciando la presencia de estos haplotipos ancestrales en América del Sur desde el Plioceno tardío.

La profundidad de separación de estos filogrupos intraespecíficos también aparece consistentemente relacionada con las influencias biogeográficas históricas de fines del Plioceno y principios del Pleistoceno.

Los efectos de los cambios climáticos sobre el rango geográfico de las especies parecen haber sido muy profundos durante este período, y fueron aparentemente las influencias del Pleistoceno las que generaron las distribuciones de las unidades filogeográficas dentro de numerosas especies actualmente reconocidas (Lunt *et al.*, 1998).

Durante el Plio-Pleistoceno, la biota de América del Sur fue afectada por ciclos cálidos y húmedos, que alternaron con ciclos áridos y fríos, los cuales fueron responsables de sucesivas expansiones y retracciones de las áreas de selva. Estos ciclos habrían tenido una gran influencia en la diferenciación de la flora y fauna de América del Sur, especialmente a nivel específico y subespecífico. Durante los ciclos fríos y secos la retracción de las selvas habría favorecido la divergencia de las especies adaptadas a este tipo de ambientes, en distintos fragmentos o refugios, y también provocado extinciones en las áreas desfavorables para su desarrollo. Por lo contrario, durante los ciclos cálidos y húmedos, las selvas habrían experimentado una expansión, y poblaciones anteriormente aisladas habrían establecido un contacto secundario (Vanzolini & Williams, 1970; Simpson-Vuilleumier, 1971; Haffer 1977, 1982; Prance, 1982).

Entre las hipótesis que explican los procesos de especiación recientes en la Cuenca del Amazonas, una de las más aceptadas es el Modelo de Refugios (Haffer, 1982), el cual postula que como consecuencia de los ciclos climáticos del Pleistoceno,

se produjeron sucesivas expansiones y contracciones de las áreas de selva y de savanas y, por lo tanto, ciclos de vicarianza y dispersión de las poblaciones.

Según la teoría de refugios, los ciclos del Plio-Pleistoceno han dibujado la distribución actual de los patrones de muchas especies tropicales que pudieron sobrevivir en fragmentos remanentes de selvas húmedas. La filogeografía se ha convertido en una herramienta metodológica muy útil para detectar áreas de hibridación y intergradación secundaria entre filogrupos diferenciados durante el este período (Avice & Walker, 1998; Avice, 2000).

En la cuenca Amazónica se han encontrado para numerosas especies (de aves, reptiles, etc), áreas de contacto secundario (de hibridación, introgresión o simpatria secundaria) que no corresponden a ninguna barrera física o ecológica observable actualmente (Simpson- Vuilleumier, 1971). Haffer explica que la coincidencia de la ubicación de áreas de contacto secundario de varias especies de aves, se debería a las oscilaciones climáticas del Pleistoceno y su efecto en las áreas tropicales bajas de América del Sur. Durante las fases de aridez, la selva habría cubierto sólo pequeñas áreas disyuntas, que permitirían la subsistencia de ciertas especies, y actuarían como refugios para organismos propios de selvas tropicales. Presiones de selección locales, habrían permitido la diferenciación de las poblaciones en los distintos refugios. En las fases húmedas, la expansión de las selvas y la dispersión de las poblaciones previamente aisladas produciría el patrón complejo típico de zonas de contacto secundario.

La distribución simpátrida de los haplotipos de los dos linajes de Iguazú (LIN1 y LIN2), con una divergencia genética muy grande, puede explicarse entonces, como una fragmentación histórica. Dicha fragmentación se ajustaría a un patrón típico del período glacial en América del Sur, caracterizado por ciclos alternantes de vicarianza (divergencia genética) y dispersión (contactos secundarios). Estos linajes podrían haber evolucionado en diferentes fragmentos o refugios de selvas húmedas, y haber establecido luego un contacto secundario. La razón de este contacto secundario sería consecuencia de la re-expansión de las selvas tropicales y subtropicales ocurrida hacia fines del Pleistoceno (Prado & Gibbs, 1993) y/o de la migración masiva de picudos desde el sudeste de Brasil (estado de Paraná) hacia la Argentina (Misiones), a causa del avance de la deforestación y la extensión de las áreas agrícolas. Este movimiento sería favorecido por los vientos predominantes en la región, de dirección sureste (Manessi, 1997).

La gran divergencia de las poblaciones mexicanas de Tecomán y Tamaulipas, se debería no sólo a la distancia y separación geográfica entre ellas (áreas suroeste y nordeste de México respectivamente aisladas por cadenas montañosas), sino también a las diferentes historias de dichas áreas, las cuales pertenecen a diferentes regiones biogeográficas. La población de Tecomán procede de un área templado-fría de vegetación abierta y xérica; la de Tamaulipas, en cambio, se asocia con una provincia biogeográfica más húmeda y cálida, donde todavía existen áreas de selva marginal, como en el caso de Misiones.

6.2.2. El filogrupo del haplotipo A.

La aceptación de los hipótesis de ocurrencia de poblaciones ancestrales de picudo en las selvas y bosques tropicales de América del Sur, establecidas probablemente desde el Plio-Pleistoceno, permite suponer también una dispersión natural para las poblaciones de América del Sur que incluyen al frecuente y ampliamente distribuido haplotipo A (presente también en Texas), la cual sería más reciente y análoga a la expansión del picudo hacia América del Norte durante el Pleistoceno medio, propuesta por Burke *et al.* (1986).

La población de Brasil (Londrina), así como las de Pto. Península y Laguna Naick-Neck, de Argentina, presentan al haplotipo A en alta frecuencia; pero a su vez también incluyen uno a tres haplotipos derivados de A; al igual que la población de Texas en EE.UU.

Si bien los resultados obtenidos son consistentes con una dispersión natural del haplotipo A en América del Sur, los mismos no excluyen la posibilidad de que picudos con haplotipo A hayan ingresado directamente desde Texas a Brasil, a través del intercambio comercial, ya que éste sería el más frecuente en ese estado de EE.UU.

El haplotipo A se distribuye ampliamente en regiones xéricas y/o frías (región Neártica en Texas y dominio Chaqueño en América del Sur), por lo cual, cabe suponer que su dispersión habría estado asociada con un período de máxima expansión de las zonas áridas en todo el continente americano, situado aproximadamente en el Pleistoceno medio, coincidente con la glaciación de Wisconsin-Würm del hemisferio norte (Ab`Sáber, 1977). Durante ese período, provincias biogeográficas con vegetación xerofítica, como las de Catinga, Cerrado y Chaco, de la subregión chaqueña en América del Sur (Morrone, 2000, 2002) habrían estado conectadas por un corredor de savanas, también llamado “diagonal de formaciones abiertas” o “diagonal de vegetación seca”

(Prado & Gibbs, 1993). Esto habría favorecido la expansión de poblaciones del picudo preadaptadas a ambientes xerofíticos (como las que presentan el haplotipo A), tanto en América del Norte como en América del Sur.

La distribución disyunta de muchas plantas vasculares sería una evidencia de la expansión de la vegetación semiárida a través de las Américas durante el Pleistoceno medio (Axelrod, 1958). Raven (1963) y Raven & Axelrod (1975) citan varios ejemplos de especies, grupos de especies o poblaciones con patrones disyuntos en áreas templadas y/o desérticas de América del Sur y América del Norte. Por ejemplo *Cienfuegosia drumondii*, planta hospedera de *A. grandis*, se distribuye en el sur de Texas y también en Paraguay y Argentina. Las poblaciones de picudo con haplotipo A como el más frecuente, serían otro ejemplo de distribución disyunta, pues están distribuidas en Texas y la subregión chaqueña de América del Sur (Brasil, Paraguay y Argentina) pero no se han hallado hasta el presente, en áreas intermedias como México.

