





**Universitat de les  
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL  
2014**

**FILOGENIA MOLECULAR, SISTEMÁTICA Y  
EVOLUCIÓN DE LOS CHRYSOMELINAE  
AUSTRALIANOS (COLEOPTERA,  
CHRYSOMELIDAE)**

**José Antonio Jurado Rivera**





**Universitat de les  
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL  
2014**

**Programa de Doctorado en Biología**

**FILOGENIA MOLECULAR, SISTEMÁTICA Y  
EVOLUCIÓN DE LOS CHRYSOMELINAE  
AUSTRALIANOS (COLEOPTERA,  
CHRYSOMELIDAE)**

**José Antonio Jurado Rivera**

**Director:  
Dr. Eduard  
Petitpierre Vall**

**Director:  
Dr. Jesús  
Gómez-Zurita Frau**

**Doctor por la Universitat de les Illes Balears**



## PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

**Jurado-Rivera JA**, Vogler AP, Reid CAM, Petitpierre E, Gómez-Zurita J (2009) DNA barcoding insect-host plant associations. *Proceedings of the Royal Society B* **276**:639-648.



## Resumen

La singularidad y diversidad de la fauna australiana han fascinado desde siempre a naturalistas y viajeros. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos realizados, nuestro conocimiento acerca de la historia natural de este rico patrimonio aún dista mucho de ser completo. El muy diverso grupo de los insectos australianos constituye un buen ejemplo donde la mayoría de las especies están aún por describir, y su origen en muchos casos permanece ignoto debido en parte a la carencia de estudios filogenéticos detallados. Entre ellos se encuentran los coleópteros crisomélidos de la subfamilia Chrysomelinae. Hasta la fecha se conocen en Australia unas 750 especies de crisomelinos repartidas en 43 géneros—30 de los cuales son exclusivos del continente—, y que se distribuyen por biomas tan dispares como el esclerófilo, el monzónico y el ombroclima húmedo. La ecología de este grupo de escarabajos es poco conocida y fragmentaria, pero la información disponible sugiere que se trata de especies fitófagas con un espectro trófico bastante restringido a una o varias especies de plantas emparentadas, destacando las interacciones tróficas con linajes vegetales muy diversificados en Australia como *Acacia* y *Eucalyptus*.

En el presente trabajo se profundiza en el conocimiento de la sistemática de la subfamilia Chrysomelinae poniendo un énfasis especial en la fauna australiana, mediante la inferencia de hipótesis filogenéticas basadas en secuencias de ADN. La filogenia molecular permite el establecimiento de un sistema de clasificación supragenérico para la subfamilia Chrysomelinae: tribus Timarchini y Chrysomelini. La tribu Chrysomelini se puede a su vez dividir en varias subtribus, entre las que se incluyen Chrysomelina, Doryphorina, Phyllocharitina, Entomoscelina y Gonioctenina. Nuestros resultados se contrastan además con las propuestas sistemáticas clásicas para la subfamilia, sugiriendo la necesidad de revisiones y reorganizaciones taxonómicas para los géneros *Callidemum*, *Chalcolampra*, *Chrysolina*, *Paropsisterna*, *Paropsides* y *Peltoschema*. Por otro lado, nuestra hipótesis filogenética indica la parafilia de los crisomelinos australianos, por inclusión en el clado que los agrupa de linajes presentes en otras regiones biogeográficas. El origen de los linajes australianos se remonta al Eoceno, hace unos 42 Ma, cuando Australia aún formaba parte junto con la Antártida y Sudamérica de una única masa de tierra emergida, la provincia Weddeliana. El aislamiento tectónico de Australia hace 30 Ma y el subsiguiente cambio climático hacia condiciones más frías y secas contribuyeron a la diversidad actual del grupo. La información filogenética aquí analizada sugiere además que la historia evolutiva de los crisomelinos australianos está relacionada con la de sus plantas



hospedadoras: crisomelinos ancestrales con una alimentación adaptada a la vegetación esclerófila incipiente en los sistemas de *rainforest* secundaron a sus linajes hospedadores en la colonización del nuevo entorno semiárido tras la contracción de estos bosques.

También indagamos en los procesos que podrían haber promovido la diversificación de Chrysomelinae en Australia, utilizando como caso de estudio 15 especies del género *Calomela*. Presentamos la primera hipótesis filogenética molecular para el género, estableciendo que su origen se remonta a los primitivos sistemas de bosque pluvial que dominaban el continente en el Oligoceno tardío, y donde ya empezaban a diferenciarse las primeras formaciones vegetales esclerófilas. La diversificación de sus linajes responde a un patrón logístico dependiente de la densidad, con fases de aceleración estimuladas por episodios de cambio climático y transformaciones fisiográficas. La estrecha relación trófica con las plantas del género *Acacia* parece existir desde el inicio de la diversificación de *Calomela*. El aislamiento genético de las poblaciones de especies propias de *rainforests* pone de manifiesto una baja capacidad dispersiva en estos taxones. La información filogenética permite además seleccionar una serie de caracteres morfológicos con utilidad taxonómica a niveles sistemáticos profundos. Se demuestra también que las secuencias tanto de *cox1* como de ITS2 garantizan la determinación directa e inequívoca de las especies de *Calomela* que hemos estudiado.

Finalmente, en un intento de ampliar nuestros conocimientos sobre la ecología de los Chrysomelinae australianos, proponemos un método robusto y eficaz para inferir la dieta de los insectos fitófagos desde una perspectiva filogenética. La técnica consiste en la amplificación mediante PCR y secuenciación de ADN vegetal cloroplástico (intrón *trnL*) a partir de extracciones de ADN del cuerpo completo de los insectos, y por tanto, potencialmente ingerido como dieta. Para la identificación taxonómica de estas secuencias impulsamos el uso de métodos filogenéticos con el fin de sobreponer algunas de las limitaciones relacionadas con sesgos en las bases de datos de referencia. El método se evalúa con éxito en un grupo de 10 especies de crisomelinos con alimentación conocida, para extenderlo posteriormente a 79 especies (25 géneros) de crisomelinos australianos, revelando la enorme diversidad trófica que estos coleópteros poseen, así como algunas tendencias evolutivas en su ecología.

## Summary

The uniqueness and diversity of Australian wildlife have long fascinated naturalists and travelers. However, our knowledge about the natural history of this rich heritage is still far from being complete. The highly diverse group of Australian insects is a case in which the majority of the species are yet to be described, and in many cases its origin remains unknown due in part to the lack of detailed phylogenetic studies. Among them are the leaf beetles in the subfamily Chrysomelinae. To date, ca. 750 Australian chrysomeline species have been described belonging to 43 genera –30 of which are unique to the continent–, inhabiting disparate biomes such as sclerophyllous, monsoonal, and aseasonal wet. The ecology of this beetle group is poorly understood and fragmentary, but the available information suggests that they are phytophagous species with a trophic spectrum restricted to few species of related plants, highlighting trophic interactions with diversified plant lineages in Australia, particularly *Acacia* and *Eucalyptus*.

This work contributes to the knowledge of the systematics of the subfamily Chrysomelinae with special emphasis on Australian taxa through inferring phylogenetic hypotheses based on DNA sequences. The molecular phylogeny allows the establishment of a suprageneric classification system for the Chrysomelinae subfamily: Timarchini and Chrysomelini tribes. The tribe Chrysomelini can in turn be divided into several sub-tribes, including Chrysomelina, Doryphorina, Phyllocharitina, Entomoscelina and Goniocetenina. Our results also contrast with the classical systematic proposals for the subfamily, suggesting the need for taxonomic reviews and reorganizations for the genera *Callidemum*, *Chalcolampra*, *Chrysolina*, *Paropsisterna*, *Paropsides* and *Peltoschema*. Furthermore, our phylogenetic hypothesis points to the paraphyly of the Australian chrysomelines, due to the inclusion in the clade of lineages from other biogeographic regions. The origin of Australian lineages dates back to the Eocene, ca. 42 Ma ago, when Australia was still connected to Antarctica and South America in a single landmass, the Weddellian province. The tectonic isolation of Australia ca. 30 Ma ago and the subsequent climate change to colder and drier conditions contributed to the current diversity of the group. The available phylogenetic information further suggests that the evolutionary history of the Australian Chrysomelinae is related to their host plants: ancestral chrysomelines that fed on the incipient sclerophyllous vegetation in rainforest tracked their host plant lineages in the colonization of the new semi-arid environment after the contraction of their habitats.

We also inquire into the processes that may have promoted the diversification of Chrysomelinae in Australia, using as a case study 15 *Calomela* species. We provide the first molecular phylogenetic hypothesis for the genus, stating that its origin dates back to the primitive rainforest systems dominating the continent in the late Oligocene, and where it first began the differentiation of the sclerophyllous vegetation. Lineage diversification reflects a logistic density-dependent model, with accelerations stimulated by episodes of climate and physiographic changes. The close trophic relationship with plant species of the genus *Acacia* seems to exist from the beginning of the diversification of *Calomela*. The genetic isolation detected in rainforest populations of *Calomela* reveals a low dispersive capacity in these taxa. The phylogenetic information here analyzed also allows us to select a number of morphological characters useful at deep taxonomic levels. Moreover, molecular data such as *cox1* and ITS2 DNA sequences also ensure direct and unambiguous taxonomic identification of the studied *Calomela* species.

Finally, we propose a robust and effective approach to infer phytophagous insects' diet from a phylogenetic perspective in an attempt to extend our knowledge on the ecology of Australian Chrysomelinae. The technique involves PCR amplification and sequencing of plant chloroplast DNA (*trnL* intron) from whole-body DNA extraction of herbivorous insects, that potentially also contains any plant DNA from diet. For taxonomic identification of diet plant sequences we promote the use of phylogenetic methods to overcome some of the biases associated with sequence comparisons from reference databases. The method is evaluated successfully in a group of 10 chrysomeline species with known host plants, and later we extend it to 79 species (25 genera) of Australian Chrysomelinae, revealing their enormous trophic diversity and some evolutionary trends in their ecology.

## Resum

La singularitat i diversitat de la fauna australiana han fascinat des de sempre a naturalistes i viatgers. No obstant això, i malgrat els esforços realitzats, el nostre coneixement sobre la història natural d'aquest ric patrimoni encara dista molt de ser complet. L'extraordinàriament divers grup dels insectes australians constitueix un bon exemple, en el que la majoria de les espècies estan encara per descriure, i el seu origen, en molts casos, roman ignot degut en part a la manca d'estudis filogenètics detallats. Entre ells es troben els coleòpters crisomèlids de la subfamília Chrysomelinae. Fins a la data es coneixen a Austràlia unes 750 espècies de crisomelins repartides en 43 gèneres –30 dels quals són exclusius del continent–, i que es distribueixen per biomes tan dispars com l'esclerofil·le, el monsonic i l'ombroclima humit. L'ecologia d'aquest grup d'escarabats és poc coneguda i fragmentària, però la informació disponible suggereix que es tracta d'espècies fitòfagues amb un espectre tròfic bastant restringit a una o diverses espècies de plantes emparentades, destacant les interaccions tròfiques amb llinatges vegetals molt diversificats a Austràlia com a *Acacia* i *Eucalyptus*.

En el present treball s'aprofundeix en el coneixement de la sistemàtica de la subfamília Chrysomelinae tot posant èmfasi especial en la fauna australiana, mitjançant la inferència d'hipòtesis filogenètiques basades en seqüències d'ADN. La filogènia molecular permet l'establiment d'un sistema de classificació supragenèric per a la subfamília Chrysomelinae: tribus Timarchini i Chrysomelini. La tribu Chrysomelini es pot dividir, al mateix temps, en diverses subtribus, entre les quals s'inclouen Chrysomelina, Doryphorina, Phyllocharitina, Entomoscelina i Gonioctenina. A més, els nostres resultats es contrasten amb les propostes sistemàtiques clàssiques per a la subfamília, suggerint la necessitat de revisions i reorganitzacions taxonòmiques per als gèneres *Callidemum*, *Chalcolampra*, *Chrysolina*, *Paropsisterna*, *Paropsides* i *Peltoschema*. D'altra banda, la nostra hipòtesi filogenètica indica la parafília dels crisomelins australians, degut a la inclusió en el clade que els agrupa de llinatges presents en altres regions biogeogràfiques. L'origen dels llinatges australians es remunta a l'Eocè, fa uns 42 Ma., quan Austràlia encara formava part, juntament amb l'Antàrtida i Amèrica del Sud, d'una única massa de terra emergida, la província Weddeliana. L'aïllament tectònic d'Austràlia fa uns 30 Ma. i el subsegüent canvi climàtic cap a condicions més fredes i seques varen contribuir a la diversitat actual del grup. La informació filogenètica aquí analitzada suggereix a més que la història evolutiva dels crisomelins australians està relacionada amb la de les seves plantes

nutricies: crisomelins ancestrals amb una alimentació adaptada a la vegetació esclerofil·la incipient en els rainforests van secundar als seus llinatges hostes en la colonització del nou entorn semi-àrid després de la contracció d'aquests boscos.

També investiguem els processos que podrien haver causat la diversificació de Chrysomelinae a Austràlia, utilitzant com a cas d'estudi 15 espècies del gènere *Calomela*. Presentem la primera hipòtesi filogenètica molecular per al gènere, establint que el seu origen es remunta als primitius sistemes de bosc pluvial que dominaven el continent en l'Oligocè tardà, i on ja començaven a diferenciar-se les primeres formacions vegetals esclerofil·les. La diversificació dels seus llinatges respon a un patró logístic dependent de la densitat, amb fases d'acceleració estimulades per episodis de canvi climàtic i transformacions fisiogràfiques. L'estreta relació tròfica amb les plantes del gènere *Acacia* sembla existir des de l'inici de la diversificació de *Calomela*. L'aïllament genètic de les poblacions d'espècies pròpies de *rainforest* posa de manifest una baixa capacitat de dispersió en aquests taxons. La informació filogenètica permet a més seleccionar una sèrie de caràcters morfològics amb utilitat taxonòmica a nivells sistemàtics profunds. Es demostra també que les seqüències tant de *cox1* com de ITS2 garanteixen la determinació directa i inequívoca de les espècies de *Calomela* que hem estudiat.

Finalment, en un intent d'ampliar els nostres coneixements sobre l'ecologia dels Chrysomelinae australians, proposem un mètode robust i eficaç per inferir la dieta dels insectes fitòfags des d'una perspectiva filogenètica. La tècnica consisteix en l'amplificació mitjançant PCR i seqüenciació d'ADN vegetal cloroplàstic (intró *trnL*) a partir d'extraccions d'ADN del cos complet dels insectes, i per tant, potencialment ingerit com a dieta. Per a la identificació taxonòmica d'aquestes seqüències impulsem l'ús de mètodes filogenètics amb la finalitat de sobreposar algunes de les limitacions relacionades amb biaixos en les bases de dades de referència. El mètode avaluà amb èxit en un grup de 10 espècies de crisomelins amb alimentació coneguda, per estendre-ho posteriorment a 79 espècies (25 gèneres) de crisomelins australians, revelant l'enorme diversitat tròfica que aquests coleòpters posseeixen, així com algunes tendències evolutives en la seva ecologia.





## ÍNDICE

<b>1.- Introducción</b> .....	1
1.1.- La seducción y el reto de la Biodiversidad en Australia .....	1
1.2.- Los Chrysomelinae australianos .....	2
1.3.- Sistemática molecular y filogenia de los Chrysomelinae australianos .....	6
1.4.- Escenario evolutivo: clima y vegetación en Australia.....	9
<b>2.- Objetivos Generales</b> .....	13
<b>3.- Materiales y Métodos Generales</b> .....	15
3.1.- Trabajo de campo .....	15
3.1.1.- Expediciones y muestreo.....	15
3.1.2.- Especies estudiadas.....	17
3.2.- Protocolos experimentales .....	17
3.2.1.- Disección y preparación del material.....	17
3.2.2.- Extracción y purificación de ADN genómico.....	19
3.2.3.- Marcadores moleculares .....	19
3.2.3.1.- Marcadores moleculares del genoma de Chrysomelidae .....	19
3.2.3.2.- Marcador molecular del genoma cloroplástico.....	23
3.2.4.- Amplificación mediante PCR .....	24
3.2.5.- Control de la eficacia de la PCR mediante electroforesis.....	25
3.2.6.- Purificación de productos de PCR.....	25
3.2.7.- Secuenciación de ADN.....	26
3.2.8.- Clonación de fragmentos de ADN .....	27
3.3.- Métodos analíticos .....	29
3.3.1.- Edición de cromatogramas .....	29
3.3.2.- Alineamiento de secuencias de ADN .....	30
3.3.2.1.- Alineamiento múltiple con MAFFT .....	30
3.3.2.2.- Alineamiento múltiple basado en estructuras secundarias .....	31
3.3.3.- Composición nucleotídica y divergencia entre secuencias .....	31
3.3.4.- Inferencia filogenética.....	32
3.3.4.1.- Congruencia entre marcadores moleculares .....	32
3.3.4.2.- Partición de caracteres .....	33
3.3.4.3.- Metodología de inferencia filogenética.....	35
3.3.4.4.- Congruencia entre métodos filogenéticos.....	36



3.3.4.5.- Reloj molecular .....	37
3.3.4.6.- Tasas y patrones de diversificación .....	37
3.3.4.7.- Señal filogenética de los marcadores moleculares.....	39
<b>4.- Resultados y Discusión .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.- Sistemática molecular y evolución de la subfamilia Chrysomelinae Latreille, con especial énfasis en la fauna australiana (Coleoptera, Chrysomelidae).....</b>	<b>41</b>
4.1.1.- Introducción .....	41
4.1.2.- Objetivos.....	43
4.1.3.- Materiales y Métodos.....	43
4.1.3.1.- Muestreo taxonómico.....	43
4.1.3.2.- Preparación del material y extracciones de ADN.....	50
4.1.3.3.- Marcadores genéticos: amplificación, secuenciación y edición de secuencias .....	50
4.1.3.4.- Composición nucleotídica y divergencia entre secuencias.....	51
4.1.3.5.- Alineamiento de secuencias .....	52
4.1.3.6.- Ortología de las secuencias EF1a .....	52
4.1.3.7.- Matrices de datos moleculares .....	55
4.1.3.8.- Selección de modelos evolutivos y de la estrategia de partición de datos.....	56
4.1.3.9.- Congruencia entre marcadores moleculares .....	57
4.1.3.10.- Análisis filogenéticos.....	57
4.1.3.11.- Congruencia entre métodos filogenéticos.....	58
4.1.3.12.- Reloj molecular .....	58
4.1.3.13.- Señal filogenética de los marcadores moleculares.....	59
4.1.3.14.- Análisis biogeográfico .....	60
4.1.3.15.- Asociación con plantas hospedadoras.....	61
4.1.4.- Resultados.....	62
4.1.4.1- Diversidad y divergencia de datos de secuencia en Chrysomelinae.....	62
4.1.4.2.- Ortología de las secuencias EF1a .....	67
4.1.4.3.- Filogenia molecular de Chrysomelinae .....	69
4.1.4.4.- Reloj molecular, distribución de la señal filogenética y tiempos de divergencia.....	97
4.1.4.5.- Análisis biogeográfico .....	104