En Colombia y Venezuela crecen *Cienfuegosia heterophylla* y *C. affinis*, en el nordeste de Brasil, *Gossypium mustelinum*, y a lo largo del corredor de las savanas, extendido desde el nordeste brasileño hasta la Argentina (especialmente en Mato Grosso y Paraguay), se registran numerosas especies de *Cienfuegosia* que podrían haber actuado como hospederas del picudo durante su expansión.

Otro factor que probablemente contribuyó a la expansión de especies xerófitas durante el Pleistoceno medio es que el nivel del mar descendió varios metros, por lo cual las costas eran mucho más amplias que en la actualidad (Donn *et al*, 1962). Algunos hospederos conocidos de picudo como *G. hirsutum*, *G. barbadense* y *Cienfuegosia heterophylla* son frecuentes en habitat litorales.

Esta expansión puede haber sido continua o a distancia, ya que muchas especies de *Gossypium* son capaces de cruzar barreras oceánicas y dispersarse a través de largas distancias sobre el agua y el picudo puede haber acompañado esta dispersión. Por ejemplo, la presencia del picudo en Cuba podría haber ocurrido por dispersión a distancia conjuntamente con *Gossypium barbadense*, único huésped del picudo en la isla, y las poblaciones fuente procederían de América del Sur o de Centroamérica.

Si el haplotipo A estaba presente en América del Sur desde el Pleistoceno medio, como lo sugerirían los resultados obtenidos, cabría preguntarse por qué no irrumpió antes en los cultivos del algodón. Una respuesta posible es que la intensa deforestación que tuvo lugar en Brasil, Paraguay y Argentina durante los últimos veinte años, y su reemplazo por áreas de cultivos, entre ellos el algodón, habrían favorecido el

aumento de la densidades poblacionales de la especie, por encima del umbral de daño económico. Existen varios ejemplos de especies de insectos que se transformaron en plagas en Brasil durante las últimas décadas, y que anteriormente ni siquiera eran conocidos para dicho país (Scataglini *et al.*, 2000).

El fenómeno ocurrido en Brasil y Paraguay, con la expansión del picudo a lo largo del corredor de las savanas, podría considerarse análogo a la invasión del cinturón algodonero en EE.UU., por su rapidez y la intensidad de los daños. Probablemente en Brasil la plaga es aun más difícil de controlar, pues las condiciones ambientales son más favorables para el picudo y hay una mayor variedad de hospederas alternativas. Las muestras monomórficas para el haplotipo A, como las de Caacupé (Paraguay) y Laguna Naick-Neck (Formosa, Argentina) tienen características de invasoras recientes que atravesaron un cuello de botella. La deforestación y la expansión de las áreas algodoneras podrían explicar la masiva invasión de picudos desde el sur de Brasil a Paraguay y Argentina durante las últimas dos décadas.

6.3 ¿Existen linajes de picudos exclusivamente ligados al algodón?

Según los resultados obtenidos, las poblaciones de picudo asociadas con el algodonero tienen diferentes grados de diversidad haplotípica y diferenciación a nivel del ADN mitocondrial y éste dependería de las poblaciones fuente. Cuando la diversidad de la población fuente es alta, como sucede en Tamaulipas (México), las poblaciones de picudos hallados en zonas de cultivo de algodón también son variables. Si por lo contrario, las poblaciones fuente han pasado por un cuello de botella presentan escasa diferenciación.

Según la hipótesis de Roehrdanz & North (1992) las poblaciones de picudo con una considerable diferenciación en el ADN mitocondrial deberían ser capaces de cambiar de huéspedes desde las plantas silvestres hacia el algodón, toda vez que éste estuviera disponible. Este cambio de huéspedes ocurriría en las poblaciones estudiadas de México y, probablemente, estaría ocurriendo en algodones del norte de Corrientes, colonizados por picudos procedentes de áreas de vegetación nativa de Misiones. Con respecto a las poblaciones con una gran frecuencia del haplotipo A (Texas y poblaciones de América del Sur con el haplotipo A), se plantea que habrían pasado por un cuello de botella al adoptar al algodón como huésped.

El cambio de hospederos desde malváceas silvestres hacia el algodonero habría ocurrido en diferentes tiempos y lugares a lo largo de la historia de *A. grandis*. Inclusive

el picudo seguiría ampliando su rango de huéspedes, como ha quedado demostrado con el descubrimiento de su desarrollo en *Hibiscus pernambucensis* (Burke *et al.*, 1986), perteneciente a la tribu Hibisceae y no Gossypieae, como la mayoría de los otros huéspedes. Esta planta se distribuye en hábitats litorales de las costas este y oeste de México, y en el norte de Brasil, y se comporta como hospedera del picudo en una pequeña localidad de la costa oeste de Chiapas.

Además de las causas históricas relacionadas con la divergencia de la población fuente, en la diferenciación influirían otros factores como la distancia de la población fuente al cultivo de algodón, el tamaño de la misma, las condiciones ambientales donde se desarrollan las distintas poblaciones de picudos, y la capacidad de los mismos para sobrevivir en esos ambientes.

6.4 ¿Cuáles fueron los posibles hospederos ancestrales en la expansión hacia América del Sur?

Estudios en la evolución de las asociaciones entre insectos fitófagos y sus plantas hospederas han demostrado que los dos factores principales que incrementan las posibilidades de un cambio de hospederos son la distribución geográfica de éste y sus abundancia local relativa (Fowler & Lawton, 1982; Becerra & Venable, 1999). Si el hospedero está disponible a través del espacio y del tiempo, y el fitófago es también una especie ampliamente distribuida con un rango similar, tendrá más oportunidades de realizar distintos cambios de hospedero que si tiene una distribución geográfica restringida (Bernays & Chapman, 1994; Schoonhoven *et al.*, 1998).

Anthonomus grandis se desarrolla en malváceas de la tribu Gossypiae e Hibisceae, incluyendo tres especies del género *Hampea*, varios *Gossypium* y *Cienfuegosias*, la especie subtropical *Thespesia polpunea* y ocasionalmente algún *Hibiscus* (Cross *et al.*, 1975; Burke *et al.*, 1986). El resto de los miembros del “grupo de *A. grandis*” son usualmente monófagas ya que tienen una sola especie de *Hampea* como hospedera y un rango geográfico mucho más reducido.

Hampea es un género relativamente joven dentro de las malvaceas con 21 especies de arbustos y árboles, algunos de más de 36 m. de altura. Es endémico de México, América Central y Colombia, algunas de sus especies habitan bosques húmedos y otras están adaptadas a hábitats de montaña o regiones sujetas a ciclos de estaciones secas y húmedas (Jones *et al.*, 1997). Ha sido propuesto como hospedero

original de *A. grandis* y de todo el grupo *grandis* (Fryxell, & Lukefahr, 1967; Burke *et al.*, 1986; Jones, 2001).

La hipótesis presentada en este trabajo, con respecto a un amplio rango de distribución de *A. grandis* en América del Sur desde el Plio-Pleistoceno, es consistente con la idea de una asociación antigua con algún hospedero ampliamente distribuido, tal como *Gossypium* y *Cienfuegosia*. En consecuencia, el cambio desde el hospedero primario *Hampea* hacia *Gossypium* y *Cienfuegosia* debe haberse producido muy tempranamente en la historia del picudo, tal cual lo propusieron Burke *et al.* (1986) cuando explicaron la expansión de la especie hacia el norte, desde México.

Los *Gossypium* americanos y las especies de *Cienfuegosia* probablemente tuvieron sus ancestros en el continente de Gondwana, y se habrían diferenciado de los grupos distribuidos en otros continentes a partir del Cretáceo-Terciario, evolucionado en distintas especies y razas durante los ciclos del Plio-Pleistoceno (Fryxell, 1965, 1979). El incremento de la aridez en América del Sur, desde el Terciario temprano, debido al levantamiento de los Andes, habría dado lugar a la progresiva formación de unidades bióticas con vegetación xerofítica (Kuschel, 1969). La flora Madroterciaria del sudoeste de América del Norte y México también estaría relacionada con grupos de áreas subtropicales que evolucionaron durante la expansión de ambientes más xéricos (Axelrod, 1950, 1958). La evolución de *Gossypium* y *Cienfuegosia* en el Pleistoceno en habitats xéricos, habría sido muy importante para la diferenciación de poblaciones del picudo y la colonización de nuevos ambientes, tanto de América del Norte como en América del Sur.

Cienfuegosia (2n=20, especies americanas; 2n=22 especies africanas) tiene la mayor diversidad de especies en Paraguay y Argentina, países donde se distribuyen 11 de las 23 especies, y cuatro de las cinco secciones del subgénero *Cienfuegosia* (Krapovickas, 2000). La distribución de este género en América es coincidente con el actual rango de distribución de *A. grandis*, desde Texas hasta Argentina (Figs. 25 y 26), incluyendo Cuba y las islas del Caribe cerca de Venezuela. Hasta el presente cuatro especies de *Cienfuegosia* son conocidas como hospederas de picudo *C. rosei* (sur de México, costas del Pacífico), *C. affinis* (Bolivia, Brasil, Paraguay y Venezuela), *C. argentina* (Argentina, Bolivia y Paraguay) y *Cienfuegosia drumondii* (Argentina, Paraguay y Texas), esta última con distribución disyunta coincidente con el haplotipo A de *A. grandis*.

Gossypium ($2n= 26$ y 52) es el otro género clave para interpretar la expansión de *A. grandis* en las Américas, tanto en el pasado geológico como en tiempos recientes, ya que el insecto se desarrolla en varias especies silvestres, parcialmente domesticadas, y en distintas variedades del subgénero *Houzingenia* y *Karpas* (Cross *et al.*, 1975). Dentro de *Gossypium*, las especies que mejor explican el rango de distribución del picudo en América son *G. barbadense* (en América del Sur hasta América Central), *G. hirsutum* (en América Central), *G. thurberi* (el noroeste de México y suroeste de EE.UU.) y *G. mustelinum* (endémica del noreste de Brasil) (Fryxell, 1979) (ver figura 27).

El centro de mayor diferenciación de *G. barbadense* es el Valle del Cauca, en el oeste de la Cordillera Central de Colombia, donde la especie no está bajo la influencia de prácticas de cultivo (Hutchinson *et al.*, 1947). Estos autores describen las posibles vías de dispersión de este algodón silvestre, desde Colombia hacia el este (islas del Caribe, Venezuela, Guyanas), desde el norte de Brasil hacia el oeste (Ecuador y desde allí hacia las islas Galápagos) y hacia el sur, bajando hacia la Argentina por las costas de los ríos Pilcomayo y Paraná. Esta últimas poblaciones habrían originado la variedad brasileña con varias adaptaciones a ambientes de selva húmeda.

En la década de 1960, las autoridades agropecuarias de la Argentina llevaron a cabo una campaña para eliminar a *G. barbadense* de las áreas subtropicales de Salta y oeste de Formosa a fin de prevenir posibles invasiones del picudo desde Bolivia (Gutiérrez *et al.*, 1960). Esto indica que hace ya muchos años que se está considerando la posibilidad de que *G. barbadense* pueda cumplir un rol clave en la dispersión del picudo en América del Sur.

Fig 25: Mapa de distribución de especies de *Cienfuegosia* sección *Paraguayana*.

Fig 26: Mapa de distribución de especies de *Cienfuegosia* sección *Friesia*.

Fuente: Adaptaciones de las figuras de Fryxel en *The genus Cienfuegosia* Cav. (Malvaceae) (1969).

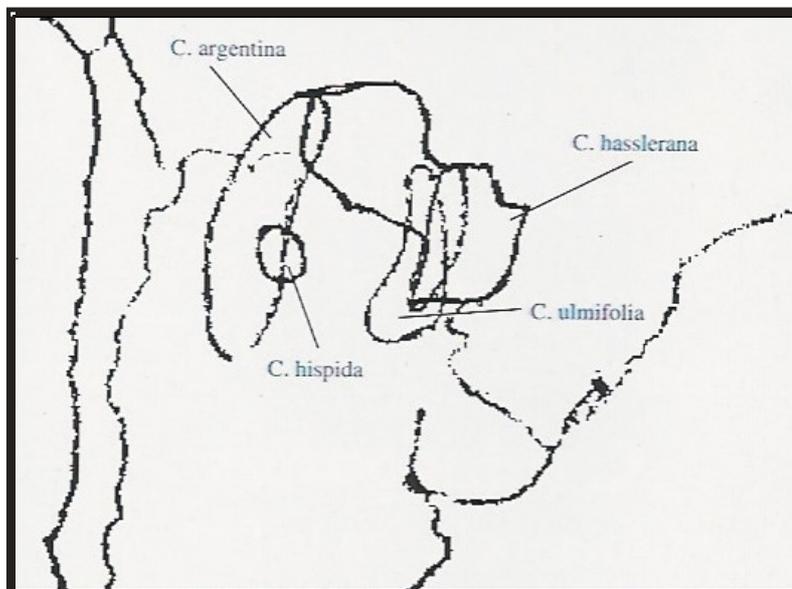
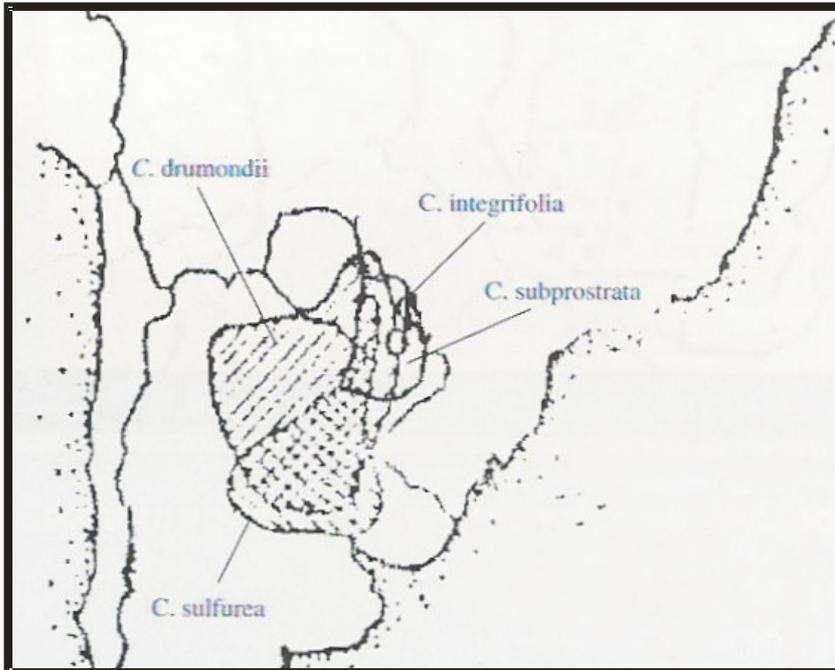
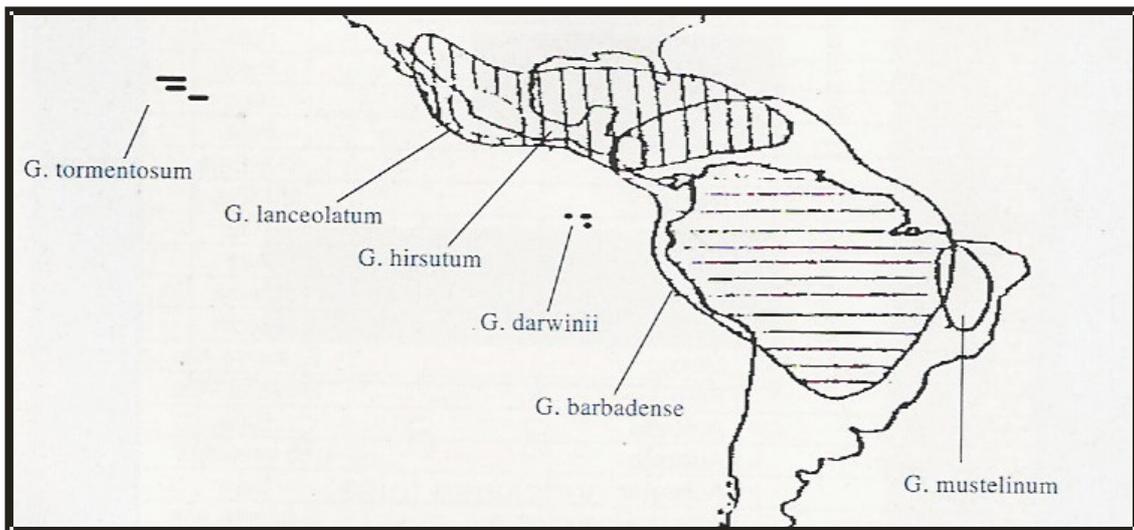