4.1.4.6.- Asociaciones con plantas hospedadoras.....	106
4.1.5.- Discusión .....	109
4.1.5.1.- Sistemática de Chrysomelinae.....	109
4.1.5.2.- Biogeografía histórica de los Chrysomelinae.....	122
4.1.5.3.- Evolución de las asociaciones ecológicas en los Chrysomelinae australianos.....	129

## **4.2.- Sistemática molecular y evolución del género *Calomela* Hope**

<b>(Coleoptera: Chrysomelidae, Chrysomelinae).....</b>	<b>135</b>
4.2.1.- Introducción .....	135
4.2.2.- Objetivos.....	137
4.2.3.- Materiales y Métodos.....	138
4.2.3.1.- Muestreo taxonómico.....	138
4.2.3.2.- Preparación del material y extracciones de ADN.....	140
4.2.3.3.- Marcadores genéticos: amplificación, secuenciación y edición de secuencias .....	141
4.2.3.4.- Composición nucleotídica y divergencia entre secuencias.....	142
4.2.3.5.- Inferencia de la estructura secundaria de las secuencias ITS2....	142
4.2.3.6.- Inferencia de la estructura secundaria de las secuencias LSU ....	143
4.2.3.7.- Alineamiento de secuencias .....	143
4.2.3.8.- Análisis de las repeticiones simples de secuencias.....	144
4.2.3.9.- Análisis de mutaciones compensatorias .....	145
4.2.3.10.- Selección de modelos evolutivos y estrategia de partición de datos.....	146
4.2.3.11.- Congruencia entre marcadores moleculares .....	147
4.2.3.12.- Análisis filogenéticos.....	147
4.2.3.13.- Reloj molecular .....	148
4.2.3.14.- Tasas de diversificación.....	148
4.2.3.15.- Señal filogenética de los marcadores moleculares.....	149
4.2.3.16.- Análisis poblacionales.....	149
4.2.3.17.- Utilidad de los marcadores moleculares en la identificación molecular de especies.....	150
4.2.3.18.- Caracteres morfológicos .....	151
4.2.3.19.- Asociaciones con plantas hospedadoras.....	152
4.2.3.20.- Corología de las especies de <i>Calomela</i> .....	153
4.2.4.- Resultados.....	154
4.2.4.1.- Diversidad y divergencia de las secuencias .....	154

4.2.4.2.- Estructura secundaria de las secuencias ITS2 .....	157
4.2.4.3.- Estructura secundaria de las secuencias LSU.....	175
4.2.4.4.- Selección de modelos evolutivos y estrategia de partición de datos.....	182
4.2.4.5.- Congruencia entre marcadores moleculares .....	185
4.2.4.6.- Filogenia de <i>Calomela</i> .....	190
4.2.4.7.- Reloj molecular y tiempos de divergencia.....	215
4.2.4.8.- Distribución de la señal filogenética de los marcadores moleculares .....	217
4.2.4.9.- Tasas de diversificación en <i>Calomela</i> .....	219
4.2.4.10.- Diversidad genética en poblaciones de <i>Calomela</i> .....	224
4.2.4.11.- Utilidad de los marcadores moleculares en la identificación de especies .....	235
4.2.4.12.- Asociaciones con plantas hospedadoras.....	245
4.2.4.13.- Estructura filogenética de caracteres morfológicos .....	248
4.2.4.14.- Reconstrucción de las asociaciones ancestrales con los biomas australianos .....	251
4.2.5.- Discusión .....	253
4.2.5.1.- Secuencias ribosomales: copias funcionales, estructura secundaria y alineamiento.....	253
4.2.5.2.- Filogenia y sistemática de <i>Calomela</i> .....	255
4.2.5.3.- Taxonomía molecular de <i>Calomela</i> .....	265
4.2.5.4.- Evolución de <i>Calomela</i> .....	270
<b>4.3.- La filogenia molecular aplicada al estudio de la dieta de los insectos fitófagos: Ensayo en los Chrysomelinae australianos (Coleoptera: Chrysomelidae).....</b>	<b>277</b>
4.3.1.- Introducción .....	277
4.3.1.1.- Interacción insecto-planta .....	277
4.3.1.2.- Métodos de estudio de la fitofagia .....	278
4.3.1.3.- Diagnósis molecular de muestras vegetales.....	280
4.3.1.4.- Identificación taxonómica a partir de bases de datos de secuencias .....	283
4.3.1.5.- Modelo de estudio de asociaciones insecto-planta: Los Chrysomelidae .....	286
4.3.2.- Objetivos.....	288
4.3.3.- Materiales y Métodos.....	288

4.3.3.1.- Muestreo taxonómico.....	288
4.3.3.2.- Elección del marcador molecular.....	292
4.3.3.3.- Extracción de ADN.....	294
4.3.3.4.- Amplificación y secuenciación de los marcadores.....	294
4.3.3.5.- Clonación de productos de PCR.....	295
4.3.3.6.- Edición de secuencias.....	296
4.3.3.7.- Obtención de secuencias de la base de datos GenBank.....	296
4.3.3.8.- Alineamiento de secuencias.....	298
4.3.3.9.- Análisis filogenético.....	300
4.3.4.- Resultados y Discusión.....	301
4.3.4.1.- Confirmación de la validez del test: Chrysomelinae de alimentación conocida.....	301
<i>Araucanomela wellingtonensis</i> .....	301
<i>Chrysolina americana</i> .....	303
<i>Chrysolina quadrigemina</i> .....	304
<i>Chrysolina viridana</i> .....	305
<i>Chrysomela collaris</i> .....	305
<i>Gonioctena olivacea</i> .....	306
<i>Gonioctena variabilis</i> .....	307
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> .....	308
<i>Phratora vitellinae</i> .....	308
<i>Plagioderma versicolora</i> .....	309
4.3.4.2.- Aplicación del test: Inferencias tróficas para Chrysomelinae australianos.....	309
APOCYNACEAE.....	309
<i>Peltoschema turbata</i> .....	311
<i>Phyllocharis melanospila</i> .....	312
<i>Phyllocharis wollumbina</i> .....	313
ASTERACEAE.....	313
<i>Ethomela podagrosa</i> .....	314
<i>Ethomela</i> sp. (JAJ63).....	315
<i>Peltoschema maculiventris</i> .....	316
<i>Rhaebosterna sciola</i> .....	317
BIGNONIACEAE.....	318
<i>Johannica gemellata</i> .....	318
CARYOPHYLLACEAE.....	320
<i>Canobolas nobilis</i> .....	320

FABACEAE .....	321
<i>Callidemum limbatum</i> .....	324
<i>Calomela bartoni</i> .....	325
<i>Calomela curtisi</i> .....	326
<i>Calomela fulvilabris</i> .....	326
<i>Calomela ioptera</i> .....	327
<i>Calomela aff. acaciae</i> (JAJ130) .....	327
<i>Calomela juncta</i> .....	329
<i>Calomela parilis</i> .....	329
<i>Calomela pulchella</i> .....	330
<i>Calomela ruficeps</i> .....	331
<i>Dicranosterna globulosa</i> .....	332
<i>Ethomela sp.</i> (JAJ63).....	333
<i>Peltoschema cardinalis</i> .....	334
<i>Peltoschema maculiventris</i> .....	334
<i>Peltoschema festiva</i> .....	336
<i>Peltoschema hera</i> .....	336
<i>Peltoschema scutifera</i> .....	337
<i>Peltoschema sp.</i> (JAJ161).....	337
<i>Peltoschema aff. orphana</i> (JAJ154).....	339
<i>Peltoschema sp.</i> (JAJ157).....	340
<i>Platymela cephalotes</i> .....	341
LAMIACEAE .....	342
<i>Phyllocharis cyanicornis</i> .....	342
MYRTACEAE .....	344
<i>Faex notatipennis</i> .....	346
<i>Paropsis maculata</i> .....	348
<i>Paropsis aff. geographica</i> (JAJ138).....	349
<i>Paropsis minor</i> .....	350
<i>Paropsis pictipennis</i> .....	350
<i>Paropsisterna beata</i> .....	353
<i>Paropsisterna geniculata</i> .....	353
<i>Paropsisterna liturata</i> .....	353
<i>Paropsisterna m-fuscum</i> .....	353
<i>Paropsisterna nigerrima</i> .....	353
<i>Paropsisterna aff. captiosa</i> (JAJ142).....	353
<i>Paropsisterna aff. variabilis</i> (JAJ139) .....	353

<i>Paropsisterna crocata</i> .....	357
<i>Paropsisterna debilis</i> .....	358
<i>Paropsisterna obliterata</i> .....	359
<i>Paropsisterna aff. lignea</i> (JAJ151) .....	359
<i>Paropsisterna semifumata</i> .....	360
<i>Paropsisterna aff. decolorata</i> (JAJ143) .....	360
<i>Paropsisterna aff. intertincta</i> (JAJ145) .....	360
<i>Paropsisterna aff. intertincta</i> (JAJ147) .....	360
<i>Paropsisterna aff. intertincta</i> (JAJ148) .....	360
<i>Paropsisterna subcostata</i> .....	364
<i>Peltoschema mansueta</i> .....	365
<i>Peltoschema sp.</i> (JAJ155) .....	365
<i>Poropteromela epipleuralis</i> .....	366
<i>Rhaebosterna sciola</i> .....	367
<i>Trachymela rugosa</i> .....	369
<i>Trachymela sp.</i> (196167) .....	369
<i>Trachymela sp.</i> (JAJ168) .....	369
<i>Trachymela sp.</i> (JAJ170) .....	369
<i>Trachymela aff. seriata</i> (JAJ167) .....	369
<i>Trachymela tincticollis</i> .....	369
<i>Trachymela aff. tincticollis</i> (JAJ163) .....	369
<i>Trachymela aff. tincticollis</i> (JAJ164) .....	369
<i>Canobolas nobilis</i> .....	371
Apuntes adicionales sobre las inferencias en Myrtaceae .....	373
NOTHOFAGACEAE .....	376
<i>Ewanius nothofagi</i> .....	376
<i>Novacastria nothofagi</i> .....	377
OLEACEAE .....	377
<i>Eulina pulchra</i> .....	378
PITTOSPORACEAE .....	379
<i>Chalcolampra sp.</i> (JAJ131) .....	380
<i>Lamprolina aff. aeneipennis</i> (196180) .....	382
<i>Lamprolina simillima</i> .....	383
<i>Lamprolina simplicipennis</i> .....	383
PLANTAGINACEAE .....	384
<i>Geomela aff. blackburni</i> (JAJ59) .....	385
PROTEACEAE .....	387

---

<i>Palaeomela</i> sp. (JAJ57) .....	388
RUBIACEAE .....	388
<i>Palaeomela punctifrons</i> .....	389
SAPINDACEAE .....	391
<i>Callidemum hypochalceum</i> .....	392
<i>Oomela distincta</i> .....	393
<i>Oomela elliptica</i> .....	393
<i>Oomela variabilis</i> .....	393
<i>Paropsides</i> sp. (JAJ92) .....	395
<i>Philhydronopa aeneipennis</i> .....	396
<i>Platymela</i> sp. (JAJ89) .....	397
SOLANACEAE .....	397
<i>Canobolas nobilis</i> .....	398
4.3.4.3.- Resumen de las inferencias.....	398
4.3.5.- Discusión general .....	404
4.3.5.1.- Aportaciones del método aquí desarrollado.....	404
4.3.5.2.- Poder de predicción y precisión del método .....	407
4.3.5.3.- Comparación entre marcadores: intrón <i>trnL</i> completo y <i>loop</i> P6 .....	408
4.3.5.4.- Evidencias utilizadas para la elaboración de las inferencias tróficas.....	409
4.3.5.5.- Polifagia y estenofagia .....	411
4.3.5.6.- La alimentación de los Chrysomelinae australianos .....	411
4.3.5.7.- Aplicación en material seco de colección .....	413
4.3.5.8.- Ventajas del método .....	414
4.3.5.9.- Potenciales beneficiarios .....	415
4.3.6.- Apéndice: Árboles filogenéticos.....	416
<b>5.- Conclusiones .....</b>	<b>523</b>
<b>6.- Bibliografía .....</b>	<b>529</b>







## 1.-INTRODUCCIÓN

### 1.1.- La seducción y el reto de la Biodiversidad en Australia

Australia es conocida por la singularidad de una fauna que desde las primeras expediciones europeas al continente ha fascinado a naturalistas y viajeros. Diversos grupos de vertebrados australianos emblemáticos como por ejemplo los monotremas, los marsupiales, o determinadas especies de aves y reptiles han acaparado históricamente la atención. Sin embargo, y no por resultar menos original, la fauna australiana de artrópodos ha sido escasamente estudiada (Nielsen y West, 1994, New y Yen, 2012). Se estima que en Australia existen aproximadamente unas 253.000 especies de artrópodos, de las cuales unas 205.000 especies son insectos (Yeates *et al.*, 2003). Considerando que el número de especies de insectos descritas en Australia se sitúa en torno a las 60.000 (Yeates *et al.*, 2003), podríamos decir que al menos el 75% por ciento de los artrópodos australianos aún no han sido descritos (Austin *et al.*, 2004; Raven y Yeates, 2007). En cualquier caso, las cifras son un fiel reflejo de la importante riqueza faunística australiana, que con el 6% de la superficie terrestre del planeta alberga el 5.6% de la diversidad entomológica global. Grupos como los termitas (Isoptera), los megalópteros (Megaloptera), los insectos palo e insectos hoja (Phasmatodea) o los drosófilidos (Diptera), entre otros muchos, se encuentran extraordinariamente representados en Australia con aproximadamente el 10% de su diversidad mundial (Williams, 2002; Cranston, 2009). Especial atención merecen también los coleópteros, de los cuales se calcula que pueden habitar en Australia entre 20.000 y 40.000 especies (Monteith, 1990), habiendo incluso quién opina que esta cifra podría oscilar entre 80.000 y 100.000 especies (Yeates *et al.*, 2003).

La entomofauna australiana no sólo es diversa sino que posee además un elevado grado de endemidad (DEST, 1994) que se extiende a niveles taxonómicos superiores (Austin *et al.*, 2004). Por ejemplo, ciertos grupos de odonatos (Cordulephyidae, Corduliidae, Diphlebiidae, Hemiphleboidea, Hypolestidae, Lestoideidae y Synlestidae), de coleópteros (Acanthocnemidae, Lamingtoniidae, Myrabioliidae, Rhinorhipidae, Talmosalpingidae, y más del 90% de los géneros de Scarabaeidae [Howden, 1981]) y de hemípteros (Aphylidae, Henicocoridae, Hoyocephalidae y Lestoniidae) son exclusivos de Australia (Williams, 2002; Austin *et al.*, 2004; Cranston, 2010). A menudo dichos niveles de endemidad y biodiversidad están asociados con elementos nativos de la vegetación australiana. Así, por ejemplo, entre 15.000 y 20.000 especies de insectos fitófagos australianos se alimentan de tejidos de

*Eucalyptus* (Majer *et al.*, 1997). Es por ello que algunos procesos importantes de diversificación de fauna en Australia se relacionan con las mayores radiaciones de plantas en el continente, particularmente las Mimosaceae, incluyendo *Acacia*, y las Myrtaceae, especialmente *Eucalyptus*, y en menor medida las Casuarinaceae (Crisp *et al.*, 2004; Cranston, 2010).

En cuanto al origen y ensamblado faunístico de los insectos australianos, probablemente puedan ser explicados mediante la combinación de los elementos postulados por Heatwole (1987) para el origen de los artrópodos terrestres de dicho continente. En concreto, estos son: (i) linajes relictos sedentarios de la antigua Pangea; (ii) elementos asociados a los eventos de vicarianza acontecidos en Gondwana; (iii) un elemento Austral resultado de radiaciones locales y regionales tras el aislamiento tectónico de Australia; (iv) un elemento norteño compuesto por grupos que migraron desde Asia cuando Australia derivó hacia latitudes tropicales; (v) especies cosmopolitas con gran capacidad dispersiva; y (vi) especies introducidas por colonizadores aborígenes y europeos. Aunque muchos de estos elementos pueden ser fácilmente identificados en algunas familias de insectos australianos ricas en especies (p. ej., Braconidae, Geometridae, Scarabaeidae, Tachinidae), el origen de una gran proporción de la entomofauna permanece ignoto debido en parte a la carencia de estudios filogenéticos detallados (Austin *et al.*, 2004).

Desvelar los detalles de la biodiversidad entomológica australiana y su evolución representa todo un reto, y a pesar del esfuerzo científico realizado desde la llegada de los primeros colonizadores europeos a finales del siglo XVIII, aún es mucho el trabajo que queda por hacer. Ante la imposibilidad de abarcarlo todo, se hace necesario seleccionar modelos de estudio con características interesantes, como podrían ser el hecho de tratarse de grupos de insectos ampliamente diversificados y endémicos de Australia, poseer una distribución que comprenda una variedad de ambientes incluyendo hábitats relictos, o exhibir una serie de asociaciones ecológicas estrechas con otros organismos también exclusivos del continente australiano.