Fig. 27: Mapa de distribución de especies tetraploides de *Gossypium* en América.

Fuente: Adaptación de la figura 54 de Fryxell. The Natural History of Cotton Tribe. (1979).



Desafortunadamente, la larga historia de cultivo e hibridación ha borrado señales biológicas y filogenéticas que podrían ser importantes para reconstruir la filogenia de las especies de *Gossypium*, y de este modo contribuir a interpretar la evolución del picudo del algodón. No obstante, estudios moleculares recientes contribuyeron a demostrar hipótesis previas con respecto al origen de las especies con genomas A-D (Phillips, 1963; Fryxell, 1965) a través de la hibridación de ancestros diploides distribuidos en Asia y Africa (genomas A) y en los trópicos y subtrópicos de América (genoma D) (Wendel & Cronn, 2002). La edad de los aloploidos, estimada en base a un reloj molecular es de 2-1 millones de años, pero sus ancestros serían anteriores. La especie más basal de genoma D es *G. raimundii* (Ecuador y Perú), y después *G. gossypoides* (Oaxaca, México), considerada el descendiente viviente más cercano de los aloploidos, ya que tiene repeticiones de genoma A-D (Wendel *et al*, 1995; Zhao *et al*, 1998; Small & Wendell, 2000). Toda esta información indicaría que

los aloploidos como *G. hirsutum* y *G. barbadense*, dos de los principales huéspedes del picudo, se habrían originado hace más tiempo que lo que se postulaba en un principio, y la mayor amplitud temporal de la presencia de los huéspedes permite explicar también la presencia del picudo en vastas áreas del continente, en forma natural.

El supuesto de una antigua e ininterrumpida asociación de *A. grandis* con *Gossypium*, desde el Plio-Pleistoceno hasta la actualidad, contribuye a explicar por qué se ha convertido en la plaga más dañina del algodón en América. Cuando la especie alcanzó su mayor rango de expansión natural, a fines del Pleistoceno, podría haber comenzado la evolución de las distintas variedades de *Gossypium*, en respuesta a los cambios climáticos de la transición Pleistoceno-Reciente (Fryxell, 1965). Los estados más tempranos de domesticación del algodón habrían comenzado poco después, hace aproximadamente 9000-7000 años, en las áreas costeras de México (MacNeish, 1964; Smith & MacNaich, 1964; Brubaker & Wendel 1994), estando las variedades de algodón silvestre y primitivamente cultivado en proximidad geográfica.

Después de la colonización de América, la práctica de la agricultura y el comercio se incrementaron, y se expandió el uso de algunas especies de *Gossypium* y otras *Gossypiae* como plantas ornamentales (*Thespesia polpunea*) o plantas de uso doméstico (*G. barbadense*) (Fryxell, 1979; Manessi, 1997). Durante las últimas dos décadas hubo una extensiva deforestación de selvas y bosque xerófilos, que se reemplazaron por campos de algodón y otros cultivos, particularmente en las áreas de Argentina, Brasil y Paraguay, donde el picudo alcanzó su mayor dispersión y densidades poblacionales (Scataglini *et al.*, 2000).

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

El estudio filogeográfico aquí presentado permite establecer importantes conclusiones y al mismo tiempo abre muchas preguntas con respecto a la historia evolutiva del picudo del algodónero.

Las principales conclusiones son:

- *A. grandis* sería una especie naturalmente distribuida en América desde el Plio-Pleistoceno, ocurriendo desde América Central y noreste de México hasta las selvas tropicales y subtropicales de América del Sur.
- Durante los ciclos fríos-secos del Pleistoceno algunas poblaciones del picudo habrían evolucionado en fragmentos remanentes de dichas selvas, reestableciendo contacto durante los ciclos húmedo-cálidos. El tiempo de aislamiento geográfico entre ellas no habría sido suficientemente prolongado para alcanzar aislamiento reproductivo, sin embargo se observa un alto grado de diferenciación y divergencia genética entre algunas poblaciones ubicadas en áreas marginales de la distribución de la especie (ej. la del Parque Nacional Iguazú y la población mexicana de Tamaulipas). De no haber mediado flujo génico con picudos provenientes de zonas algodonerías, es probable que estas poblaciones marginales se hubieran diferenciado al menos hasta el nivel de subespecies. Una situación similar se ha descrito para la denominada “forma thurberia” del picudo, típica del desierto de Arizona.
- Las plantas hospederas de Gossypieae adaptadas a ambientes litorales pudieron jugar un importante papel en la dispersión del insecto, especialmente durante el Pleistoceno medio, cuando las áreas costeras eran más amplias que en la actualidad, debido al descenso del nivel del mar. Las poblaciones que se adaptaron a los ambientes más xéricos pudieron colonizar y expandir su rango a través de nuevas áreas de vegetación xerofítica, formadas durante los ciclos áridos de dicho período geológico (ej. Catinga, Cerrado y Chaco en América del Sur).
- La asociación entre *Anthonomus grandis* y las especies de Gossypieae distribuidas en América, tales como *G. hirsutum*, *G. barbadense* y especies del género *Cienfuegosia* es probablemente mucho más antigua que lo que se ha

estimado previamente a este estudio. La deforestación de las selvas tropicales y subtropicales de América del Sur, el cultivo extensivo del algodón y el uso frecuente de algunas plantas hospederas como ornamentales o domésticas, habrían sido responsables del incremento de las densidades poblacionales del picudo en Brasil, Paraguay y Argentina durante las últimas dos décadas. A este hecho pudo haberse sumado la introducción de picudos desde EE.UU. debido a actividades comerciales, como lo sugiere la presencia del haplotipo A en Texas y en vastas zonas algodoneras de América del Sur.

Sin ninguna duda, el uso de genes mitocondriales en filogeografía provee una excelente herramienta para investigar la evolución de una de las plagas de insectos más dañinas en América. Para proporcionar mayores evidencias a favor de la hipótesis de ocurrencia natural del picudo en América del Sur, es preciso continuar con el estudio de poblaciones de zonas intermedias entre México y la Argentina aun no examinadas, como por ejemplo muestras de países de América Central, Colombia, Bolivia y Noroeste de Brasil. Estos estudios deben estar acompañados por una extensa investigación de la filogenia de las especies relacionadas con *A. grandis* y por estudios filogeográficos de sus plantas hospederas. Sólo de esta manera será posible proponer un escenario completo de la historia evolutiva del picudo del algodonerero en América.

CAPÍTULO V

Bibliografía

1. LITERATURA CITADA

- Ab'Sáber, A. N. (1977). Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na America do Sul, por ocasião dos períodos glaciais Quaternários. *Paleoclimas*, Univ. São Paulo, Inst. de Geografia 3: 1-19.
- Ahmad, M. & Burke, H. R. (1972). Larvae of the weevil tribe Anthonomini (Coleoptera: Curculionidae). *Misc. Publ., Entomol. Soc. Am.* 8(2): 33-81.
- Alonso-Zarazaga, M. A. & Lyal, C. H. C. (1999). *A world catalogue of families and genera of Curculionoidea (Insecta: Coleoptera)*. Entomopraxis S.C.P., Spain, 315 pp.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Avise, J. C., Arnold, J. & Ball, R. M. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avise, J. C. & Walker, D. (1998). Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 265: 457- 463.
- Axelrod, D. I. (1950). *Studies in late Tertiary paleobotany*. Carnegie Inst. Wash., Publ. 590.
- Axelrod, D. I. (1958). Evolution of the Madro-Tertiary flora. *Bot. Rev.* 24: 433- 509.
- Becerra, J. K. & Venable, L. (1999). Macroevolution of insect-plant associations. The relevance of host biogeography to host association. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 96: 12626- 12631.
- Bensansson, D., Zhang, D. & Hewitt, G. M. (2000). Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Mol. Biol. Evol.* 17(3): 406-415.
- Bernays, E. A. & Chapman, R. F. (1994). *Host-plant selection by Phytophagous Insects*. Chapman and Hall, New York.
- Bremer, K. (1990). Combinable component consensus. *Cladistics* 6: 369-372.
- Bremer, K. (1994). Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 235-304.

- Brewer, M. M. & Varas, D. L. (1973). Contribución al conocimiento de la sistemática y comportamiento de los gorgojos (Coleoptera: Curculionidae) perjudiciales para la alfafa. *Rev. Inv. Agr.* 10 (1): 55-97 INTA, Buenos Aires.
- Brooks, D. R. & McLennan, D. A. (1991). *Phylogeny, ecology and behaviour. A research program in comparative biology*. Univ. Chicago Press, 434 pp.
- Brower, A. V. Z. (2000). Homology and the inference of systematic relationship: some historical and philosophical perspectives. Chapter 1, *in*: R. Seatland & R. T. Pennington (eds.), *From Homology and Systematics*, London (Systematics Association, special volume n° 58).
- Brubaker, C. L. & Wendel, J. F. (1994). Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*: Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Am. J. Bot.* 81: 1309-1326.
- Brussard, P. E. (1984). Geographic patterns and environmental gradients: the central-marginal model revisited. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 25-64. Buchanan, L. L. (1939). The species of *Pantomorus* of America North of Mexico. *U. S. Dep. Agric., Misc. Publ.* 341: 1-39.
- Buchanan, L. L. (1939). The species of *Pantomorus* of America North of Mexico. *U. S. Dep. Agric., Misc. Publ.* 341: 1-39.
- Burke, H. R. (1968). Geographic variation and taxonomy of *Anthonomus grandis* Boheman. Dept. Entomol., Texas A. & M. Univ.
- Burke, H. R. & Cate, J. R. (1979). A new species of Mexican *Anthonomus* related to the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72: 189-192.
- Burke, H. R. & Clark, W. E. (1976). *Cienfuegosia drumondii* as a host of the boll weevil, *Anthonomus grandis* Boheman, in south Texas. *Proceedings Boll Weevil Suppression, Management and Elimination Technology*, pp.13-15.
- Burke, H. R. & Cross, W. H. (1966). A new species of *Anthonomus* attacking cotton in Colombia, with a review of the taxonomy of *Anthonomus vestitus* (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 59(5): 924-931.
- Burke, H. R., Clark, W. E., Cate, J. R. & Fryxell, P. A. (1986). Origin and dispersal of the boll weevil. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 32: 228-238.
- Cabrera, A. L. & Willink, A. (1980). *Biogeografía de América Latina*. 2nd. ed., Serie de Biología, Sec. Gral. OEA, Washington, D. C.
- Carpenter, J. (1988). Choosing among multiple equally parsimonious cladograms. *Cladistics* 4: 291-296.

- Carpenter, J. (1994). Successive weighting, reliability and evidence. *Cladistics* 10: 215-220.
- Chippindale, P. T. & Weins, J. J. (1994). Weighting, partitioning and combining characters in phylogenetics analysis. *Syst. Biol.* 43: 278-287.
- Cigliano, M. M. & Morrone, J. J. (2000). Cladistic methods to analyze adaptations. *Folia Entomol. Mex.* 110: 113-124
- Clary, D. O. & Wolstenholme, D. R. (1985). The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yacuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22: 252- 271.
- Coad, B. R. (1915). Relation of the Arizona wild cotton weevil to cotton planting in the arid west. *US Dep. Agric. Bull.* 233, 12 pp.
- Confalonieri, V.A., Scataglini, M. A. & Remis, M I. (2002). Sequence differentiation among inversion rearrangements are revealed by RAPD markers in the grasshopper *Trimerotropis pallidipennis* (Orthoptera). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95 (2): 201-207.
- Confalonieri, V. A., Sequeira, A. S., Todaro L. & Vilardi, J. C. (1998). Mitochondrial DNA phylogeography of the grasshopper *Trimerotropis pallidipennis* in relation to clinal distribution of chromosome polymorphisms. *Heredity* 81: 444- 452.
- Crandall, K. A. & Templeton, A. R. (1996). Applications of intraspecific phylogenetics. Pp. 88-99, in P. H. Harvey, A. J. L. Brown, J. Maynard Smith and S. Nee (eds). *New uses for new phylogenetics*. Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.
- Cross, W. H., Lukefahr, M. J., Fryxell, P. A. & Burke, H. R. (1975). Host plants of the boll weevil. *Environ. Entomol.* 4: 19-26.
- De Pinna, M. C. C. (1991). Concepts and tests of homology in the cladistics paradigm. *Cladistics* 7: 367-394.
- De Queiroz, A. (1993). For consensus (sometimes). *Syst. Biol.* 42: 368-372.
- Dice, L. R. (1943). *The biotic provinces of North America*. Ann Arbor Univ. of Michigan Press, Michigan.
- Donn, W. L., Farrand, W. R. & Ewing, M. (1962). Pleistocene ice volumes and sea-level lowering. *Jour. Geol.* 63: 538- 578.
- Farris, J. M. (1969). A successive approximations approach to character weighting. *Syst. Zool.* 18: 374-385.
- Farris, J. M. (1970). Methods for computing Wagner trees. *Syst. Zool.* 19: 83-92.