## **1.2.- Los Chrysomelinae australianos**

Entre los grupos de insectos ampliamente diversificados en el continente australiano y para los cuales aún se desconocen los detalles de su historia evolutiva se encuentran los coleópteros crisomélidos de la subfamilia Chrysomelinae Latreille,

1802. Se trata de un conjunto de escarabajos fitófagos que a nivel mundial cuenta con unas 4.000 especies descritas (Reid *et al.*, 2009) reunidas en 133 géneros (Daccordi, 1994) y que en la región Australiana poseen la mayor proporción de endemismos (Daccordi 1983). Concretamente en Australia se conocen 43 géneros de crisomelinos representados por aproximadamente unas 750 especies, siendo 30 de estos géneros (69%) exclusivos del continente (Reid, 2006; Reid *et al.*, 2009). El número real de especies podría ser notablemente superior, pues existen aún muchas especies por describir a partir de material colectado en todo el continente y depositado en las principales colecciones científicas del país (Reid, 2006). Los crisomelinos australianos tienen un espectro trófico bastante restringido a una o varias especies de plantas emparentadas, destacando las interacciones tróficas con linajes vegetales esclerófilos muy diversificados en Australia como *Acacia* y *Eucalyptus* (Reid, 2006). Entre los Chrysomelinae australianos más diversificados se encuentra el género *Calomela* (45 especies, Reid, 2006). Estos escarabajos ocupan una diversidad de hábitats que van desde los bosques pluviales hasta las regiones esclerófilas, áridas y monzónicas, y sin embargo en todos estos ambientes se alimentan exclusivamente de especies de *Acacia* (Reid, 2006). Como es habitual en la sistemática supraespecífica de Coleoptera, la de Chrysomelinae se ha basado en caracteres morfológicos, pero debido a su escasa estructura y al diferente peso que cada autor les ha otorgado, ha resultado bastante inestable (Reid, 2002). Así, a pesar del notable grado de diversificación morfológica de Chrysomelinae en Australia y de sus singularidades ecológicas, los detalles de su historia evolutiva se desconocen.

La taxonomía de los Chrysomelinae australianos aún no ha sido investigada mediante métodos formales, incluidos los filogenéticos (Reid, 2006), y las claves disponibles han quedado obsoletas o son incompletas (Blackburn, 1896-1901; Lea, 1903, 1916; Selman y Lowman, 1983; Matthews y Reid, 2002; Daccordi y De Little, 2003; Reid, Smith y Beatson, 2004). En las últimas décadas se han realizado cambios en la interpretación o validez de muchos géneros (Daccordi, 1994; Matthews y Reid, 2002), siendo la revisión morfológica de Reid (2006) el trabajo taxonómico más completo y actualizado. Hasta la fecha se han propuesto varias clasificaciones para la fauna mundial de la subfamilia Chrysomelinae, todas ellas basadas exclusivamente en caracteres morfológicos (Tabla 1-1). Si se trata de hallar un consenso para estas clasificaciones, la propuesta de cuatro tribus de Reid (2002) basada en la morfología larvaria, podría resultar especialmente útil. Según esta propuesta, los géneros australianos se distribuirían en tres de las tribus: Chrysomelini, Goniocetenini y Phyllocharitini (no existe ningún integrante de Timarchini en latitudes australes). La

tribu Chrysomelini es con diferencia la que menor representación tiene en Australia con tres especies de un único género, *Plagioder* (Reid, 2006). Los restantes géneros se distribuyen de manera casi equitativa entre las tribus Gonioceteni y Phyllocharitini (Tabla 1-2; Reid, 2006; comunicación personal).

<b>Autor</b>	<b>Tribu</b>	<b>Subtribu</b>
Weise (1915)	Chrysomelini Dicranosternini Paropsini Phaedonini Phyllocharini Phyllodectini Timarchini Zigogrammini	
Seeno & Wilcox (1982)	Timarchini Chrysomelini	Barymelina Doryphorina Chrysolinina Monarditina Chrysomelina Hispostomina Dicranosternina Paropsina Goniocetina Phyllodectina Phyllocharina Entomoscelina
Daccordi (1994)	Timarchini Chrysomelini	Chrysomelina Entomoscelina Chrysolinina Paropsina
Cox (1994)	Timarchini Chrysomelini	Doryphorina Chrysolinina Chrysomelina Phyllodectina Phyllocharina Entomoscelina
Steinhausen (1998)	Timarchini Chrysomelini	Chrysolinina Chrysomelina Goniocetina Entomoscelina
Reid (2002)	Timarchini Chrysomelini Gonioceteni Phyllocharitini	
Kippenberg (2010)	Timarchini Chrysomelini  Doryphorini  Entomoscelini Gonioceteni	Timarchina Chrysomelina Gastrophysina Phratorina Prasocurina Chrysolinina Doryphorina Entomoscelina Goniocetina

**Tabla 1-1.** Resumen histórico de las clasificaciones de la subfamilia Chrysomelinae

<b>Chrysomelini</b>	<b>Gonioctenini</b>	<b>Phyllocharitini</b>	<b>Timarchini</b>
<i>Plagioder</i>	<i>Aesernoides</i>	<i>Alfius</i>	n.a.
	<i>Callidemum</i>	<i>Ateratocerus</i>	
	<i>Calomela</i>	<i>Canobolas</i>	
	<i>Dicranosterna</i>	<i>Chalcolampra</i>	
	<i>Ewanius</i>	<i>Chalcomela</i>	
	<i>Faex</i>	<i>Cyclonoda</i>	
	<i>Grammicomela</i>	<i>Diacosma</i>	
	<i>Novacastria</i>	<i>Ethomela</i>	
	<i>Paropsides</i>	<i>Eugastromela</i>	
	<i>Paropsimorpha</i>	<i>Eulina</i>	
	<i>Paropsis</i>	<i>Geomela</i>	
	<i>Paropsisterna</i>	<i>Gibbiomela</i>	
	<i>Peltoschema</i>	<i>Hysmatodon</i>	
	<i>Philhydronopa</i>	<i>Johannica</i>	
	<i>Platymela</i>	<i>Lamprolina</i>	
	<i>Poropteromela</i>	<i>Oomela</i>	
	<i>Rhaebosterna</i>	<i>Palaeomela</i>	
	<i>Trachymela</i>	<i>Phola</i>	
		<i>Phyllocharis</i>	
		<i>Promechus</i>	
		<i>Pterodunga</i>	
		<i>Sphaerotritoma</i>	
		<i>Strumatophyma</i>	
		<i>Tinosis</i>	

**Tabla 1-2.** Clasificación tribal de los géneros australianos de Chrysomelinae (*sensu* Reid, 2002).

Las nociones sobre la biología y la ecología de las especies de crisomelinos australianos también son escasas, incluyendo el uso de las plantas hospedadoras. La selección trófica es un carácter taxonómico de tipo ecológico (Mayr, 1969) cuyo conocimiento en el ámbito de las interacciones tróficas insecto-planta puede ser de gran ayuda a la hora de interpretar las relaciones evolutivas tanto de los herbívoros como de sus hospedadores, sobre todo si consideramos que los insectos fitófagos son en su mayoría oligófagos o monófagos (Funk *et al.*, 2002; Schoonhoven *et al.*, 2005). Numerosos estudios (p. ej., Mitter *et al.*, 1991; Farrell, 1998; Winkler y Mitter, 2008) han mostrado que los hábitos tróficos restringidos de los insectos fitófagos a menudo se conservan durante largos periodos de tiempo, resultando en un patrón que se ha definido como “conservacionismo taxonómico en el uso de la planta hospedadora”. En este patrón, los insectos que están estrechamente emparentados generalmente se alimentan de plantas que también lo están, lo que ha sido empleado como evidencia para resolver relaciones filogenéticas entre grupos vegetales (p. ej., Tempère, 1969; Eastop, 1979; Hille y Lambers, 1979; Kergoat *et al.*, 2007) y animales (p. ej., Johnson, 1980). En este sentido, los crisomelinos australianos son un claro ejemplo de uso conservado de linajes hospedadores, puesto que las especies de la mayoría de los géneros tienen un estrecho vínculo ecológico con un reducido número de especies

vegetales (Reid, 2006). Sin embargo, los detalles de las asociaciones tróficas se desconocen y los patrones coevolutivos nunca han sido investigados.

Comprender el poblamiento y la diversificación de Chrysomelinae en Australia pasa necesariamente por profundizar en su sistemática, diversidad y condicionantes evolutivos. A tal efecto, la sistemática molecular basada en secuencias de ADN representa una herramienta atractiva, principalmente por su carácter objetivo, rapidez de implementación y poder analítico de hipótesis.

### **1.3.- Sistemática molecular y filogenia de los Chrysomelinae australianos**

Podemos definir la sistemática como el estudio de la diversidad biológica y de las relaciones evolutivas entre los organismos que la componen (Simpson, 1961; Mayr 1969). Uno de los principales objetivos de la sistemática es inferir la historia evolutiva o filogenia de los organismos sometidos a estudio. Atendiendo a los postulados de Darwin (1859), los seres vivos que comparten un antecesor reciente poseen más características similares que aquellos cuyo ancestro común está más alejado en la genealogía. Es por tanto el análisis de estos caracteres lo que posibilita la inferencia de las genealogías, tradicionalmente representadas en forma de árbol filogenético, esto es, un diagrama ramificado que muestra las relaciones entre los organismos según un criterio de ancestría común (Ridley, 2004).

Los caracteres utilizados para elaborar las filogenias pueden ser de diversa naturaleza, incluyendo datos morfológicos, ecológicos, etológicos, cromosómicos o, más recientemente, moleculares. Aunque la inferencia filogenética basada en caracteres morfológicos ha ocupado y aún mantiene un lugar destacado en el ámbito de la sistemática, en las últimas décadas su uso se ha visto superado por el uso de caracteres moleculares, especialmente secuencias de ADN.

Dadas las limitaciones encontradas en el estudio de caracteres morfológicos, el estudio del origen y de la evolución de los crisomelinos australianos depende en gran parte de la obtención de una hipótesis filogenética molecular completa, basada en el análisis de varios marcadores moleculares que en conjunto permitan resolver las relaciones dentro del tiempo de divergencia del grupo. En este sentido, una de las fases más complicadas de cualquier estudio sistemático molecular radica en la elección de los marcadores genéticos apropiados, puesto que diferentes regiones del

genoma tienen con frecuencia tasas evolutivas desiguales, y habitualmente dentro de una misma región pueden existir diferencias entre diferentes posiciones nucleotídicas (p. ej. Wolfe *et al.*, 1987; Pons *et al.*, 2010). Para un determinado grupo de organismos el rango de variación de cualquier marcador molecular puede situarse entre dos extremos: la ausencia total de variabilidad o diferentes grados de saturación de sustituciones nucleotídicas. En el primer caso la señal filogenética es inexistente y en el segundo puede quedar enmascarada en parte por el ruido derivado de la superposición de cambios, de los cuales no queda evidencia. Se tratará pues de seleccionar marcadores moleculares con características intermedias, dedicando especial atención a aquellos cuya señal filogenética permita la recuperación de la historia evolutiva del grupo de estudio en sus diferentes niveles de divergencia. A menudo el empleo de un solo marcador molecular no es suficiente para resolver completamente una filogenia por lo que se suele combinar la información filogenética derivada de varias regiones genéticas, de modo que cada una de ellas contribuye a la recuperación de los eventos evolutivos correspondientes a diferentes rangos de divergencia entre los organismos estudiados.

El ADN mitocondrial ha ocupado un lugar destacado en los estudios concernientes tanto a la variación genética en especies de insectos relacionadas (Kambhampati, 1995; Bernasconi *et al.*, 2002; Plazzi y Passamonti, 2010; Chang *et al.*, 2013) como al análisis evolutivo de grandes grupos de insectos (p. ej. Maekawa *et al.*, 1999; Hunt *et al.*, 2007; Miller y Bergsten, 2014). La popularidad de los marcadores mitocondriales se debe en gran medida a la facilidad con que se aísla y amplifica este tipo de material genético, procesos que pueden ser llevados a cabo incluso a partir de especímenes con un deficiente estado de preservación, como ocurre con el ADN fósil (p. ej. DeSalle *et al.*, 1992; Fernández *et al.*, 2014). Además, el tipo de herencia matrilineal sin recombinación al que está sujeto el ADN mitocondrial le otorga propiedades analíticas deseables, ya que la información derivada de los haplotipos mitocondriales sigue un patrón genealógico estrictamente dicotómico (p. ej., Walton *et al.*, 1997; Magnacca y Brown, 2010). Otra particularidad interesante se relaciona con la tasa de sustitución nucleotídica del ADN mitocondrial, que en metazoos se ha estimado que es entre cinco y diez veces superior a la de las regiones codificantes del ADN nuclear (Brown *et al.*, 1979, Brown y Simpson, 1982; Brown, 1983; Birky, 2001; Lynch, 2010). Entre los marcadores moleculares mitocondriales más populares se incluyen fragmentos de los genes de la primera subunidad de la citocromo *c* oxidasa (*cox1*), el citocromo *b* (*cyt-b*), las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal mitocondrial (*rnl* y *rns*) y el gen para la deshidrogenasa de NADH (*nd1*) (p. ej.,



Vogler y DeSalle, 1993; Lunt *et al.*, 1996; Dobler y Müller, 2000; Simmons y Weller, 2001; Balke *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2012; Cryan y Urban, 2012).

En cuanto al ADN nuclear, los genes ribosomales son los más empleados debido a su abundancia, facilidad de amplificación y secuenciación (Caterino *et al.*, 2000). El ADN ribosomal nuclear se caracteriza por contener tanto regiones variables como regiones conservadas, lo que le confiere una gran versatilidad como marcador molecular para su uso en un amplio rango de niveles taxonómicos (p. ej. Hunt *et al.*, 2007; Gómez-Zurita *et al.*, 2008). Tal vez la principal dificultad asociada al análisis de secuencias de ADN ribosomal tenga que ver con el establecimiento de las homologías entre secuencias (*i.e.*, alineamiento), ya que no son genes codificantes para proteína y a menudo muestran longitud variable. Este problema puede ser atajado en gran medida mediante la incorporación de información derivada de modelos de estructura secundaria de ARN ribosomal. Ejemplos de genes nucleares ribosomales cuyo uso en sistemática entomológica se encuentra ampliamente extendido incluyen fragmentos de las subunidades mayor (28S o *LSU*) y menor (18S o *SSU*) del ARN ribosomal (p. ej., Whiting *et al.*, 1997; Jost y Shaw, 2006; Sonnenberg *et al.*, 2007; Kundrata *et al.*, 2014). Otro tipo de marcadores moleculares nucleares apropiados para la investigación filogenética son los genes nucleares codificantes para proteína (Wiegmann *et al.*, 2000). Estos genes generalmente evolucionan más lentamente que los genes mitocondriales (Lin y Danforth, 2004) y presentan la ventaja de ser fácilmente alineables (Danforth *et al.*, 2005), si bien su empleo no está exento de problemas, ya que pueden tener copias parálogas y alojar intrones largos que compliquen los procesos de amplificación, secuenciación y alineamiento (Sanderson y Shaffer, 2002). A pesar de sus inconvenientes, los marcadores moleculares nucleares codificantes para proteína cada vez son más utilizados en sistemática entomológica, especialmente cuando se pretenden esclarecer las relaciones evolutivas a niveles taxonómicos profundos (p. ej., Wild y Maddison, 2008; Regier *et al.*, 2010). Entre los genes nucleares codificantes más frecuentemente empleados en sistemática de insectos se cuentan el factor de elongación 1-alfa (*ef1a*), la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*pepck*), la histona 3A (*h3a*) o *wingless* (*wg*), entre otros (p. ej., Friedlander *et al.*, 1996; Brower y DeSalle, 1998; Danforth y Ji, 1998; Sota y Vogler, 2003; Gómez-Zurita *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2014).

La filogenia molecular de los Chrysomelinae australianos aún no ha sido abordada por ningún estudio diseñado al efecto, y los trabajos filogenéticos disponibles están basados en un reducido número de géneros y/o apenas son

representativos de la diversidad genérica del grupo. Hsiao (1994) fue el primero en incluir crisomelinos (20 géneros) en un análisis filogenético basado en secuencias de ADN. Sus análisis de los genes mitocondriales ribosomales 12S y 16S apoyaban la existencia de las tribus Timarchini y Chrysomelini, llegando a distinguir dos clados principales dentro de la última: (Chrysomelina+Phyllodecticina) y (Chrysolinina+resto de subtribus). Farrell (1998) publicó una filogenia basada en caracteres morfológicos y moleculares de los coleópteros Phytophaga y en la que únicamente se incluyeron dos géneros de Chrysomelinae, por lo que sus resultados únicamente permitían demostrar la monofilia de dichos géneros sin dejar lugar a interpretaciones sobre la organización interna de la subfamilia. Existen otros trabajos moleculares en los que también se incluyen secuencias de crisomelinos, si bien en ellos la subfamilia no se recupera como un grupo monofilético a no ser que se integre información morfológica en los análisis (Duckett *et al.*, 2004; Farrell y Sequeira, 2004). En la más reciente y completa revisión filogenética de las subfamilias de Chrysomelidae, Gómez-Zurita *et al.* (2008) se basan en el análisis de tres genes ribosomales de 27 géneros de Chrysomelinae para establecer la existencia de tres grupos principales altamente congruentes con los tipos larvarios descritos por Kimoto (1962) y Takizawa (1976) y con los compuestos químicos defensivos que elaboran (Pasteels *et al.*, 1994, 2003): Timarchinae, Chrysomelina/Phyllodectina, y otros Chrysomelini.