- Farris, J. M. (1988). HENNIG86, Program and Documentation. Port Jefferson Station, New York.
- Farris, J. S. (1989). The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417-419.
- Farris, J. M., Källersjö, M., Kluge, A. G., and Bult, C. (1994). Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.
- Felsenstein, J. (1978). Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.* 27: 401-410.
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* 22: 521- 565.
- Fitch, W. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20: 406-416.
- Fowler, S. V. & Lawton, J. H. (1982). The effects of host-plant distribution and local abundance on the species richness of agromyzid flies attacking British umbellifers. *Ecol. Entomol.* 7: 257-265.
- Fryxell, P. A. (1965). Stages in the evolution of *Gossypium* L. *Adv. Front. Plant. Sci.* 10: 31-56.
- Fryxell, P. A. (1979). *The natural history of the cotton tribe* (Malvaceae, tribe Gossypieae). Texas A. & M. Univ., College Station and London.
- Fryxell, P. A. & Lukefahr, M. J. (1967). *Hampea* Schlecht: possible primary host of the cotton boll weevil. *Science* 155: 1568-1569.
- Goloboff, P. (1991). Homoplasy and the choice among cladograms. *Cladistics* 7: 215-232.
- Goloboff, P. (1993). Estimating character weights during tree search. *Cladistics* 9: 83-91.
- Goloboff, P. (1996). Methods for faster parsimony analysis. *Cladistics* 12: 199-220.
- Goloboff, P. (1997). PIWE: Parsimony and Implied Weights. Version 3.0. Publicado por el autor. Tucumán, Argentina.
- Goloboff, P. (1998a). *Principios Básicos de Cladística*. Editado por la Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires, 81pp.
- Goloboff, P. (1998b). SPA: Sankoff Parsimony Analysis. Version 1.9. Publicado por el autor. Tucumán, Argentina.
- Goloboff, P. (1999). NONA Version 2.0. Publicado por el autor. Tucumán, Argentina.

- Gutiérrez, M., Ricciardi, A. A., Vrdoljak, J., Galván, A. C. A. & Carnevali, R. (1960). Algodones barbadenses indígenas de la Argentina. Recolección de material y formación de una colección. Bol N° 8, INTA, Centro Regional Chaqueño, Argentina, pp. 1-50.
- Guzmán, N. (2004) Picudo del algodón: divergencia genética y flujo génico entre poblaciones coleccionadas sobre plantas nativas y cultivos de algodón. Seminario de Licenciatura, Universidad de Buenos Aires.
- Haffer, J. L. (1977). Pleistocene speciation in Amazonian birds. *Amazonia* 6: 161- 192.
- Haffer, J. L. (1982). General aspects of the refuge theory. Pp. 6- 24, *in*: Prance, G. T. (ed.), *Biological diversification in the tropics*. Columbia Univ. Press, New York.
- Harcourt, D. G., Aragón, J. R. & González, R. (1986). Plagas de la alfalfa. *In*: Barrigi *et al.* (eds.), *Investigación, tecnología y producción de alfalfa..* Colección Científica del INTA, Tomo XXII, Buenos Aires, 488 pp.
- Hardwick, S., Armstrong, K. F., Wratten, S. D. & Prestidge, R. A. (1997). Genetic comparison of whitefringed weevil species and populations by RAPD-PCR. *Proc. 50th N. Z. Plant Protection Conf.* 1997, 327-332.
- Hennig, W. (1966). *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
- Hey, J. (1994). Bridging phylogenetics and population genetics with gene tree models. Pp. 435-449, *in*: Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P. & DeSalle, R. (eds.), *Molecular Ecology and Evolution: Approach and Applications*, Birkhäuser Verlag, Basel.
- Higgins, D. G. & Sharp, P. M. (1989). Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Computer Applic. Biosci.* 5: 151-153.
- Howland, D. E. & G. M. Hewitt. (1995). Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data. *Insect Mol. Biol.* 4(3): 203-215.
- Hudson, R. R. (1990) Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* 7: 1-44.
- Huigens, M. E., Luck, R. F., Klaassen, R. H. G., Maas, M. F. P. M., Timmermans, M. J. T. N., & Stouthamer, R. (2000). Infectious parthenogenesis. *Nature* 405: 178-179.
- Hustache, A. (1947). Naupactini de l'Argentine et des régions limitrophes (Col. Curculion.). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 13(1-5): 3-146.
- Hutchinson, J. B., Silow, R. A. & Stephens, S. G. (1947). The evolution of *Gossypium*. Oxford Univ. Press, London, U.K.

- Itria, C. D. (1964). Los gorgojos de la alfalfa. Grandes plagas de los alfalfares de la región semiárida. *Cir. Ext.* 21, Est. Exp Agr. Anguil, INTA.
- Iturralde-Vinent, M. & MacPhee, R. D. E. (1996). The age and paleogeographical origin of Dominican amber. *Science* 273: 1850-1852.
- Jones, R. W. (2001). Evolution of the host plant associations of the *Anthonomus grandis* species group (Coleoptera: Curculionidae): Phylogenetic test of various hypothesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94(1): 51- 58.
- Jones, R. W. & Burke, H. R. (1997). New species and host plants of the *Anthonomus grandis* species group (Coleoptera: Curculionidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 99(4): 705-719.
- Jones, R. W., Fryxell, P. A. & Baro, D. M. (1997). Phylogenetic analysis of the genus *Hampea* (Malvales: Malvaceae: Gossypiae). *An. Inst. Biol. UNAM, Ser. Bot.* 68(1): 21-42.
- Juan, C., Oromi, P. & Hewitt, G. M. (1995) Mitochondrial DNA phylogeny and sequential colonization of Canary Islands by darkling beetles of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae). *Proc. R. Soc. B.* 261: 173-180.
- Källersjö, M., Albert, V. A. & Farris, J. S. (1999) Homoplasy increases phylogenetic structure. *Cladistics* 15: 91-93.
- Kluge, A. G. (1989). A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis for relationships among *Epicrates* (Boidae: Serpentes). *Syst. Zool.* 38: 1-25.
- Kluge, A. G. & Farris, J. S. (1969). Quantitative phyletics and the evolutions of anurans. *Syst. Zool.* 18: 1-32.
- Krapovickas, A. (2000). El género *Cienfuegosia* y el “picudo del algodónero” al sur del trópico, en América del Sur. *III International Workshop on: Integrated Pest Management of the Cotton Boll Weevil in Argentina, Brazil and Paraguay*, Workshop Proceedings p. 43.
- Kumar, S., Tamura, K., Jacobsen, I. & Nei, M. (2001). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). Version 2.1.
- Kuschel, G. (1969). Biogeography and ecology of South American Coleoptera. Vol. 2: 624-658, in: E. Fittkau, J. J. Illis, H. Klinge, G. H. Schwabe and H. Sioli. (eds.) *Biogeography and Ecology of South America*, Junk N. V. Publishers, T. Hague.
- Langor, D. W. & F. A. H. Sperling (1997). Mitochondrial DNA sequence divergence in weevils of the *Pissodes strobi* species complex (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Mol. Biol.* 6(3): 255-265.

- Lanteri, A. A. (1981). Estudio comparativo de las estructuras genitales en la tribu Naupactini. Los caracteres a nivel genérico de *Naupactus* Schönherr, *Teratopactus* Heller y *Trichonaupactus* Hustache (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 40 (1-4): 273-278.
- Lanteri, A. A. (1984). Revisión sistemática del género *Eurymetopus* Schoenherr (Coleoptera: Curculionidae) mediante la aplicación de técnicas numéricas. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 43(1-4): 247-281.
- Lanteri, A. A. (1986). Revisión del género *Asynonychus* Crotch (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Asoc. Cs. Nat. Litoral* 17(2): 161-174.
- Lanteri, A. A. (1990). Systematic revision and cladistic analysis of *Phacepholis* Horn. *Southwest. Entomol.* 15(2): 179-204.
- Lanteri, A. A. (1993). La partenogénesis geográfica y la sinonimia de *Asynonychus cervinus* (Boheman) y *A. godmanni* Crotch (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 52(1-4): 100.
- Lanteri, A. A. (dir.) (1994). *Bases para el control integrado de los gorgojos de la alfalfa*. De la Campana Ediciones, La Plata, 119 pp.
- Lanteri, A. A. (1995a). Análisis cladístico y evolución de la partenogénesis en el grupo de *Pantomorus auripes* (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 54(1-4): 17-24.
- Lanteri, A. A. (1995b) La sistemática filogenética y los conceptos de especie. *Mendeliana* 11(1): 37-43.
- Lanteri, A. A. & Confalonieri, V. A. (2003). Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. Pp. 185-193, in: J. Llorente Bousquets & J. J. Morrone (eds.). *Una perspectiva latinoamericana de la Biogeografía*. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Lanteri, A. A., & Díaz, N. B. (1994). Systematic study and cladistic analysis of the genus *Aramigus* (Coleoptera: Curculionidae). *Trans. Am. Entomol. Soc.* 120(2): 113-144.
- Lanteri, A. A., & Loíacono, M. S. (1990). Systematic study of the *Pantomorus viridisquamosus* species group (Coleoptera: Curculionidae). *Insecta Mundi* 4(1-4): 1-10.
- Lanteri, A. A., & Marvaldi, A. E. (1995). *Graphognatus* Buchanan, a new synonym of *Naupactus* Dejean, and systematics of the *N. leucoloma* species group (Coleoptera: Curculionidae). *The Coleopt. Bull.* 49 (3): 206-228.

- Lanteri, A. A. & Morrone, J. J. (1995). Cladistics of the *Naupactus leucoloma* species group, *Atrichonotus*, and *Eurymetopus* (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 54(1-4): 99-112.
- Lanteri, A. A. & Normark, B. B. (1995). Parthenogenesis in the tribe Naupactini (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88(6): 722-731.
- Lanteri, A. A. & O'Brien, C. W. (1990). Taxonomic revision and cladistic analysis of *Atrichonotus* Buchanan (Coleoptera: Curculionidae). *Trans. Am. Entomol. Soc.* 116(3): 697-725.
- Lanteri, A. A., Díaz, N. B., Loíacono, M. S. & Marvaldi, A. E. (1997). Gorgojos perjudiciales a los cultivos de trigo en Argentina (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 56 (1-4): 77-89.
- Lanteri, A. A.; Díaz, N. B. & Ortiz Jaureguizar, E. (1989). Análisis multivariado y congruencia taxonómica en la delimitación de los géneros *Asynonychus* Crotch y *Aramigus* Horn (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Asoc. Cs. Nat. Del Litoral.* 21(1-2): 41-56.
- Lanteri, A. A., Guedes, J. C., & Parra, J. R. P. (2002 b). Weevils injurious for roots of citrus in São Paulo, Brazil. *Neotropical Entomol.* 31(4): 561-569.
- Lanteri, A. A., Loíacono, M. S., Coscarón, M. del C., & Díaz, N. B. (1991(90)). Estudio sistemático del grupo de especies afines a *Pantomorus auripes* Hustache (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 49(1-4): 3-16.
- Lanteri, A. A., Loíacono, M. S. & Marvaldi, A. E. (2002 c). *Anthonomus* (Coleoptera: Curculionidae) asociados con el algodón en la Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 61(3-4): 24-26.
- Lanteri, A. A., Marvaldi, A. E., & Suárez, S. M. (2002 a). *Gorgojos de la Argentina y sus plantas huéspedes. Tomo I: Apionidae y Curculionidae*. Public. Especial, Soc. Entomol. Argent. 98 pp.
- Leu, S. J. ; Li, J. K. & Hsiao, T. H. (1989). Characterization of *Wolbachia postica* the cause of reproductive incompatibility among alfalfa weevil strains. *J. Invert. Pathol.* 54, 248- 259.
- Lindgren, B. W. (1962). *Statistical Theory*. MacMillan, New York.
- Liu, H. & Beckenbach, A. (1992). Evolution of the Cytochrome Oxidase II gene among 10 orders of insects. *Mol. Phyl. Evol.* 1: 41-52.

- Lunt, D. H., Zhand, D. X., Szymura, J. M. & Hewitt, G. M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* 5(3): 153-165.
- Lunt, D. H., Ibrahim, K. & Hewitt, G. (1998). mtDNA phylogeography and postglacial patterns of subdivision in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Heredity* 80: 633-641.
- MacNeish, R. S. (1964). The food gathering and incipient agriculture stage of prehistoric Middle America. Pp. 413-426, in: R. C. West (ed.), *Handbook of Middle American Indians*, vol. 1, Univ. of Texas, Austin.
- Mander, C. V., Phillips, C. B., Glare, T. R. & Chapman, R. B. (2003). Preliminary assessment of COI and ITS1 Sequence variation in fuller's rose weevil. *New Zealand Plant Protection* 56: 190-193.
- Manessi, O. G. (1997). *Anthonomus grandis* Boh. *El picudo del algodonoero. La super plaga*. FULCPA, Buenos Aires.
- Marvaldi, A. E.; Sequeira, A. & Farrell, B. D. (2002). Molecular and morphological phylogenetics of weevils (Coleoptera: Curculionoidea): Do niche shifts accompany diversification? *Systematic Biology* 51(5), 761-785.
- Mickevich, M. F. & Farris, J. S. (1981). The implications of congruence in *Menidia*. *Syst. Zool.* 30: 315-370.
- Morrone, J. J. (1999). The species of Entiminae (Coleoptera: Curculionidae) ranged in America south of the United States. *An. Inst. Biol. UNAM, ser. Zool.* 76(2): 99-168.
- Morrone, J. J. (2000). What is the Chacoan subregion?. *Neotropica* 45: 51-68.
- Morrone, J. J. (2001). The Parana subregion and its provinces. *Physis (Buenos Aires)* 58(134-135): 1-7.
- Morrone, J. J. (2002). Presentación sintética de un nuevo esquema biogeográfico de América Latina y el Caribe. Pp. 267-275, in: C. Costa, S. A. Vanin, J. M. Lobo and A. Melic (eds.) *Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática*, PrIbes 2002, España.
- Morrone, J. J. & Lanteri, A. A. (1991(90)). Ubicación sistemática y variación intraespecífica de *Pantomorus ruizi* (Bréthes) (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 49(1-4): 17-26.

- Nelson, G. (1979). Cladistic analysis and synthesis: principles and definitions, with a historical note on Adanson's "Families des plantes" (1763-1764). *Syst Zool* 28: 1-21.
- Nixon, K, and Carpenter, J. M. (1996). On simultaneous analysis. *Cladistics* 12: 221-241.
- Nixon, K. C. (2002). WinClada v1.00.08. Publicado por el autor, Ithaca, New York.
- Normak, B. B. (1994). "Phylogeny and evolution of parthenogenesis in the *Aramigus tessellatus* complex (Coleoptera: Curculionidae)". Ph. D. dissertation, Cornell University, Ithaca, NY.
- Normark, B. B. (1996a). Phylogeny and evolution of parthenogenetic weevils of the *Aramigus tessellatus* species complex (Coleoptera: Curculionidae: Naupactini): Evidence from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* 50: 734-745.
- Normark, B. B. (1996b). Polyploidy of parthenogenetic *Aramigus tessellatus* (Coleoptera: Curculionidae). *The Coleopt. Bull.* 50(1): 73-79.
- Normark, B. B. & Lanteri, A. A. (1996). *Aramigus uruguayensis* (Coleoptera: Curculionidae), a new species based on mitochondrial DNA and morphological characters. *Entomol. News* 107(5): 311-316.
- Normark, B. B., & Lanteri, A. A. (1998). Incongruence between morphological and mitochondrial DNA characters suggests hybrid origins of parthenogenetic weevil lineages (genus *Aramigus*). *Syst. Biol.* 47(3): 475-494.
- O'Brien, C. W. & Wibmer, G. (1982). Annotated checklist of the weevils (Curculionidae *sensu lato*) of North America, Central America, and the West Indies (Coleoptera: Curculionoidea). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 34, 382 pp.
- Peleg, B. & Norris, D. M (1972 a). Bacterial symbiote activation of insect parthenogenetic reproduction. *Nature New Biol.* 236, 111-112.
- Peleg, B. & Norris, D. M (1972 b). Symbiotic interrelationships between microbes and ambrosia beetles. *J. Invertebr. Pathol.* 20, 59-65.
- Phillips, G. F. (1963). The cytogenetics of *Gossypium* and the origin of New World cottons. *Evolution* 17: 460- 469.
- Platnick, N. (1989). An empirical comparison of microcomputer parsimony programs II. *Cladistics* 5: 145-161.
- Prado, D. E. & Gibbs, P. E. (1993). Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Ann. Miss. Bot. Garden* 80(4): 903-927.
- Prance, G. T. (ed.). (1982). *Biological diversification in the tropics*. Columbia Univ.