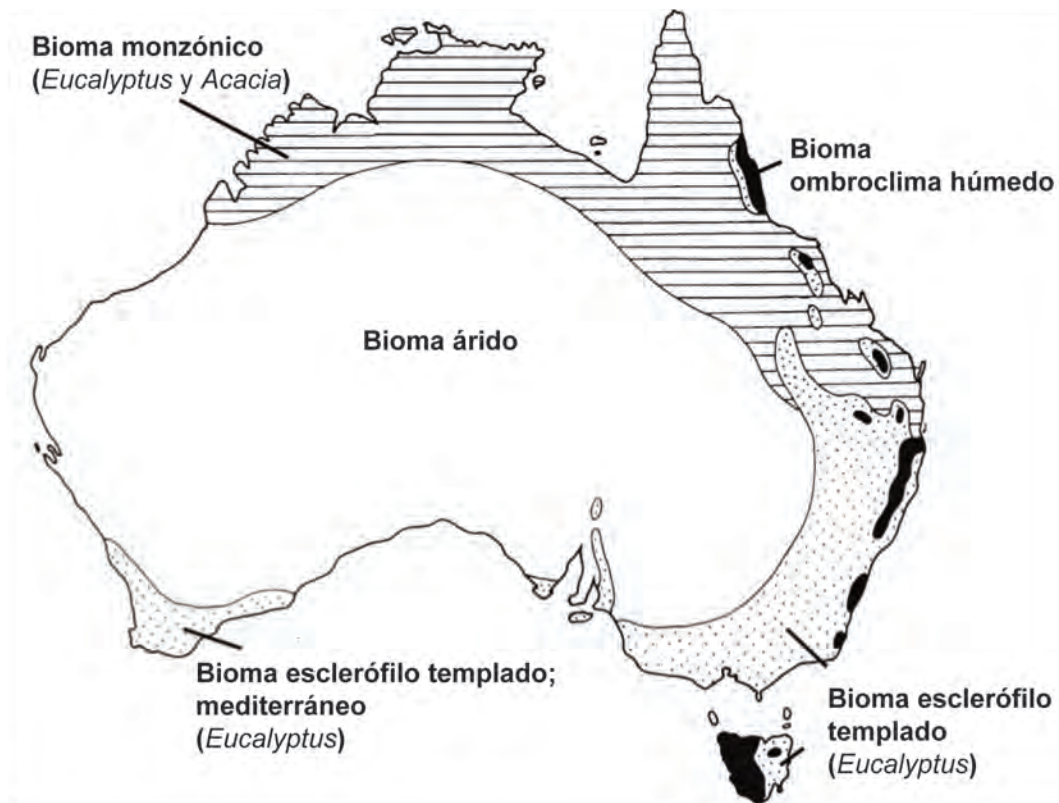
#### **1.4.- Escenario evolutivo: clima y vegetación en Australia**

El estrecho vínculo ecológico entre los crisomelinos australianos y sus respectivas plantas hospedadoras sugiere que la evolución de la flora en el continente ha podido jugar un papel importante en la historia evolutiva de estos escarabajos. La comprensión de estos procesos se beneficia de un abordaje que considere la historia geológica y climática del continente.

Tras el aislamiento de Australia hace unos 32 Ma, la flora del continente comenzó su propio periplo evolutivo (Crisp *et al.*, 2004). En el momento de la separación, la vegetación dominante en el sureste de Australia era similar a la de los bosques pluviales actuales (Hill *et al.*, 1999). La separación de Antártida y Sudamérica (hace 28-30 Ma) facilitó la aparición de la Corriente Circumpolar Antártica y el subsiguiente cambio climático global que dio pie a la primera glaciación antártica (Lawver y Gahagan, 2003) produciendo un enfriamiento significativo del clima australiano (Hill *et al.*, 1999). Hace unos 25 Ma en Australia predominaba un clima

húmedo y frío, y abundaba la vegetación de tipo *rainforest* (Martin, 2006) en coexistencia con las primeras formaciones de vegetación esclerófila (polen fósil de *Acacia* hace 23 Ma: Macphail y Hill, 2001; Byrne *et al.*, 2011). Desde ese periodo y hasta hace unos 10 Ma Australia comenzó su desplazamiento hacia el norte tornándose simultáneamente más seca y estacional (Hill, 1994; Martin, 1994), lo que propició la progresiva reducción de las especies dominantes a pequeños parches aislados (p. ej., *Nothofagus*) y su reemplazamiento por una flora de tipo esclerófilo dominada principalmente por especies de Myrtaceae y Casuarinaceae (Kershaw *et al.*, 1994; Martin, 1994; Crisp *et al.*, 2004; Hill, 2004; Byrne *et al.*, 2011). Además, se dispone de evidencias a favor de un importante episodio de aridificación en Australia hace unos 14 Ma que dio paso a la expansión de los biomas árido y monzónico (Crisp y Cook, 2013) y que probablemente promovió la radiación de linajes esclerófilos tan diversificados en la actualidad como por ejemplo el género *Acacia* (McGowran *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2013). El Plioceno (hace 5-2 Ma) estuvo marcado también por unas condiciones de severa aridez que forzaron la desaparición total de las especies hasta entonces dominantes en las latitudes situadas más al sur (p. ej., *Nothofagus* y Araucariaceae) promoviendo un incremento de las especies herbáceas (p. ej., Asteraceae, Chenopodiaceae y Poaceae) y esclerófilas (p. ej., Casuarinaceae, Mimosaceae y Myrtaceae) que hoy día se extienden por dichas regiones (Gallagher *et al.*, 2003; Dodson y Macphail, 2004). De este modo actualmente se distinguen cinco biomas principales en Australia (Crisp y Cook, 2004, 2013) (Figura 1-1), que constituyen el hábitat de una flora rica y diversa donde aproximadamente el 85% de sus especies son endémicas (Australian Department of the Environment and Water Resources, 2007): (i) ombroclima húmedo, dominante en el Cretácico y actualmente restringido a pequeños refugios en la costa oriental, representado principalmente por una gran diversidad de linajes pobres en especies que no han protagonizado episodios de radiación desde el Oligoceno; (ii) el bioma esclerófilo templado del sureste, de clima estacionalmente seco y caracterizado por la presencia de grandes extensiones de especies esclerófilas principalmente de *Eucalyptus*; (iii) el bioma esclerófilo templado del suroeste, con un clima mediterráneo y muy similar al bioma templado en cuanto a su composición principal; (iv) el bioma árido, caracterizado por la existencia de formaciones áridas tanto arbustivas como de matorral bajo y herbazales, y que adquirió notable importancia a partir de la aridificación del Plioceno (Hill, 2004), hasta el punto de ser actualmente el bioma más extendido ocupando la práctica totalidad del área central del continente y llegando incluso hasta las costas sur y oeste; y (v) el bioma monzónico, con un marcado perfil estacional y formado mayoritariamente por

extensiones de sabana y masas forestales de *Acacia* y *Eucalyptus*, y extendido por toda la franja norte y noroeste de Australia.



**Figura 1-1.** Mapa de los biomas australianos. Modificado a partir de Crisp *et al.* (2004).

La distribución por biomas de las especies Australianas de Chrysomelinae no es uniforme. Una gran proporción de los géneros, entre los que se incluyen cuatro con más de 70 especies cada uno (*Paropsis*, *Paropsisterna*, *Peltoschema* y *Trachymela*) están vinculados tróficamente a dos grupos de plantas propios del bioma esclerófilo y muy diversificados en Australia: *Eucalyptus* y *Acacia*. En el otro extremo, existen diez de los géneros monotípicos (constituidos por una sola especie) que habitan fundamentalmente los bosques pluviales relictos de la costa oriental del continente (Reid, 2006). La interpretación de tales patrones ecológicos desde un punto de vista filogenético mejorará nuestra comprensión de la historia evolutiva de este grupo de coleópteros fitófagos tan diversificado en Australia que son los Chrysomelinae.



## 2.-OBJETIVOS GENERALES

En el presente trabajo se pretende estudiar la sistemática de los coleópteros crisomélidos de la subfamilia Chrysomelinae, utilizando herramientas moleculares y con un énfasis especial en la fauna australiana. Para ello se inferirán hipótesis filogenéticas basadas en secuencias de ADN y para la mayoría de linajes que integran el grupo, las cuales se contrastarán con algunas propuestas morfológicas existentes. Además, se incorporará una dimensión temporal a la historia de la subfamilia con la que reforzar el estudio de su evolución usando información biogeográfica, ecológica y paleoclimática.

Con objeto de indagar sobre procesos que hubieran promovido la diversificación de Chrysomelinae en el continente australiano, analizamos la evolución del género *Calomela*, un linaje muy diverso en Australia y con una sistemática históricamente inestable. Para ello proponemos inferir la primera hipótesis filogenética para el género, con el objeto de estudiar su evolución y su dinámica de diversificación. La filogenia se utilizará además para analizar el valor sistemático de los caracteres morfológicos usados en la taxonomía de *Calomela* y, recíprocamente, de las propias secuencias de ADN para establecer una taxonomía molecular del género. La filogenia se usará también para estudiar la evolución de la asociación de las especies de *Calomela* con sus plantas hospedadoras.

Como último objetivo, en un intento de ampliar nuestros conocimientos sobre la ecología de los Chrysomelinae australianos, pretendemos establecer un método objetivo basado en la técnica de PCR para la identificación de las especies vegetales de las que se alimentan estos insectos herbívoros. En contraposición a la mayoría de métodos moleculares de identificación taxonómica (e.g. *barcoding*, Hebert *et al.*, 2003), impulsaremos el uso de métodos filogenéticos con el fin de sobreponer algunas de las limitaciones de los primeros, principalmente las relacionadas con sesgos en las bases de datos de referencia. Las inferencias filogenéticas de este tipo, robustas pero imprecisas, serán complementadas con información disponible sobre registros botánicos de la zona de estudio, sistemática vegetal, citas tróficas previas existentes en la bibliografía y observaciones de campo.



### 3.- MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

#### 3.1.- Trabajo de campo

##### 3.1.1.- Expediciones y muestreo

El grueso de los coleópteros estudiados en este trabajo procede principalmente de dos campañas intensivas de colecta realizadas en el continente australiano durante las primaveras australes de los años 2005 y 2006. El primero de estos viajes se centró en el Este y el Sureste del continente, visitando principalmente Australian Capital Territory, New South Wales, Tasmania y Victoria, mientras que la segunda se desarrolló íntegramente en Western Australia (Figura 3-1). La elección de las regiones exploradas se basó en un listado de distribución de los géneros de Chrysomelinae en Australia elaborado por el taxónomo sistemático especialista en el grupo y colaborador en nuestro estudio, el Dr. Chris A. M. Reid (comunicación personal). Las zonas designadas coinciden en términos generales con la distribución de las masas forestales de tipo esclerófilo y lluvioso en Australia (Crisp *et al.*, 2004). El resto de especímenes examinados es de origen diverso, e incluye crisomelinos procedentes del resto de continentes (Tablas 4.1-1 y 4.2-1, páginas 44 y 138).



**Figura 3-1.** Mapa de Australia indicando las regiones exploradas durante las campañas de colecta. WA: Western Australia; NT: Northern Territory; SA: South Australia; Qld: Queensland; NSW: New South Wales; ACT: Australian Capital Territory; Vic: Victoria; Tas: Tasmania.



Las capturas se efectuaron principalmente durante el día empleando cuatro técnicas de muestreo diferentes con diferente eficacia según el ambiente muestreado:

(i) Vareo de vegetación con paraguas japonés: especialmente útil en ambientes donde la vegetación es de porte arbóreo o arbustivo. La técnica consiste en el empleo de una tela rectangular de color claro -en nuestro caso de 110 x 85 cm. de lado- que se mantiene extendida gracias a un armazón de varillas rígidas, y que el colector sitúa en posición horizontal bajo las ramas de la planta a muestrear, mientras que en la otra mano sostiene una vara con la cual golpea la vegetación forzando a los insectos a caer sobre el paraguas.

(ii) Manguero con red de barrido: empleada principalmente para coleccionar en la vegetación de porte bajo que caracteriza a las zonas abiertas. Consiste en el empleo de una manga entomológica que se agita sobre la vegetación con un movimiento similar al que se realizaría en la siega manual. La manga empleada en nuestras campañas de colecta consta de una bolsa de tela resistente de 50 cm. de diámetro x 55 cm. de profundidad que se encuentra asida a un mango de 90 cm. de longitud.

(iii) Búsqueda directa de ejemplares: de gran utilidad en condiciones de lluvia o en casos de especies vegetales de porte rígido o espinoso donde es difícil el empleo de cualquiera de las dos técnicas detalladas anteriormente. Aunque la mayoría de las especies suelen colectarse sobre sus plantas nutricias, también es posible encontrarlas escondidas en el suelo bajo piedras o en los troncos de los árboles, bajo las cortezas.

(iv) *Grass-tufting*: consiste en arrancar pequeños haces de vegetación herbácea que se extienden sobre una bandeja con fondo de color claro donde se examinan cuidadosamente los tallos, hojas y raíces en busca de la fauna que pudiesen alojar. Esta técnica permite explorar un hábitat que históricamente ha sido ignorado por los entomólogos que en el pasado desarrollaron su labor en las mismas zonas donde se han realizado nuestros muestreos, lo cual ha propiciado el descubrimiento de géneros y especies de crisomelinos aún no descritos (*e.g.*, Reid *et al.*, 2009).

Mediante el uso de un dispositivo GPS y de mapas detallados, se almacenó información referente a la fecha y localidad de cada una de las capturas, junto con los datos del colector y cualquier otra observación puntual de carácter relevante,

típicamente información acerca de la planta sobre la que se recolectaron los ejemplares.

Una vez capturados, los insectos fueron etiquetados y depositados en viales con etanol absoluto, refrigerándolos cuanto antes con la intención de minimizar así la degradación del ADN.

### 3.1.2.- *Especies estudiadas*

En total se han estudiado 342 ejemplares pertenecientes a 227 especies de coleópteros crisomélidos de la subfamilia Chrysomelinae y 15 de otras subfamilias (Tablas 4.1-1 y 4.2-1, páginas. 44 y 138). La muestra de crisomelinos australianos está integrada por 177 especies distribuidas en 30 géneros de los 42 reconocidos en la última revisión sistemática del grupo (Reid, 2006). El examen morfológico del material colectado mostró que 68 de las especies australianas analizadas en nuestro estudio aún no han sido descritas, y que por tanto constituyen nuevos hallazgos para la ciencia (C. A. M. Reid, comunicación personal). Entre dicho material inédito se cuenta además un nuevo género para la fauna mundial de Chrysomelinae (*Canobolas* Reid, Jurado-Rivera y Beatson, 2009). El grupo no australiano de las especies de Chrysomelinae incluidas en nuestro estudio está constituido por 50 especies repartidas en 31 géneros, y cuya procedencia se extiende al resto de regiones biogeográficas mundiales.

Como grupos externos para las inferencias filogenéticas se han utilizado ejemplares de 15 especies pertenecientes a otras subfamilias de Chrysomelidae, entre las que se incluyen especies de Alticinae, Cassidinae, Clytrinae, Eumolpinae, Galerucinae y Spilopyrinae.

## **3.2.- Protocolos experimentales**

### 3.2.1.- *Diseción y preparación del material*

Los ejemplares fueron disecionados en condiciones de esterilidad, quedando por un lado el conjunto cabeza y protórax, y por otro el formado por mesotórax, metatórax y abdomen, ambos con cavidades abiertas para facilitar el acceso de los

reactivos de extracción de ADN a los tejidos del animal (Figura 3-2). Los élitros fueron levantados sin que llegasen a desprenderse del animal, y se practicaron pequeñas incisiones entre los terguitos abdominales. Este procedimiento permite, una vez terminada la extracción de ADN, la recuperación de las partes duras (quitinizadas) del insecto para su preparación en seco, haciendo posible un análisis posterior de la morfología. Dada la utilidad taxonómica de las estructuras reproductoras, las piezas más esclerotizadas de las genitalias también fueron recuperadas y posteriormente depositadas en una solución alcohol 70% y glicerol en proporción 9:1. De esta manera se conservan los caracteres morfológicos diagnósticos empleados para el grupo de estudio permitiendo futuras consultas morfológicas, tales como la confirmación de determinaciones, análisis morfológicos o la descripción de nuevas especies (Figura 3-3).



**Figura 3-2.** Ejemplar de *Paropsisterna* sp. diseccionado (Fotografía: J. A. Jurado-Rivera).



**Figura 3-3.** Insectos reconstruidos y montados en seco tras la extracción de ADN (Fotografía: J. A. Jurado-Rivera).

Previamente a la extracción de ADN, los insectos conservados en etanol fueron expuestos al contacto con el aire a temperatura ambiente durante un periodo mínimo de tres horas tras su disección, para garantizar así la evaporación de cualquier resto de etanol que pudiesen albergar, puesto que la presencia de alcohol dificultaría la solubilización del ADN, ejerciendo un efecto negativo en el proceso de extracción.

### 3.2.2.- *Extracción y purificación de ADN genómico*

El ADN total de cada uno de los individuos fue extraído utilizando el DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen) siguiendo el protocolo detallado por el fabricante con pequeñas modificaciones (incubación con proteinasa K durante toda la noche en lugar de 3-4h; intervalo mínimo de 5 minutos entre la adición a la membrana del buffer de elución final y el último paso de centrifugado). Tras la extracción, el ADN fue resuspendido en 200 µL de tampón de elución y un microlitro de dicha extracción fue utilizado en las reacciones de PCR. Se realizó una segunda elución en un vial diferente para recoger cualquier resto de ADN que hubiese podido quedar embebido en la membrana y se preservó como reservorio de seguridad en caso de que la primera elución se agotase o contaminase. Todas las extracciones se conservan congeladas a -20°C.

### 3.2.3.- *Marcadores moleculares*

Para la elaboración del presente trabajo se han secuenciado ocho marcadores moleculares, siete a partir de ADN de Chrysomelidae y uno a partir de ADN de origen vegetal. A continuación se ofrece un breve resumen descriptivo sobre cada uno de ellos.

#### 3.2.3.1.- *Marcadores moleculares del genoma de Chrysomelidae*

**Subunidad 1 de la Citocromo coxidasa (cox1):** Citocromo oxidasa pertenece a una superfamilia de proteínas que actúan como enzimas terminales en las cadenas respiratorias, y que consisten en grandes complejos transmembrana que se hallan en bacterias y mitocondrias. El gen de la subunidad 1 de la enzima citocromo c oxidasa es uno de los marcadores moleculares más populares utilizados en estudios

filogenéticos de todo el reino animal (Avice, 1994). Su uso se ha incrementado aún más desde que se demostró su utilidad como herramienta molecular para la identificación de especies de Metazoa (Hebert *et al.*, 2003). Una de sus principales ventajas es que existen cebadores universales muy robustos capaces de amplificar en la mayoría -si no todos- los *phyla* animales (Folmer *et al.*, 1994; Zhang y Hewitt, 1997). Al ser un gen mitocondrial sus secuencias están presentes en un elevado número de copias en los organismos, lo que contribuye a facilitar su amplificación. Además, *cox1* parece poseer un mayor rango de señal filogenética comparado con otros marcadores mitocondriales (Hebert *et al.*, 2003). Otra ventaja de este marcador es que sus secuencias son fácilmente alineables debido a su naturaleza de gen codificante para proteína. Para nuestro trabajo se ha escogido la región 3' de la secuencia *cox1*, debido a que dicho fragmento ha sido ampliamente utilizado con éxito en solitario o combinado con otros genes en estudios filogenéticos de coleópteros (*e.g.*, Cooper *et al.*, 2002; Ribera *et al.*, 2003; Pons *et al.*, 2006; Ahrens *et al.*, 2007; Balke *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2007; Papadopoulou *et al.*, 2009; Faille *et al.*, 2010; Bocakova *et al.*, 2011) incluyendo Chrysomelidae (*e.g.*, Köpf *et al.*, 1998; Becerra, 2004; Ge *et al.*, 2011, 2012; Gómez-Zurita *et al.*, 2004, 2006, 2007b, 2010, 2012; Gómez-Zurita y Cardoso, 2014). Los cebadores utilizados fueron C1-J-2183 (alias Jerry) 5'-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3' y TL2-N-3014 (alias Pat) 5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3' (Simon *et al.*, 1994).