- Press, New York.
- Raven, P. H. (1963). Amphitropical relationships in the floras of North and South America. *Quatern. Rev. Biol.* 38: 151-177.
- Raven, P. H. & Axelrod, D. I. (1975). History of the flora and fauna of Latin America. *Am. Scient.* 63(4): 420-429.
- Reiss, R. A., Schwert, D. P., & Ashworth, A. C. (1995). Field preservation of Coleoptera for molecular genetics analyses. *Environ. Entomol.* 24(3): 716-719.
- Roderick, G. K. & Gillespie, R. C. (1998). Speciation and phylogeography of Hawaiian terrestrial arthropods. *Mol Ecol.* 7: 519-531.
- Rodriguero M. S., Guzman, N. V., Lanteri, A. A. & Confalonieri, V. A. (2004). Presencia de *Wolbachia* en poblaciones de *Asynonychus cervinus* (Coleoptera, Curculionidae): origen de la partenogénesis telitóquica en una especie bisexual. *Journal of Basic and Applied Genetics* 16: 140.
- Roehrdanz, R. L. (2001). Genetic differentiation of Southeastern boll weevil and Thurberia weevil populations of *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) using mitochondrial DNA. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94(6): 928-935.
- Roehrdanz, R. L. & North, D. T. (1992). Mitochondrial DNA restriction fragments variation and biosystematics of the boll weevil, *Anthonomus grandis*. *Southwest. Entomol.* 17(2): 101-108.
- Rohlf, F. J. (1982). Consensus indices for comparing classifications. *Math. Biosci.* 59: 131-144.
- Saiki, R. K. (1988). Amplification of genomic DNA. Pp.13-20, in: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Smasky & T. J. White (eds.). *PCR Protocols*, Academic Press, San Diego.
- Saura, A., Lokki, J., & Suomalainen, E. (1993). Origin of Polyploidy in Parthenogenetic weevils. *J. theor. Biol.* 163: 449-456.
- Scataglini, M. A., Confalonieri, V. A. & Lanteri, A. A. (2000). Dispersal of the cotton boll weevil in South America: evidence of the RAPD's analysis. *Genetica* 108: 127-136.
- Schoonhoven, L., T. Jermy & Van Loon, J. J. A. (1998). *Insect-plant biology*. Chapman and Hall, London.

- Sequeira, A., Lanteri, A. A., Scataglini, M. A., Confalonieri, V. A., & Farrell, B. (2000). Are flightless *Galapaganus* weevils older than the Galápagos Islands they inhabit? *Heredity* 85: 20-29.
- Simpson-Vuilleumier, B. (1971). Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science* 173: 771-780.
- Small, R. L. & Wendel, J. F. (2000). Phylogeny, duplication and intraspecific variation of *Adh* sequences in New World diploid cottons (*Gossypium* L., Malvaceae). *Mol. Phyl. Evol.* 16(1): 73- 84.
- Smith, C. E. Jr. & MacNeish, R. S., (1964). Antiquity of American poliploid cotton. *Science* 143 (3607): 675-676
- Sorenson, M. D., & Fleischer R. C. (1996). Multiple independent transposition of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15239-15243.
- Suomalainen, E. ; Saura, A. & Lokki, J. (1987). Cytology and evolution in parthenogenesis. CRC, Boca Ratón, Fl.
- Swofford, D. L. (1985). PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. v.2.4. Illinois Natural History Survey, Champaign.
- Swofford, D. L. (1998) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. v. 4. Sinauer Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Swofford, D. L., Olsen, G., Wadell, P. J. & Hillis, D. M. (1996). Phylogenetic inference. Pp. 407-514, *in*: D. M. Hillis, C. Moritz, & B. K. Mable (eds.), *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tomiuk, J. & Loeschke, V. (1992). Evolution of parthenogenesis in the *Otiorrhynchus scaber* complex. *Heredity* 68: 391-397.
- Townsend, C. H. T. (1895). Report of the Mexican cotton boll weevil in Texas (*Anthonomus grandis* Boheman). *Insect life* 7(4): 295-309.
- Vandel, A. (1928). La parthénogénèse géographique: contribution à l'étude biologique et cytologique de la parthénogénèse naturelle. *Bull. Biol. France Belgique* 61: 93-125.
- Vanzolini, P. E. & Williams, E. E. (1970). South American anoles: geographic differentiation and evolution of the *Anolis chrysolepis* species group (Sauria, Iguanidae). *Arq. Zool.*, São Paulo 19: 1-298.

- Wendel, J. F., Schnabel, A. & Seelanan, T. (1995). An unusual ribosomal DNA sequence from *Gossypium gossypoides* reveals ancient, cryptic, intergenomic introgression. *Mol. Phyl. Evol.* 4: 298- 313.
- Wendel, J. F. & Cronn, R. C. (2002). Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Adv. Agron.* 87: 139-186.
- Werren, J. H. (1998). Wolbachia and speciation. Pp. 245-260, in D. Howard and S Berlocher eds. *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press.
- Werren, J. H.; Zhang, W. & Guo, L. R. (1995). Evolution and Phylogeny of Wolbachia Bacteria: Reproductive Parasites of Arthropods. *Proc. Royal Soc. London B* 26, 55-71.
- Wheeler, W. C. (1995). Sequence alignment, parameter sensitivity, and the phylogenetic analysis of molecular data. *Syst. Biol.* 44: 321-331.
- Wibmer, G. I., & O' Brien, C. W. (1986). Annotated checklist of the weevils (Curculionidae *sensu lato*) of South America (Coleoptera: Curculionidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 39, 563 pp.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18: 6531-6535.
- Zhang, D. X., & Hewitt G. M. (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *TREE* 11: 247 251.
- Zhao, X. P., Si, Y., Hanson, R. E., Crane, C. F., Price, H. J., Stelly, D. M., Wendel, J. F. & Patterson, A. H. (1998). Dispersal repetitions DNA has colonized new genomes since polyploid formation in cotton. *Genome Res.* 8: 479- 492.

2. PUBLICACIONES DEL PRESENTE TRABAJO

Los resultados presentados en este trabajo de tesis están publicados como:

- Scataglini, M. A., Confalonieri, V. A. & Lanteri, A. A. (2000). Dispersal of the cotton boll weevil in South America: evidence of the RAPD's analysis. *Genetica* 108: 127-136.
- Scataglini, M. A., Lanteri, A. A. & Confalonieri, V. A. (2005). Phylogeny of the *Pantomorus-Naupactus* Complex based on morphological and molecular data (Coleoptera: Curculionidae). *Cladistics*, en prensa.

- Scataglioni, M. A., Lanteri, A. A. & Confalonieri, V. A. (2005). Diversity of boll weevil populations in South America: a phylogeographic approach. En evaluación.