**Subunidad mayor del ARN ribosomal mitocondrial (*rrnL*):** Es uno de los dos genes ribosomales mitocondriales, el que tiene mayor coeficiente de sedimentación (por lo que se le atribuye a menudo el nombre 16S, extrapolando del gen homólogo en procariontes), y que junto a una serie de proteínas constituyen la subunidad grande de los ribosomas mitocondriales. Esta subunidad contiene el centro peptidil transferásico encargado de la formación de los enlaces peptídicos en el proceso de traducción proteica (Watson, 2006). Se trata de uno de los primeros marcadores moleculares empleados en estudios sistemáticos; el análisis de las secuencias 16S en la década de los 70 permitió la obtención de filogenias donde se recuperaban los principales linajes (reinos) del árbol de la vida (Woese y Fox, 1977). Actualmente sigue siendo un marcador muy utilizado en investigación filogenética en Coleoptera (*e.g.*, Ahrens *et al.*, 2011; Gómez-Zurita *et al.*, 2006, 2008; Ge *et al.*, 2011; Kundrata y Bocak, 2011). Es un gen con una organización estructural que permite el plegamiento secundario de su secuencia de ARN, lo que posibilita el diseño de cebadores universales en las regiones conservadas de los tallos. Además, la presencia de regiones hipervariables dotan a este marcador de una señal filogenética

con capacidad -para resolver relaciones evolutivas en un amplio rango de niveles taxonómicos. Para la realización de nuestro trabajo se ha amplificado la región delimitada por la pareja de cebadores LR-N-13398 (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') y LR-J-12887 (5'-CTCCGGTTTGAAGTCAAGATCA-3') (Simon *et al.* 1994).

**Subunidad mayor del ARN ribosomal nuclear (LSU):** El gen LSU (también conocido como 28S, por poseer en general este coeficiente de sedimentación) forma parte del complejo génico de ADN ribosomal organizado a modo de repeticiones tipo tándem dentro del genoma nuclear de eucariotas (Long y Dawid, 1980). Este tipo de regiones de ADN ribosomal son conocidas por su elevado grado de conservación, aunque también incluyen zonas muy divergentes denominadas regiones D, que se numeran en el sentido 5'-3' del ARN ya maduro (Hassouna *et al.*, 1984). Se trata de un marcador molecular muy utilizado en filogenia debido a la facilidad con que se amplifican sus secuencias en un amplio rango de organismos. Para nuestro estudio se han secuenciado dos fragmentos diferentes del gen LSU: la región D1-D3 y la región D3-D6. La **región D1-D3** alberga tres segmentos de expansión altamente divergentes dentro del gen para la subunidad ribosomal grande, y son por tanto una herramienta muy interesante desde un punto de vista filogenético. Su poder resolutivo permite diferenciar incluso entre especies muy cercanas, por lo que este marcador ha sido propuesto como región *barcoding* para la identificación molecular de especies (Sonnenberg *et al.*, 2007). Una ventaja adicional es que se han diseñado cebadores universales para esta región con eficacia demostrada en un amplio grupo de metazoos (Sonnenberg *et al.*, 2007). Concretamente en nuestro estudio se ha utilizado la pareja LSU D1,D2 fw1 5'-AGCGGAGGAAAAGAAACTA-3' y LSU D1,D2 rev2 5'-ACGATCGATTTGCACGTCAG-3' (Sonnenberg *et al.*, 2007). La **región D3-D6** ha sido clásicamente utilizada en estudios filogenéticos de un amplio espectro taxonómico incluyendo coleópteros (*e.g.*, Gómez-Zurita *et al.*, 2005, 2008; Hunt *et al.*, 2007; Monaghan *et al.*, 2007). Para el presente trabajo se ha secuenciado la porción delimitada por los cebadores 28S-DD 5'-GGGACCCGTCTTGAAACAC-3' y 28S-FF 5'-TTACACACTCCTTAGCGGAT-3' (Hillis y Dixon, 1991).

**Segundo espaciador transcrito interno del ARNr nuclear (ITS2):** Se trata de una secuencia perteneciente al grupo de genes del ARN ribosomal nuclear de los organismos eucariotas, situada entre los genes 5.8S y LSU. Su correcta escisión y plegamiento terciario son fundamentales para la biogénesis de subunidades ribosomales activas (van Nues *et al.*, 1995). Entre las características más interesantes de este marcador molecular destacan su alto grado de variabilidad y la facilidad con

que se puede amplificar y secuenciar (Tippery y Les, 2008). Es por ello que ha sido ampliamente utilizado para resolver relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos, principalmente a los niveles de género y especie, incluyendo varios estudios de Chrysomelinae (e.g., Gallego y Galián, 2001; Gómez-Zurita, 2004; Gómez-Zurita y Vogler, 2003; Gómez-Zurita *et al.*, 2000, 2006, 2007b; Contreras-Díaz *et al.*, 2007; Bologna *et al.*, 2008; Trizzino *et al.*, 2009). La posibilidad de predecir *in silico* su estructura secundaria a partir de la secuencia primaria ha fomentado el empleo del marcador ITS2 en los estudios filogenéticos, ya que los patrones de plegamiento contienen información muy importante para la obtención de un alineamiento fiable de las secuencias (Michot *et al.*, 1999). Además, se ha comprobado que el análisis integrado de las secuencias ITS2 y sus respectivas estructuras secundarias mejora la resolución filogenética (Keller *et al.*, 2008) e incluso permite estudiar las relaciones evolutivas a niveles taxonómicos superiores (Coleman, 2003; Schultz y Wolf, 2009). En nuestro caso, para la amplificación de este marcador molecular se ha empleado la pareja de cebadores ITS3 5'- GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' e ITS4 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.*, 1990).

**Factor de elongación 1 alfa (EF1a):** Se trata de un gen nuclear codificante para una proteína involucrada en la unión dependiente de GTP entre el ARN de transferencia cargado y el lugar aceptor de los ribosomas durante el proceso de la traducción proteica (Maroni, 1993). Ha demostrado ser un marcador molecular muy informativo a la hora de resolver las relaciones evolutivas de numerosos grupos de insectos (e.g., Mitchell *et al.*, 1997; Cryan *et al.*, 2000; Danforth, 2002; Jordal, 2002; Regier *et al.*, 2005; Brammer y von Dohlen, 2007; Brady *et al.*, 2011; Õunap *et al.*, 2011). Su popularidad se debe en gran parte a la facilidad con la que se puede amplificar en un amplio grupo de niveles taxonómicos (Cho *et al.*, 1995). Además, EF1a es un marcador cuyas secuencias nucleotídicas resultan fácilmente alineables como consecuencia del elevado nivel de conservación de sus secuencias aminoacídicas (Regier y Shultz, 1997); la mayor parte de la variación se concentra en las terceras posiciones de codón (Cho *et al.*, 1995). Entre los impedimentos para trabajar con este gen se cuenta la existencia de secuencias parálogas en Hexapoda (revisado en Djernæs y Damgaard, 2006), que concretamente en Coleoptera consisten en dos copias denominadas C1 y C2 (Jordal, 2002). Sin embargo, este hecho no constituye en principio un obstáculo a la hora de establecer la ortología de cada una de las copias, ya que ambas son identificables debido al número y posición de sus respectivos intrones, y a la divergencia nucleotídica existente entre las regiones exónicas (Jordal, 2002). Para nuestro estudio se ha amplificado y secuenciado la

región 149-1043, utilizando para ello los cebadores efs149 5'-ATCGAGAAGTTTCGAGAAGGAGGCYCARGAAATGGG-3' y efa1043 5'-GTATATCCATTGGAAATTTGACCNGGRTGRRT-3'. Además, se recurrió al diseño de cebadores específicos para una porción interna del marcador en nuestro grupo de estudio y a partir del alineamiento de un grupo de secuencias obtenidas con los anteriores cebadores. La elección de las regiones apropiadas para el diseño de los cebadores y sus características bioquímicas se analizaron con el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000), tratando de maximizar la longitud del fragmento a amplificar. Los cebadores específicos para Chrysomelinae diseñados para nuestro trabajo son efs303 5'-CACAGAGATTTTCATCAAGAAC-3' y efa923 5'-CGTTCTTAACGTTGAAACCAA-3' (Jurado-Rivera *et al.*, 2009).

**Carbamoil-fosfato sintetasa del gen CAD (CPS):** CAD es un gen nuclear de aproximadamente 4 Kb que codifica para las enzimas carbamoilfosfato sintetasa (CPS), aspartato transcarbamilasa (ATC), y dihidroorotasa (DHO), todas ellas implicadas en la biosíntesis de pirimidinas (Moulton y Wiegmann, 2004). En *Drosophila* se conoce con el apelativo *rudimentary*, a causa de una mutación en este organismo que causa malformación alar (Morgan *et al.*, 1925). De este complejo gen, la porción correspondiente a la enzima CPS ha sido previamente utilizada en estudios filogenéticos de Diptera (Moulton y Wiegmann, 2004), Hymenoptera (Danforth *et al.*, 2006) y Coleoptera (Wild y Maddison, 2008; Dole *et al.*, 2010; Jordal *et al.*, 2011). De momento se tiene constancia de la existencia de una única copia de este gen en Coleoptera (Wild y Maddison, 2008). Para el presente trabajo se han empleado los cebadores CD667F 5'-GGATGGAAGGAAGTDGARTAYGARGT-3' y CD851R 5'-GGATCGAAGCCATTHACATTYTCRTCHACCAT-3', diseñados por Wild y Maddison (2008) específicamente para un fragmento de CPS en coleópteros.

### 3.2.3.2.- Marcador molecular del genoma cloroplástico

**Intrón *trnL* (UAA):** Es un marcador vegetal perteneciente al genoma cloroplástico ampliamente utilizado para inferir filogenias entre especies cercanas (*e.g.*, Scharaschkin y Doyle, 2005; McDade *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005) o para identificar especies de plantas (*e.g.*, Ronning *et al.*, 2005; Brežná *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007). Su naturaleza cloroplástica constituye una ventaja, ya que esta fracción del genoma vegetal es relativamente abundante con respecto al ADN total de la planta (Clegg y Zurawski, 1992), de modo que es posible obtener éxito en la amplificación



incluso - cuando la cantidad disponible de tejido vegetal es escasa. Aunque se sabe que no es una de las regiones más variables del ADN cloroplástico (Shaw *et al.*, 2005), este marcador posee unas ventajas únicas: existen cebadores universales desde hace más de 15 años (Taberlet *et al.*, 1991) y durante este periodo ha sido ampliamente utilizado en estudios filogenéticos tanto en géneros como en especies estrechamente relacionadas de la mayoría de familias botánicas (Gielly y Taberlet, 1996; Hollingsworth *et al.*, 2011). Además, esta región constituye el único intrón Grupo I del genoma cloroplástico (Palmer, 1991), lo que significa que tiene una estructura secundaria conservada (Davies *et al.*, 1982) donde se alternan regiones conservadas y variables (Quandt *et al.*, 2004) que facilitan tanto el alineamiento de las secuencias como el diseño de cebadores internos. Además, el intrón *trnL* tiene en promedio aproximadamente 500 pb lo que hace que sea un marcador relativamente fácil de amplificar por PCR. Por otro lado, la existencia de una pequeña región en este marcador (aproximadamente 50 pb en promedio) denominada loop P6 y altamente variable permite que se utilice en situaciones donde el ADN de la muestra se encuentra degradado. Así, cuando la degradación es un problema y no es posible amplificar el intrón *trnL* completo, este pequeño fragmento ofrece una alternativa. Los cebadores utilizados para el intrón *trnL* (UAA) fueron c A49325 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' y d B49863 5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3' (Taberlet *et al.*, 1991). En el caso del loop P6 se utilizaron los cebadores g A49425 5'-GGGCAATCCTGAGCCAA-3' y h B49466 5'-CCATTGAGTCTCTGCACCTATC-3' (Taberlet *et al.*, 2007).

#### 3.2.4.- Amplificación mediante PCR

Las reacciones de PCR tuvieron lugar en un volumen total de 25  $\mu$ L, con las siguientes concentraciones finales totales: 0,2 $\mu$ M de cada cebador, 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTPs y 0,25U de *Taq* polimerasa. Todos los reactivos -exceptuando el ADN molde- se manipularon y mezclaron en una zona del laboratorio libre de ADN y trabajando en todo momento sobre hielo. Se empleó un termociclador GS1 G-STORM (Gene Technologies Ltd., Essex, UK) programado con una fase de desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos cada uno de ellos compuesto por 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 50°C y 90 segundos de extensión a 72°C, para finalizar la reacción con una fase de extensión de 10 minutos a 72°C. En los casos donde no se obtuvieron reacciones positivas con estos parámetros se procedió a la modificación de la temperatura de hibridación,

ajustándola a valores comprendidos entre 45°C y 60°C. Algunos de los marcadores moleculares amplificados en este trabajo requirieron programas de PCR con ciclos de tiempo y temperatura sensiblemente diferentes. Es el caso del factor de elongación 1-alfa (EF1a) y del fragmento *trnL* del ADN cloroplástico, para los cuales, y tras varias pruebas iniciales, se diseñó de forma experimental un programa de temperatura tipo *touchdown* (Don *et al.*, 1991) con ligeras modificaciones sobre el descrito por Jordal *et al.* (2004). Este consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 43 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 60 segundos e hibridación también de 60 segundos donde en los primeros 16 ciclos la temperatura descendía progresivamente de 60 a 43 °C, manteniéndose estable a 42°C en una segunda fase de 27 ciclos de duración. Como último paso de la reacción se programó una fase de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Para la amplificación del fragmento CPS se consultó a los investigadores que evaluaron la utilidad de este marcador en el campo de la filogenia de Coleoptera (Wild y Maddison, 2008), los cuales amablemente nos detallaron el siguiente programa (Alexander L. Wild, comunicación personal): desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos compuestos por 94°C durante 30 segundos, 52°C durante otros 30 segundos y 72°C durante 90 segundos, para finalizar con una fase de extensión final de 72°C durante 5 minutos.

### 3.2.5.- Control de la eficacia de la PCR mediante electroforesis

Los productos de PCR fueron comprobados utilizando la técnica de la electroforesis, analizando 4µl de cada reacción en un gel de agarosa al 1% al que se añadió bromuro de etidio para teñir el ADN, detectándose las bandas mediante un captador de imágenes dotado de luz ultravioleta para seleccionar los casos donde la PCR había sido exitosa. La presencia de dos o más productos de PCR en una sola muestra se manifestaba en forma de múltiples bandas en el gel, y tales reacciones se reservaron para ser clonadas en un paso posterior.

### 3.2.6.- Purificación de productos de PCR

Las muestras que presentaban una única y clara banda de amplificación fueron purificadas utilizando *MSB<sup>®</sup> Spin PCRapace* (Invitex) y siguiendo las instrucciones detalladas por el fabricante, obteniendo un volumen final de 20µl de ADN purificado

resuspendido en tampón de elución. La concentración de cada muestra fue estimada con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Dada la importancia de una correcta estequiometría entre los componentes de una reacción de secuenciación para obtener resultados óptimos, se procedió a la dilución de las muestras en función de la longitud del fragmento amplificado. Las concentraciones finales establecidas para los productos de PCR en función de su longitud fueron las siguientes: 6 ng/μl (<550 pb), 8.6 ng/μl (550-650 pb), 14.6 ng/μl (650-800 pb), y 17 ng/μl (>800 pb).

### 3.2.7.- Secuenciación de ADN

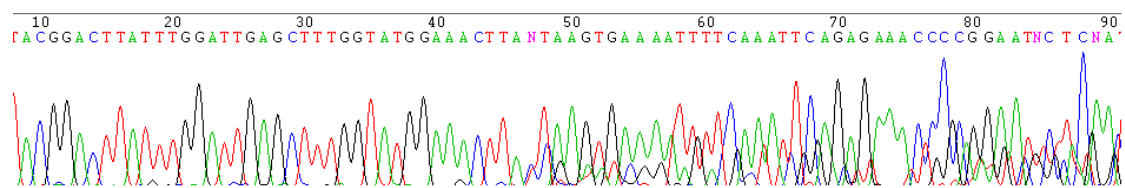
Ambas cadenas de ADN fueron secuenciadas con el método de secuenciación cíclica automática basado en la terminación mediada por di-desoxinucleótidos y empleando la enzima termoestable *Taq* polimerasa (Sanger *et al.*, 1977). Para ello se empleó el *ABI PRISM™ BigDye™ terminator Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems). En esta reacción, el ADN que se va a secuenciar actúa como cadena molde, sobre el cual se van a fijar unos cebadores de la reacción de secuenciación, típicamente los mismos cebadores que se emplearon en la PCR. Conforme la reacción va progresando, se van añadiendo desoxinucleótidos de manera continua y la cadena de nueva síntesis se va alargando. Este proceso de elongación finalizará cuando la nueva hebra haya sido sintetizada por completo o cuando se añada a la cadena un di-desoxinucleótido, los cuales están presentes en la reacción en una concentración tal que existe una probabilidad finita de que uno de ellos sea utilizado durante la fase de síntesis de la nueva cadena. La reacción se va repitiendo cíclicamente generando al final un producto compuesto por multitud de cadenas de ADN cuyo rango de longitudes abarca la longitud total de la hebra molde, y donde todas las cadenas - excepto las que se sintetizaron completamente sin incorporar ningún di-desoxinucleótido- presentan un di-desoxinucleótido como elemento final. La identidad de este di-desoxinucleótido puede conocerse mediante un marcaje específico, que en el caso de la técnica *BigDye* es fluorescente. Las reacciones de secuenciación son sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en un secuenciador automático, los cuales permiten discriminar moléculas de ADN que difieren por un único nucleótido, de manera que es posible determinar la longitud exacta de cada una de las cadenas, y por tanto la base correspondiente a esa posición de la secuencia.

La reacción de secuenciación se realizó en un volumen total de 10 μl. Para ello se utilizó un termociclador PTC-100 (MJ Research) que se programó para llevar a cabo una desnaturalización inicial de 95°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos con

una fase de desnaturalización de 10 segundos a 96°C, una de hibridación de 5 segundos a 50°C y una de extensión de 4 minutos a 60°C. Una vez finalizada la reacción de secuenciación, los productos resultantes se purificaron mediante un proceso de precipitación. El protocolo consistió en la adición a la muestra de una mezcla de 50 µl de etanol absoluto con 2 µl de una solución de acetato sódico 3M filtrado, para posteriormente centrifugar todo el volumen resultante a 14.000 r.p.m. durante media hora. A continuación se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 µl de etanol al 70% por muestra, centrifugando a la misma velocidad durante 10 minutos. Como último paso se retiró el sobrenadante y el *pellet* se secó en una bomba de vacío durante 15 minutos para garantizar la completa eliminación del alcohol. Desde este momento los productos de secuenciación se conservaron precipitados y únicamente se resuspendieron con un volumen determinado de agua ( $\approx 20$  µl) en el momento previo a su lectura en el secuenciador. Las reacciones se cargaron en un secuenciador automático ABI PRISM 3600 de electroforesis capilar con 96 capilares (Applied Biosystems).

### 3.2.8.- Clonación de fragmentos de ADN

Las reacciones de PCR que amplifican dos o más fragmentos diferentes se pueden detectar gracias a la presencia de múltiples bandas en el gel de agarosa siempre y cuando las diferencias de longitud entre ellos sean lo suficientemente grandes como para que éstas se resuelvan mediante electroforesis. Puede darse el caso de que las longitudes sean tan similares que las bandas den la falsa impresión de ser una sola, con lo que se procede con normalidad a la fase de secuenciación como si se tratase de un único producto de PCR. En estos casos el cromatograma resultante se caracteriza por tener un fragmento inicial donde la lectura es clara y que se interrumpe exactamente en la posición donde las secuencias comienzan a presentar diferencias en su secuencia nucleotídica, generándose a partir de este punto una señal ruidosa constituida por las secuencias superpuestas (Figura 3-4).



**Figura 3-4.** Cromatograma mostrando superposición de secuencias. La aparición de múltiples picos de señal se produce a partir de la posición en que ambas secuencias dejan de ser idénticas.

Tanto las muestras que presentaron múltiples bandas en el gel, como las que generaron un cromatograma anómalo similar al descrito anteriormente, fueron sometidas a un proceso de clonación para así poder obtener por separado las diferentes secuencias que las constituían. Las clonaciones se llevaron a cabo utilizando el *TOPO TA Cloning Kit*<sup>®</sup> (Invitrogen). El proceso comienza con la fase de ligación, donde el producto de PCR es insertado en el vector plasmídico pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> gracias a la actividad de la Topoisomerasa I que se encuentra unida de manera covalente al vector. La *Taq* polimerasa típicamente añade una desoxiadenosina extra que queda libre en el extremo 3' de cada una de las hebras que conforman el producto de PCR y el vector plasmídico posee una desoxitimidina complementaria en su extremo 3', lo que permite una ligación muy eficiente del producto de PCR al vector. La reacción tuvo lugar en un volumen de 6 µl y estaba compuesta por 4 µl de producto de PCR, 1 µl de solución salina (NaCl 1,2M y MgCl<sub>2</sub> 0,06M) y 1 µl de vector, que tras ser mezclados se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 2 µl de producto de ligación a un vial con 50µl de células *Escherichia coli* competentes (genotipo TOP10F') dejando la mezcla en reposo durante 20 minutos. La fase de transformación consistió en provocar un choque térmico en la mezcla de células competentes y producto de ligación sumergiendo las muestras en un baño con agua a 42°C durante 30 segundos. Las células transformadas se dejaron reposar 2 minutos en hielo, transcurridos los cuales se mezclaron con 250 µl de medio de cultivo S.O.C y se incubaron a 37°C durante 60 minutos en una estufa con agitador. Se sembraron 100 µl de la transformación en medio de cultivo agar-LB al que se añadió X-Gal, IPTG y ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

La presencia de ampicilina impidió el crecimiento en el medio de todas aquellas células que no hubieran incorporado el plásmido, ya que este último contiene un gen que confiere a la célula portadora resistencia al antibiótico. Por otro lado, el vector plasmídico dispone de una secuencia con múltiples dianas únicas de enzimas de restricción situada en el extremo 5' del gen *lacZ*. La presencia del inductor IPTG y del sustrato X-Gal desencadena la síntesis de β-galactosidasa en aquellas bacterias que han sido transformadas con un plásmido carente de inserto, provocando que el X-Gal se convierta en una sustancia de color negro que tiñe de oscuro las colonias bacterianas. Sin embargo, si la transformación se ha producido con un plásmido dotado de inserto no se sintetiza β-galactosidasa, ya que la ligación tiene lugar en una posición que interrumpe el gen *lacZ* y por tanto las colonias no presentan color. De este modo se garantiza que las colonias blancas están constituidas exclusivamente

por bacterias que han sido transformadas (resistentes a la ampicilina) y que han recibido el inserto (no sintetizan  $\beta$ -galactosidasa).

Una vez obtenidas las colonias se procedió a su aislamiento. Para ello se tomaron de cada placa 12 colonias blancas que se resuspendieron individualmente en 40  $\mu$ l de TRIS 10mM para luego ser desnaturalizadas a una temperatura de 95°C durante 10 minutos. Tras la desnaturalización, se procedió a centrifugar las muestras durante 60 segundos a 20.000 x g con el fin de sedimentar cualquier resto celular de las colonias lisadas. A continuación se utilizaron 4  $\mu$ l de sobrenadante como ADN molde en una amplificación por PCR en presencia de los cebadores universales del vector pUC (Messing y Vieira, 1982). El volumen total de la reacción fue de 25  $\mu$ l. La secuencia de tiempos y temperaturas de la PCR consistió en una fase inicial de desnaturalización inicial de 94°C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos con una fase de desnaturalización de 30 segundos a 94°C, una de hibridación de 45 segundos a 48°C y una de extensión de 60 segundos a 72°C, que se completaron con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Una vez chequeados los productos de PCR en un gel de agarosa al 1%, se procedió a su purificación y cuantificación. Los productos purificados se diluyeron hasta alcanzar una concentración óptima en función de cada marcador para ser secuenciados en ambos sentidos con los cebadores universales específicos del vector pUC-F y pUC-R.

### **3.3.- Métodos analíticos**

#### *3.3.1.- Edición de cromatogramas*

Los cromatogramas obtenidos se visualizaron y editaron con el programa CHROMAS 2 (Chromas v.2.22; Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia <<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>>). Ambos sentidos fueron utilizados para la obtención de una secuencia consenso empleando el programa CONTIG ASSEMBLY PROGRAM (Huang, 1992) implementado en el programa BIOEDIT v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Como último paso de la edición, se eliminaron las secuencias de los cebadores.

### 3.3.2.- *Alineamiento de secuencias de ADN*

Como paso previo al análisis filogenético de cada uno de los conjuntos de datos, las secuencias se sometieron a un alineamiento múltiple automático para intentar establecer las posiciones homólogas entre ellas. Existen numerosas alternativas para generar estos alineamientos, entre las cuales nos decantamos por aquéllas que tratan la variación en longitud de secuencia de manera más precisa en tiempos relativamente cortos para un elevado número de secuencias.

#### 3.3.2.1- *Alineamiento múltiple con MAFFT*

MAFFT (Multiple Alignment with Fast Fourier Transform) (Kato *et al.*, 2002, 2005) es uno de los métodos de alineamiento múltiple de secuencias más rápidos y precisos entre los existentes (Grasso y Lee, 2004; Nuin *et al.*, 2006; Golubchik *et al.*, 2007; Löytynoja *et al.*, 2012). Este programa implementa un grupo de algoritmos conocidos como Transformación de Fourier rápida que permiten una detección – inmediata de segmentos homólogos entre las diferentes secuencias. El proceso de alineamiento consta esencialmente de tres pasos. En una fase inicial MAFFT construye un alineamiento empleando el método progresivo (Feng y Doolittle, 1897; Thompson *et al.*, 1994) al tiempo que elabora un árbol guía mediante el método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA; Sneath y Sokal, 1973). De esta manera el orden con el que las secuencias se van añadiendo al alineamiento está determinado por el patrón de ramificación con el que éstas aparecen en el árbol. El segundo paso recalcula una matriz de distancias basada en la información obtenida en el paso anterior, y el alineamiento progresivo se vuelve a realizar utilizando un árbol generado a partir de la nueva matriz como punto de partida. El tercer y último paso consiste en la mejora del alineamiento con un método del refinamiento iterativo (Berger y Munson, 1991; Gotoh, 1993). MAFFT ha sido ampliamente empleado desde su creación (e.g. Nishiyama *et al.*, 2004; Hashiguchi y Nishida M, 2005; Iwabe *et al.*, 2005; Soria-Carrasco *et al.*, 2007; Erhard *et al.*, 2009; Wedin *et al.*, 2011; Weigand *et al.*, 2012) y ha demostrado ser un método muy útil en casos de secuencias difíciles de alinear como las que contienen regiones de inserción-delección de posiciones nucleotídicas (Golubchik *et al.*, 2007).

### 3.3.2.2.- Alineamiento múltiple basado en estructuras secundarias

En el caso de los genes ribosomales ITS2 y LSU analizados para unidades taxonómicas poco divergentes en el apartado 4.2 (página 135), se utilizó un método de alineamiento múltiple donde las secuencias y sus respectivas estructuras secundarias fueron simultáneamente alineadas. Para ello se utilizó el programa 4SALE 1.5 (Seibel *et al.*, 2008). Este programa codifica la información de las secuencias y su estructura secundaria a modo de secuencias artificiales de proteína, de forma que cada uno de los cuatro nucleótidos puede estar presente en tres estados diferentes: no apareado, par de bases de apertura y par de bases de cierre. Para la obtención del alineamiento final el algoritmo de 4SALE utiliza matrices de puntuación específicas de cada marcador molecular (Seibel *et al.*, 2006). Se trata de un programa de alineamiento de secuencias muy utilizado en estudios filogenéticos (Trizzino *et al.*, 2009; Wiemers *et al.*, 2009; Aguilar y Reimer, 2010; Krienitz, 2011), cuya principal ventaja y aportación más valiosa consiste en la integración de la información estructural en el proceso de alineamiento de las secuencias de ARN.

### 3.3.3.- Composición nucleotídica y divergencia entre secuencias

Las matrices de secuencias obtenidas para cada marcador molecular secuenciado fueron analizadas con los programas PAUP\* 4.0 (Swofford, 2002) y MEGA v3.1 (Kumar *et al.*, 2004) con la finalidad de extraer información sobre la proporción de posiciones variables e informativas para parsimonia, el grado de divergencia genética global (*p-distance*), la diversidad intraespecífica, la composición nucleotídica, y su homogeneidad entre las secuencias obtenidas mediante una prueba Chi-Cuadrado. La existencia de sesgo (*C*) en las proporciones nucleotídicas se computó manualmente siguiendo a Irwin *et al.* (1991) mediante la siguiente fórmula:

$$C = \left(\frac{2}{3}\right) \sum_{i=1}^4 |c_i - 0.25|$$

donde  $c_i$  es la frecuencia media hallada en la matriz para la base  $i$ .

La existencia de saturación mutacional se exploró mediante la representación gráfica para cada conjunto de datos de la divergencia genética (*p-distance*) frente al número total de sustituciones nucleotídicas por posición de codón en el caso de los



genes codificantes para proteína, o frente al número total de transiciones y transversiones tanto en el caso de los genes no codificantes como en el del conjunto combinado de los marcadores estudiados. En caso de que alguna de tales representaciones gráficas mostrase indicios de saturación se procedió a realizar un análisis más exhaustivo de los datos mediante la ejecución del test de saturación de sustituciones nucleotídicas desarrollado por Xia *et al.* (2003) e implementado en el programa DAMBE v5.2.64 (Xia y Xie, 2001). El protocolo analítico seguido se describe detalladamente en el texto de Xia y Lemey (2009). El test se basa en el cálculo del índice de saturación de sustitución (ISS) y en la existencia de un valor crítico del mismo (ISSc) que define el umbral entre la saturación y la no saturación de las posiciones nucleotídicas analizadas. El valor ISS observado en los datos es comparado con el valor crítico ISSc, estimándose la significación estadística  $p$  para la comparación. Si el valor ISS fuese mayor que el índice ISSc quedaría demostrada la existencia de saturación mutacional. En este caso, si la diferencia fuese estadísticamente significativa las secuencias deberían ser consideradas no aptas para el análisis filogenético. Si la diferencia no fuese significativa los datos se considerarían como muy poco informativos. Por el contrario, si el valor ISS se recuperase como inferior al valor crítico delimitado por ISSc, se asumirían niveles de saturación despreciables. Si esta diferencia fuese además significativa estaríamos hablando de escasa saturación, mientras que una diferencia no significativa indicaría un nivel de saturación algo más sustancial pero perfectamente tolerable.

### 3.3.4.- Inferencia filogenética

#### 3.3.4.1.- Congruencia entre marcadores moleculares

La congruencia filogenética entre diferentes marcadores moleculares se evaluó mediante el test ILD (*Incongruence Length Difference*; Mickevich y Farris, 1981; Farris *et al.*, 1994) en el programa PAUP\* 4.0 (Swofford, 2002). Esta prueba se basa en el criterio de parsimonia (Farris *et al.*, 1995; Johnson y Soltis, 1998) y analiza las matrices de cada partición por separado, sumándose las longitudes de sus árboles óptimos, valor que se compara con el resultante del análisis de la matriz combinada, siempre igual o mayor a la suma de los valores de cada marcador analizado independientemente. La diferencia entre ambos valores representa la incongruencia derivada del análisis combinado de la información. Para evaluar la significación de esta diferencia, se remuestran al azar y con repetición todos los datos disponibles

para generar matrices aleatorias de igual tamaño que las de los marcadores individuales, para luego analizarlas y comparar sus costes como ya se ha descrito. Este proceso se repite un número suficiente de veces (normalmente >100) para generar una distribución nula de las diferencias de longitud de los árboles, esto es, asumiendo que los marcadores son congruentes. Finalmente se calcula la probabilidad de que la incongruencia observada en los datos reales caiga dentro de la distribución nula creada a partir del análisis de las particiones al azar. Un valor de probabilidad igual o inferior al 5% se asocia a la existencia de incongruencia en la señal filogenética entre los marcadores analizados.

Debido a que estudios empíricos han demostrado limitaciones del test ILD bajo ciertas condiciones (Dolphin *et al.*, 2000; Barker y Lutzoni, 2002; Darlu y Lecointre, 2002), la congruencia entre los diferentes marcadores también se evaluó mediante el cálculo del *Partitioned Bremer Support* (PBS; Baker y DeSalle, 1997). Se calcularon los valores de soporte de Bremer para cada una de las particiones y para los diferentes nodos de un árbol obtenido a partir de la matriz de secuencias combinadas. El soporte de Bremer se define como el número extra de pasos (en términos de longitud de árbol) que se necesitan dar a partir del valor del árbol óptimo para que el nodo en cuestión se colapse (Bremer, 1994). La contribución de cada partición génica al soporte total de las ramas en árbol resultante del análisis combinado bayesiano se estimó con el programa TreeRot v.3 (Sorenson y Franzosa, 2007) con algunas modificaciones sobre la configuración establecida por defecto, en concreto se usaron 100 réplicas de búsqueda heurística con un máximo de 50 árboles guardados en cada réplica.

#### 3.3.4.2.- *Partición de caracteres*

Algunos caracteres (posiciones nucleotídicas en nuestro caso) son bastante heterogéneos en cuanto a su modo de evolución debido a que las fuerzas que gobiernan su evolución son diferentes (Kimura, 1980; O'Grady *et al.*, 2002). Por ejemplo, las sustituciones nucleotídicas en las terceras posiciones de codón repercuten en menor medida en la composición aminoacídica de las proteínas para las que codifican que las sustituciones en las primeras o segundas posiciones, lo que se traduce en la existencia de tasas mutacionales más elevadas en las terceras posiciones de codón. Las tasas de sustitución nucleotídica también son diferentes entre los genomas nuclear, mitocondrial y cloroplástico (Wolfe *et al.*, 1987). De cara a

la realización de análisis filogenéticos, la existencia de dicha heterogeneidad entre los caracteres ha promovido la subdivisión de los datos en distintas particiones, de manera que los caracteres contenidos en cada una de ellas hayan evolucionado de acuerdo a unas reglas que son demostrablemente diferentes a las de las demás (Bull *et al.*, 1993).

En nuestro estudio, para seleccionar la estrategia óptima de partición de caracteres se analizaron las matrices individuales de cada gen subdivididas bajo distintos esquemas. En el caso de los genes codificantes para proteína se establecieron agrupaciones de caracteres tales como primeras / segundas / terceras posiciones de codón, primeras y segundas posiciones / terceras posiciones, y gen sin subdividir. Los genes ribosomales se subdividieron en tallos y bucles o bien se trataron como una única partición. Para cada una de dichas particiones se estimó el modelo evolutivo que mejor se ajustaba a la variación observada mediante el criterio de información de Akaike (AIC; Akaike, 1974), la versión corregida de AIC para muestras pequeñas (AICc; Sugiura, 1978; Hurvich y Tsai, 1989) y el criterio de información bayesiano (BIC: Schwarz, 1978) utilizando los programas jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) y MrAIC.pl v1.4.4 (Nylander, 2004). Las estrategias de partición con sus respectivos modelos evolutivos fueron sometidas a un análisis filogenético de máxima verosimilitud con el programa GARLI-PART v.0.97 (Zwickl, 2006). A partir de los valores de log-verosimilitud de cada uno de dichos análisis se pudo seleccionar la mejor estrategia de partición de cada gen mediante el cálculo de los valores de AIC, AICc y BIC.

Tras determinar la mejor estrategia de partición para cada gen, se llevó a cabo un análisis combinado de los alineamientos de los distintos marcadores con el programa Phyutility (Smith y Dunn, 2008) y dividiendo el alineamiento resultante en múltiples particiones en función del conjunto de datos (ver sección de Materiales y Métodos en los distintos capítulos), y entre las que se incluían: (i) partición por marcador; (ii) por marcador, cada uno de ellos con su mejor estrategia de partición individual; (iii) marcadores nucleares / marcadores mitocondriales; (iv) ADN codificante / ADN no codificante; (v) ADN codificante mitocondrial / ADN no codificante mitocondrial / ADN codificante nuclear / ADN no codificante nuclear; (vi) primeras posiciones de codón / segundas posiciones / terceras posiciones / genes ribosomales separados; (vii) primeras y segundas posiciones de codón / terceras posiciones / genes ribosomales separados; (viii) primeras posiciones de codón mitocondriales / segundas posiciones mitocondriales / terceras posiciones mitocondriales / primeras

posiciones nucleares / segundas posiciones nucleares / terceras posiciones nucleares / genes ribosomales separados; (ix) primeras y segundas posiciones de codón mitocondriales / terceras posiciones mitocondriales / primeras y segundas posiciones nucleares / terceras posiciones nucleares / genes ribosomales separados; y (x) alineamiento no subdividido. Para cada una de las particiones se seleccionó el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaba y GARLI-PART v.0.97 (Zwickl, 2006) se utilizó para calcular los valores de log-verosimilitud correspondientes a cada estrategia para luego calcular sus respectivos valores de AIC, AICc y BIC.

#### 3.3.4.3.- Metodología de inferencia filogenética

La inferencia filogenética a partir de los esquemas de partición seleccionados fue llevada a cabo mediante métodos de máxima verosimilitud y de inferencia bayesiana, utilizando para ello los programas GARLI-PART v.0.97 y MrBayes v.3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), respectivamente.

Los árboles obtenidos durante el proceso de selección de particiones fueron escogidos como las mejores búsquedas de máxima verosimilitud para dichos alineamientos. Para estos conjuntos de datos además se llevaron a cabo búsquedas de tipo *bootstrap* con GARLI-PART v.0.97, donde cada análisis constó de 100 réplicas. Los árboles resultantes se leyeron y analizaron con el programa SumTrees (Sukumaran y Holder, 2010).

Los análisis de inferencia bayesiana se basaron también en el esquema de partición seleccionado con sus respectivos modelos evolutivos. Para las búsquedas se ejecutaron simultáneamente dos análisis MCMC, cada uno con cuatro cadenas y obteniendo un número de generaciones en función del conjunto de datos analizado, de las cuales se muestreaba una cada 1000. El valor de *burnin* determina el número de muestras iniciales que se descartan antes de realizar las estimaciones estadísticas, y se calculó analizando la convergencia de los diferentes parámetros estimados para cada una de las cadenas MCMC con el programa Tracer v.1.4.1 (Rambaut y Drummond, 2007). Además, las probabilidades posteriores de cada una de las dicotomías recuperadas a lo largo de las cadenas MCMC se exploraron gráficamente con el programa AWTY (Wilgenbusch *et al.*, 2004) en su versión en línea (<http://ceb.csit.fsu.edu/awty>). AWTY también permitió determinar si un análisis había transcurrido durante un número suficiente de generaciones, basándose en el

nivel de estabilidad de las probabilidades posteriores en los árboles muestreados durante el análisis. Finalmente se obtuvo el árbol consenso estricto con una estima de las longitudes de rama en términos de probabilidad de acumulación de cambios en las mismas, y de la probabilidad de que los agrupamientos obtenidos fueran correctos, que se interpretaron como una medida de soporte (Alfaro *et al.*, 2003).

#### 3.3.4.4.- *Congruencia entre métodos filogenéticos*

Los árboles obtenidos con distintos métodos de inferencia filogenética a partir del mismo conjunto de datos fueron sometidos a un análisis comparativo. La similitud topológica global se evaluó con el programa Compare2Trees (Nye *et al.*, 2006), un algoritmo que empareja las ramas de los árboles a comparar en función del patrón de ramificación de sus nodos terminales. El resultado de este análisis es un alineamiento de los árboles en el que los caracteres alineados son ramas que comparten determinadas particularidades topológicas. Una vez alineados los árboles, el algoritmo calcula el grado de similitud relativa entre sus respectivas topologías.

Complementariamente a este análisis, se calculó el índice de congruencia entre árboles filogenéticos  $I_{cong}$  desarrollado por de Vienne *et al.* (2007) y basado en el estimador MAST (*Maximum Agreement Subtrees*), el cálculo del número mínimo de ramas que hay que podar en cada uno de los dos árboles sometidos a comparación para obtener una topología común a ambos. El valor MAST es una medida simple pero poderosa para evaluar la congruencia entre dos árboles filogenéticos. Para obtener la significación estadística del índice  $I_{cong}$  se generó una distribución de los valores MAST calculados a partir de árboles del mismo tamaño que los originales y generados aleatoriamente, para saber si estos últimos serán más similares entre sí de lo que se esperaría por azar.

Por último, se calculó la diferencia simétrica ente árboles o distancia de Robinson-Foulds (Robinson y Foulds, 1981), esto es, el número de ramificaciones no compartidas entre los dos árboles dividido entre el número total de ramificaciones presente en los árboles. Para ello se utilizó el programa EPoS (Griebel *et al.*, 2008).

#### 3.3.4.5.- *Reloj molecular*

Los análisis de datación molecular fueron llevados a cabo con BEAST v.1.7.1 (Drummond *et al.*, 2012). Los archivos XML para BEAST fueron elaborados con el programa BEAUTi v.1.7.1 (Drummond *et al.*, 2012), especificando dos relojes relajados independientes, uno para la partición mitocondrial y otro para la partición nuclear. BEAST ofrece la posibilidad de escoger entre dos tipos de distribuciones paramétricas para modelar la variación en las tasas evolutivas de cada rama en el caso de relojes relajados: lognormal y exponencial. En la distribución lognormal la varianza está escalada de manera relativa a la longitud de la rama en unidades de tiempo, implicando que la tasa evolutiva cambia continuamente a lo largo de dicha rama. La distribución exponencial implica que los cambios ocurren exclusivamente en los nodos, siendo la magnitud del cambio independiente de la longitud de la rama (Drummond *et al.*, 2006). Siguiendo las recomendaciones de Drummond *et al.* (2004), se usó una distribución lognormal, que además permite evaluar el grado de conservación de las tasas evolutivas en el árbol. La estrategia de partición de los datos fue la empleada para los análisis filogenéticos, y a cada una de ellas se le asignó su respectivo modelo evolutivo. La optimización de los parámetros se llevo a cabo sobre una topología previamente fijada, y que fue la obtenida a partir del análisis bayesiano de los marcadores combinados. Una vez definida la topología en el archivo XML, se eliminaron los operadores relacionados con las reordenaciones topológicas y se ejecutaron dos cadenas MCMC independientes, cada una de ellas integrada por un número generaciones variable en función del conjunto de datos analizado, y muestreando los resultados cada mil generaciones. La convergencia de los parámetros se verificó mediante la inspección de las cadenas en Tracer v.1.4.1 y el 10% de los valores iniciales de cada cadena se descartó (*burnin*) antes de proceder al análisis combinado de los resultados individuales con el programa LogCombiner v.1.7.1 (Drummond *et al.*, 2012). Los árboles se anotaron con el programa TreeAnnotator v.1.7.1 (Drummond *et al.*, 2012).

#### 3.3.4.6.- *Tasas y patrones de diversificación*

Las gráficas LTT (*lineage-through-timeplots*; LTT) son una herramienta visual comúnmente utilizada para estudiar el patrón de diversificación filogenética, representando la acumulación de linajes a través del tiempo a partir de una filogenia ultramétrica y con longitudes de rama proporcionales al tiempo de divergencia (Nee *et*

*al.*, 1994). Las gráficas LTT se generaron utilizando el módulo `ltt.plot` del paquete APE (Paradis *et al.*, 2004) en el entorno de programación estadística R (R Development Core Team, 2012), y utilizando para ello cronogramas ultramétricos generados en los análisis de reloj molecular con BEAST v.1.7.1. Para representar exclusivamente diversificación asociada a eventos de especiación se podó la topología hasta obtener un árbol con un único representante por cada especie. Además de la gráfica LTT, también se obtuvo una gráfica de tasas de diversificación a través del tiempo (*rates-through-timeplots*; RTT), calculando las tasas netas de diversificación dentro de una serie de intervalos consecutivos, fijados en este caso a medio millón de años de amplitud. Para el cálculo de las tasas netas de diversificación y la representación de la gráfica RTT se empleó la función `plot.rtt` y las librerías de los paquetes escritos en lenguaje R APE y LASER (Rabosky, 2006b), además de un código de R amablemente cedido por Víctor Soria-Carrasco (Department of Animal and Plant Sciences, University of Sheffield, UK).

Para el análisis de diversificación - también se evaluó el estadístico  $\gamma$  (Pybus y Harvey, 2000), que describe la distancia promedio de los tiempos de separación de linajes con relación al punto central del árbol. Este test detecta desviaciones respecto a un modelo de generación constante de especies de tipo nacimiento puro. Valores negativos de  $\gamma$  indican que la mayor parte de los eventos de ramificación han ocurrido temprano en el árbol, esto es, entre la raíz y el punto central, mientras que los resultados positivos denotan una generación de linajes reciente sesgada hacia a la porción más reciente del árbol. La hipótesis nula de especiación constante se rechaza si el valor de  $\gamma$  es inferior a -1,645 ( $\alpha = 0,05$ ). Un muestreo de especies incompleto puede desviar los resultados del test de Pybus y Harvey (2000), generando resultados artificiales que tienden a demostrar la existencia de una diversificación rápida temprana (Brock *et al.*, 2011). Esto es debido a la sobrerrepresentación de los nodos más basales de la filogenia, que en un muestreo sesgado tienen más probabilidad de estar representados que los terminales. Para evitar este problema se utilizó el test Monte Carlo de tasas constantes (MCCR; Pybus y Harvey, 2000), que simula una distribución nula de  $\gamma$  sobre árboles incompletamente muestreados. En un primer paso de este algoritmo se simularon 500 árboles con un número de terminales equivalente al número de taxones descritos para el grupo de estudio, y a continuación se podaron ramas al azar hasta generar árboles con el número de taxones que conforman el muestreo real. Seguidamente se calculó el valor del estadístico  $\gamma$  para cada uno de estos árboles y se generó la distribución nula sobre la que se calculó la significación estadística  $P$  como la proporción de los valores de  $\gamma$  simulados inferiores al valor de  $\gamma$

obtenido a partir de los datos reales. El procedimiento se realizó mediante el módulo `gammatest` en el paquete de R `PHYTOOLS` (Revell, 2011). El test MCCR se ejecutó con el módulo `mccrTest` del paquete de R `LASER`.

El ajuste de los datos a varios modelos de especiación de tasa constante (nacimiento puro, muerte-nacimiento) y de tasa variable (logístico dependiente de la densidad, exponencial dependiente de la densidad, Yule de dos tasas, Yule de tres tasas) se evaluó con el módulo `fitdAICrc` del paquete de R `LASER`. Para ello se ajustaron los diferentes modelos de tasa variable a los datos y se contrastó la verosimilitud de los datos bajo dichos modelos frente a modelos alternativos con tasas constantes de extinción y de especiación. La hipótesis nula, la constancia de la tasa de diversificación, se evaluó calculando el incremento del criterio de información de Akaike para el mejor modelo de diversificación de tasa constante ( $\Delta AIC_{RC}$ ), tal y como se describe en Rabosky (2006a), de modo que un incremento positivo sugeriría que los datos se ajustan mejor a un modelo de tasa variable. La significación estadística de este resultado se evaluó mediante la generación de una distribución nula del  $\Delta AIC_{RC}$  basada en 1000 simulaciones de topologías obtenidas al azar y con el mismo número de taxones.

#### 3.3.4.7.- Señal filogenética de los marcadores moleculares

La información filogenética de cada uno de los marcadores moleculares para cada instante de la historia evolutiva de las especies estudiadas se analizó con la aplicación en línea `PhyDesign` (López-Giráldez y Townsend, 2011). Esta se basa en el método "*phylogenetic informativeness*" desarrollado por Townsend (2007) para cuantificar la capacidad que tiene un conjunto de caracteres a la hora de resolver el patrón de ramificación de un árbol filogenético en un intervalo temporal determinado. El método compara las tasas evolutivas entre posiciones frente a las tasas ideales basadas en la longitud de un árbol ultramétrico. El programa estima el valor neto de señal filogenética calculando la probabilidad de que una sustitución ocurra a lo largo de un internodo y no sea enmascarada por una sustitución subsiguiente (Townsend, 2007). Se ejecutaron dos análisis diferentes con `PhyDesign`, utilizando en cada caso la aplicación recomendada `HyPhy` (Pond *et al.*, 2005), y basados en un cronograma de `BEAST` obtenido según se describe en el apartado 3.3.4.5 (página 37). En el primero de los análisis se calculó la señal filogenética de cada uno de los marcadores por separado, mientras que en el segundo se hizo lo propio para la información



filogenética contenida en cada una de las particiones que constituyen el esquema óptimo de partición del conjunto de datos en cuestión.

## 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.- Sistemática molecular y evolución de la subfamilia Chrysomelinae Latreille, con especial énfasis en la fauna australiana (Coleoptera, Chrysomelidae)

#### 4.1.1.- Introducción

Con estimas alrededor de unas 360.000 especies, el orden Coleoptera representa casi una cuarta parte de todas las especies descritas (Bouchard *et al.*, 2009), y entre ellos destaca la familia de coleópteros herbívoros Chrysomelidae por ser uno de los grupos más numerosos, habiéndose propuesto unas 40.000 especies hasta la fecha (Chaboo *et al.* 2014). A su vez, con aproximadamente 4.000 especies (Reid *et al.*, 2009), Chrysomelinae es la quinta subfamilia en cuanto a tamaño de las once que conforman la familia Chrysomelidae (Reid, 2006). Se trata de un linaje distribuido por todo el mundo y cuyas especies, como en el caso de todos los crisomélidos, poseen un estrecho vínculo ecológico con sus plantas hospedadoras. Los crisomelinos han colonizado y se han diversificado en prácticamente todos los ecosistemas con vegetación, incluyendo zonas extremas como regiones alpinas y estepas subárticas y subantárticas, o regiones áridas de todo el mundo (Silfverberg, 1994; Daccordi, 1996). Dentro de esta extensa distribución existen diferencias en cuanto al grado de endemidad de los géneros, siendo la región biogeográfica Australiana el territorio que alberga una mayor proporción de géneros exclusivos, seguida de las regiones Neotropical y Paleotropical (Daccordi, 1983). Tales observaciones han promovido la formulación de una hipótesis biogeográfica que sitúa el origen de los crisomelinos en el antiguo supercontinente de Pangea entre finales del periodo Jurásico e inicios del Cretácico (Daccordi, 1994, 1996). Según este modelo, la escisión tectónica de Pangea en los continentes Gondwana y Laurasia provocó también la separación geográfica del ancestro común de todos los crisomelinos, cuyos descendientes habrían diversificado profusamente en las masas continentales del Hemisferio Sur. Este último punto se apoya principalmente en existencia de caracteres morfológicos compartidos por géneros con distribuciones gondwánicas disyuntas (Daccordi, 1994). Sin embargo, datos moleculares recientes, y a falta de objeciones por parte del registro fósil, apoyan un origen de la familia a principios del Cenozoico, lo cual invalida esas hipótesis previas sobre el origen de la subfamilia en el Jurásico (Gómez-Zurita *et al.*, 2007a; Hunt *et al.*, 2007). En este periodo Pangea ya se había fragmentado y Australia permanecía unida a la Antártida y a Sudamérica, y el origen

de esta subfamilia en esta región del Planeta continúa resultando una hipótesis viable y que requiere ser contrastada.

La investigación sobre el origen y la evolución de los crisomelinos pasa necesariamente por la inferencia de filogenias que incluyan la mayor parte de la diversidad del grupo. Hasta la fecha se han generado filogenias moleculares que incluían Chrysomelinae, pero para estudios centrados en cuestiones diferentes a su origen (Hsiao, 1994; Farrell, 1998; Duckett *et al.*, 2004; Farrell y Sequeira, 2004; Gómez-Zurita *et al.*, 2008; Jurado-Rivera *et al.*, 2009; Chaboo *et al.*, 2014), excepto para responder a la cuestión concreta sobre la edad del linaje (Gómez-Zurita *et al.*, 2007a). Un aspecto fundamental para esta investigación sobre el origen y evolución de Chrysomelinae es reconocer precisamente cuáles son sus principales linajes evolutivos. La sistemática de los crisomelinos se ha basado clásicamente en caracteres morfológicos, y sus tribus, subtribus y géneros han sido objeto de numerosas reorganizaciones (Stål, 1865; Weise, 1916; Seeno y Wilcox, 1982; Daccordi, 1994; Cox, 1994; Steinhausen, 1998; Reid, 2002; Kippenberg, 2010; Tabla 1-1, página 4). La falta de consenso entre los taxónomos especialistas en crisomelinos estriba principalmente en que son muy pocos los caracteres que objetivamente permiten la diagnosis de grandes grupos, así como cierto grado de subjetividad en las interpretaciones de cada uno de los autores. Investigadores como Stål (1865) y la mayoría de autores clásicos que han trabajado sobre esta familia hasta Daccordi (1994) fundamentan sus decisiones taxonómicas exclusivamente en el examen de las fases adultas de los coleópteros, mientras que otros como por ejemplo Kimoto (1962), Takizawa (1989), Reid (1991, 1992, 1995, 2002, 2006), Steinhausen (1998) y Kippenberg (2010), conceden una mayor importancia taxonómica a los atributos de los estadios inmaduros. Desde una perspectiva molecular, el estudio sistemático de Gómez-Zurita *et al.* (2008) arroja cierta luz sobre los principales linajes evolutivos en Chrysomelinae, con la limitación de que en el mismo se analizaron únicamente 27 de los 133 géneros reconocidos en la subfamilia (*sensu* Daccordi, 1984). Los resultados de dicho trabajo son consistentes con algunas de las anteriores propuestas sistemáticas, y establecen la existencia de al menos tres grandes líneas evolutivas, que incluirían: (1) *Timarcha* en la región paleártica occidental y sus parientes Neárticos, propuesta como una subfamilia aparte, Timarchinae, o en todo caso como la tribu Timarchini, hermana del resto de Chrysomelinae; (2) Chrysomelina+Phyllodectina; y (3) resto de crisomelinos, ambas de amplia distribución.

La fauna australiana de Chrysomelinae, con su elevado nivel de diversidad y endemidad, también para categorías taxonómicas supraespecíficas, constituye un elemento fundamental para el estudio sistemático de la subfamilia. Hasta el momento se han descrito para el continente unas 750 especies asignadas a 43 géneros, de los cuales 30 son exclusivos de Australia (Reid, 2006; Reid *et al.*, 2009). Cuatro de los géneros concentran más de 70 especies cada uno (*Paropsis*, *Paropsisterna*, *Peltoschema* y *Trachymela*), todas ellas vinculadas tróficamente a dos grupos de plantas propias del bioma esclerófilo y muy diversificadas en Australia: *Acacia* y *Eucalyptus*. Los géneros restantes poseen en general pocas especies (diez de ellos son monotípicos), y habitan fundamentalmente los bosques pluviales de la costa oriental del continente (Reid, 2006). Entendemos que, debido a su riqueza tanto genérica como específica, a su marcado carácter singular, y a su potencial papel como pieza clave en la historia biogeográfica de la subfamilia, la investigación de las relaciones filogenéticas de los crisomelinos australianos puede clarificar muchos aspectos de la sistemática de la subfamilia en su conjunto.

#### **4.1.2.- Objetivos**

En el presente capítulo se pretende estudiar la sistemática molecular de la subfamilia Chrysomelinae con un énfasis especial en su componente australiano, basándonos para ello en la información filogenética a partir de cinco marcadores moleculares, dos obtenidos a partir del genoma mitocondrial y tres del nuclear. En particular consideramos interesante (i) inferir una hipótesis filogenética molecular para los principales linajes de la subfamilia Chrysomelinae y contrastarla con las propuestas morfológicas existentes, (ii) incorporar una dimensión temporal a la historia del grupo, así como (iii) estudiar su evolución desde un enfoque biogeográfico, ecológico y paleoclimático.

#### **4.1.3.- Materiales y métodos**

##### *4.1.3.1.- Muestreo taxonómico*

En este capítulo se han analizado 273 especímenes pertenecientes a 241 especies de coleópteros crisomélidos (Tabla 4.1-1). Entre las mismas se incluyen 176 especies de crisomelinos australianos referidas a 30 de los 43 géneros actualmente

reconocidos en el grupo (Reid, 2006; Reid *et al.*, 2009). Como se ha mencionado en el apartado 3.1.2 (página 17), 68 de las especies australianas colectadas para este trabajo podrían ser nuevas para la ciencia (C. A. M. Reid, comunicación personal), y de dicho material inédito procede la descripción del nuevo género *Canobolas* Reid, Jurado-Rivera y Beatson, 2009. El grupo no australiano de las especies de Chrysomelinae incluidas en nuestro estudio está constituido por 50 especies repartidas en 31 géneros, y cuya procedencia se extiende al resto de regiones biogeográficas mundiales. Como grupos externos se incluyen 11 especies pertenecientes a otras subfamilias de Chrysomelidae, como son Alticinae (*Altica iberica*), Cassidinae (*Cassida viridis*), Clytrinae (*Lachnaia variolosa*), Eumolpinae (*Hermesia aurata*, *Megascelis* sp., *Rhyparida allenii*), Galerucinae (*Galeruca rufa*, *Luperus pyrenaicus*) y Spilopyrinae (*Macrolema marginata*, *Richmondia olliffi*, *Spilopyra sumptuosa*).

Subfamilia	Especie	Localidad	Id.	Nº ej.
Alticinae	<i>Altica iberica</i> (Weise, 1892)	Sierra de Javalambre, Teruel, España.	-	1
Cassidinae	<i>Cassida viridis</i> (Linnaeus, 1758)	Estação de Ourique, Beja, Portugal.	1, 2	2
Chrysomelinae	<i>Americanotimarcha cerdo</i> Stål, 1862	Waldport, Oregón, USA.	-	1
	<i>Aphilon minutum</i> Broun, 1880	Hunua Ness Valley, Nueva Zelanda.	1, 2	2
	<i>Apterocuris sibiricus</i> Gebler, 1830	Este de Kazajistán	-	1
	<i>Araucanomela wellingtonensis</i> Bechyné y Bechyné, 1973	Parque Nacional Vicente Pérez Rosales, Llanguihue, Chile.	-	1
	<i>Ateratocerus intricatus</i> Blackburn, 1890	Casacade, NSW, Australia.	-	1
	<i>Brachyhelops hahni</i> Fairmaire, 1885	Reserva Magallanes, Punta Arenas, Chile.	-	1
	<i>Callidemum hypochalceum</i> (Germar, 1848)	Hattah-Kulkyne National Park, Victoria, Australia.	-	1
	<i>Callidemum limbatum</i> (Baly, 1875)	Illawarra State Recreation Area, NSW, Australia.	1	1
	<i>Callidemum limbatum</i> (Baly, 1875)	Wild Cattle Flora Reserve, NSW, Australia.	2	1
	<i>Callidemum limbatum</i> (Baly, 1875)	Washpool National Park, NSW, Australia.	3	1
	<i>Callidemum parryi</i> (Baly, 1866)	Norman Jolly Forest Reserve, NSW, Australia.	1, 2	2
	<i>Callidemum prasinum</i> (Baly, 1856)	Norman Jolly Forest Reserve, NSW, Australia.	-	1
	<i>Calligrapha labyrinthica</i> (Stål, 1859)	Campus universitario sede San Ramón. Costa Rica.	1, 2	2
	<i>Calomela bartoni</i> (Baly, 1856)	Bulls Head, ACT, Australia.	-	1
	<i>Calomela curtisi</i> (Kirby, 1818)	Vineyard, NSW, Australia.	-	1
	<i>Calomela fugitiva</i> Lea, 1903	Mount Warning National Park, NSW, Australia.	-	1
	<i>Calomela fulvilabris</i> (Germar, 1848)	Jerrys Plains NSW, Australia.	-	1
	<i>Calomela ioptera</i> (Baly, 1856)	Mount Keira, NSW, Australia.	-	1
	<i>Calomela juncta</i> Lea, 1903	Royal National Park, NSW, Australia.	-	1
	<i>Calomela maculicollis</i> (Boisduval, 1835)	Bulls Head, ACT, Australia.	-	1
	<i>Calomela pallida</i> (Baly, 1856)	Armidale, NSW, Australia.	-	1
	<i>Calomela parilis</i> Lea, 1903	Warkworth, NSW, Australia.	-	1
	<i>Calomela pulchella</i> (Baly, 1856)	Windsor, NSW, Australia.	-	1
	<i>Calomela ruficeps</i> (Boisduval, 1835)	Stanwell Park, NSW, Australia.	-	1

<i>Calomela satelles</i> Blackburn, 1893	Kalgoorlie, WA, Australia.	-	1
<i>Calomela sp. aff. acaciae</i>	Coolgardie, WA, Australia.	-	1
<i>Calomela sp. aff. tarsalis</i>	Coolgardie, WA, Australia.	-	1
<i>Canobolas nobilis</i> (Lea, 1917)	Mount Canobolas, NSW, Australia.	1, 2	2
<i>Chalcolampra sp.</i> WA1	Stirling Range National Park, WA, Australia.	-	1
<i>Chalcolampra walgalu</i> Reid, 1993	Mount Girini, ACT, Australia.	-	1
<i>Chalcomela nitida</i> (Baly, 1856)	Mount Warning National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Chalcomela sp.</i> 1	Mount Hyland Nature Reserve, NSW, Australia.	1, 2	2
<i>Chrysolina (Pleurosticha) sp.</i>	Kazhakovsky Komen, Montes Urales, Rusia.	-	1
<i>Chrysolina americana</i> (Linnaeus, 1758)	Cerro Gordo, Granada. España.	-	1
<i>Chrysolina eurina</i> (Fruvaldszky, 1883)	Mundybash, West Siberia, Rusia.	-	1
<i>Chrysolina kuesteri</i> (Helliesen, 1912)	Parque Natural de Tejeda, Almirajara y Alhama, Granada, España.	-	1
<i>Chrysolina lepida</i> (Olivier, 1807)	Sierra de la Sagra, Granada, España.	-	1
<i>Chrysolina obsoleta</i> (Brullé, 1838)	Monte Aguirre, Tenerife, España.	-	1
<i>Chrysolina quadrigemina</i> (Suffrian, 1851)	Bragança, Portugal.	-	1
<i>Chrysolina striata</i> (Fabricius, 1781)	Ezulwini Valley, Swaztland, Suráfrica.	-	1
<i>Chrysolina sturmi</i> (Westhoff, 1882)	Chelyabinck region, Montes Urales, Rusia.	-	1
<i>Chrysolina tundralis</i> (Jacobson, 1910)	Kazhakovsky Komen, Montes Urales, Rusia.	-	1
<i>Chrysolina viridana</i> (Küster, 1854)	Riofío, Granada, España.	-	1
<i>Chrysomela collaris</i> Linnaeus, 1758	Coordillera Kurai, Montañas Altai, Rusia	-	1
<i>Colaspidema atrum</i> (Olivier, 1799)	Sierra de la Sagra, Granada, España.	-	1
<i>Crosita rugulosa</i> (Gebler, 1841)	Coordillera Chuya, Montañas Altai, Rusia.	-	1
<i>Cyrtonus sp.</i>	Sierra de Albarracín, Teruel, España.	-	1
<i>Cystocnemis discoidea</i> Gebler, 1890	Coordillera Ivanovsky, Kazajistán.	-	1
<i>Desmogamma ljunghi</i> Stål, 1859	Areia Branca, Paraiba, Brasil.	-	1
<i>Dicranosterna globulosa</i> (Chapuis, 1877)	Yalgorup National Park, WA, Australia.	-	1
<i>Dicranosterna immaculata</i> (Marsham, 1808)	Warkworth, NSW, Australia.	1	1
<i>Dicranosterna immaculata</i> (Marsham, 1808)	Black Mountain, ACT, Australia.	2	1
<i>Dicranosterna picea</i> (Olivier, 1807)	Davies Creek, Queensland, Australia.	-	1
<i>Dicranosterna semipunctata</i> (Chapuis, 1877)	Oxley Wild Rivers National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Dicranosterna sp. aff. semipunctata</i>	Bulls Head, ACT	-	1
<i>Entomoscelis adonidis</i> (Pallas, 1771)	Serra do Courel, Lugo, España.	-	1
<i>Ethomela podagrosa</i> (Lea, 1903)	Mount Kosciuszko National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Ethomela sp.</i> 1	Mount Kosciuszko National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Ethomela sp.</i> 2	Mount Kosciuszko National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Ethomela sp.</i> 3	Mount Girini, ACT, Australia.	-	1
<i>Ethomela sp.</i> WA1	Stirling Range National Park, WA, Australia.	-	1
<i>Eulina curtisi</i> Baly, 1855	New England National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Eulina pulchra</i> Lea, 1929	Dorrego, NSW, Australia.	-	1
<i>Ewanius nothofagi</i> Reid, 2002	Lake Skinner, Tasmania,	1	1

	Australia.		
<i>Ewanius nothofagi</i> Reid, 2002	Companion River, Tasmania, Australia.	2	1
<i>Faex aff. notatipennis</i>	Mount Wellington, Tasmania, Australia.	-	1
<i>Faex coadnuta</i> (Chapuis, 1877)	Maddens Falls, Dharnwal NR, Darkes Forest.	-	1
<i>Faex notatipennis</i> (Chapuis, 1877)	Kanangra-Boyd National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Faex planior</i> (Blackburn 1898)	Ben Lomond Natinal Park, Tasmania, Australia.	-	1
<i>Faex sp.</i>	Tasmania	-	1
<i>Faex subfasciata</i> (Chapuis, 1877)	Blue Mountains National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Faex transversomaculata</i> (Clark, 1865)	Balingup, WA, Australia.	-	1
<i>Faex wonarua</i> Daccordi, 2003	Barrington Tops State Recreation Area, NSW, Australia.	-	1
<i>Gasterantrodes inopinatus</i> Daccordi, 1981	Paarl, Western Cape, Suráfrica.	-	1
<i>Gastrophysa polygoni</i> (Linnaeus, 1758)	La Garriga, Barcelona, España.	-	1
<i>Gastrophysa viridula</i> (De Geer, 1775)	Estany de Tòro, Vall d'Aran, España.	-	1
<i>Geomela sp. 1</i>	Mount Girini, ACT, Australia.	-	1
<i>Geomela sp. 2</i>	Mount Kosciuszko National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Geomela sp. aff. blackburni</i>	Mount Towak, NSW, Australia.	-	1
<i>Gonioctena olivacea</i> (Forster, 1771)	Arroyo Santiago de la Espada, Albacete, España.	-	1
<i>Gonioctena variabilis</i> (Olivier, 1790)	Arroyo Santiago de la Espada, Albacete, España.	1, 2	2
<i>Grammicomela quadrilineata</i> Lea, 1916	Mount Moombil, NSW, Australia.	1, 2, 3	3
<i>Grammicomela quadrilineata var. rara</i> Lea, 1916	Mount Hyland Nature Reseve, NSW, Australia.	-	1
<i>Hydrothassa fairmairei</i> Brisout, 1866	Luelmo, Zamora, España.	-	1
<i>Hydrothassa glabra</i> (Herbst, 1783)	n.a.	-	1
<i>Johannica gemellata</i> (Westwood, 1849)	Woko National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Jolivetia obscura</i> (Philippi 1864)	Isla Negra, San Antonio, Chile.	-	1
<i>Labidomera clivicollis</i> (Kirby, 1837)	L'Outaouais, Quebec, Canadá.	-	1
<i>Lamprolina aeneipennis aggr sp. 1</i>	Bellbird, NSW, Australia.	-	1
<i>Lamprolina aeneipennis aggr sp. 2</i>	White Beech Flora Reserve, NSW, Australia.	-	1
<i>Lamprolina aeneipennis sp. 1</i>	Mt Keira, NSW, Australia.	-	1
<i>Lamprolina aeneipennis sp. 2</i>	Cumberland State Forest, NSW, Australia.	-	1
<i>Lamprolina impresicollis</i> Baly, 1875	Armidale, NSW, Australia.	-	1
<i>Lamprolina simillima</i> Baly, 1855	Cumberland State Forest, NSW, Australia.	-	1
<i>Lamprolina simplicipennis</i> Lea, 1916	Long Point, NSW, Australia.	-	1
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say, 1824)	Jayena, Granada, España.	-	1
<i>Novacastria nothofagi</i> Selman en Selman y Lowman, 1983	Barrington Tops National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Oomela distincta</i> Lea, 1917	Red Cedar Flora Reserve, NSW, Australia.	-	1
<i>Oomela elliptica</i> Lea, 1916	Red Cedar Flora Reserve, NSW, Australia.	-	1
<i>Oomela variabilis</i> Lea, 1916	Dorrigo National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Oreomela (S. str.) sp.</i>	Ukok plateau, Altai, Russia.	-	1
<i>Oreothassa martjanowi</i> Jacobson, 1901	Ust'-Koksa Kabanukha, Altai, Russia.	-	1
<i>Palaeomela punctifrons</i> Lea, 1903	Mount Towac, NSW, Australia.	-	1
<i>Palaeomela sp.</i>	Mount Kosciuszko National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsides erudita</i> (Baly, 1862)	Gloucester River Camping Area,	-	1

	NSW, Australia.		
<i>Paropsides sp. 1</i>	Royal National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsides sp. 2</i>	Woko National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsides sp. 3</i>	Dorrigo National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsides sp. 4</i>	New England National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsides umbrosa</i> (Chapuis, 1877)	Royal National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsis aegrota ssp. elliotti</i> Selman, 1983	Sky Village Road, Tasmania, Australia.	-	1
<i>Paropsis aspera</i> Chapuis, 1877	Black Mountain, ACT, Australia.	-	1
<i>Paropsis atomaria</i> Olivier, 1807	Muswelbrook, NSW, Australia.	1	1
<i>Paropsis atomaria</i> Olivier, 1807	Black Mountain, ACT, Australia.	2	1
<i>Paropsis atomaria</i> Olivier, 1807	Molonglo Gorge Nature Reserve, ACT, Australia.	3	1
<i>Paropsis blandina</i> Blackburn, 1901	Jarrahdale, WA, Australia.	-	1
<i>Paropsis charybdis</i> Stål, 1860	Black Mountain, ACT, Australia.	-	1
<i>Paropsis dilatata</i> Erichson, 1842	Arve Loop, Tasmania.	-	1
<i>Paropsis geographica</i> Baly, 1866	Vittoria, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsis maculata</i> (Marsham, 1808)	Stanwell Tops, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsis minor</i> (Marsham, 1808)	Darques Forest, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsis obsoleta</i> Olivier, 1807	Muswelbrook, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsis ornata</i> (Marsham, 1808)	Darques Forest, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsis pictipennis</i> Boheman, 1859	Kanangra-Boyd National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsis porosa</i> Erichson, 1842	Jenolan Cave, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsis rubidipes</i> Blackburn, 1901	Russell, ACT, Australia.	-	1
<i>Paropsis sp. 2</i>	White Beech Flora Reserve, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsis sp. 3</i>	Picadilly Circus, ACT, Australia.	-	1
<i>Paropsis sp. aff. geographica</i> WA1	Balingup, WA, Australia.	-	1
<i>Paropsis sp. WA1</i>	Mumballup, WA, Australia.	-	1
<i>Paropsis variolosa</i> (Marsham, 1808)	Jerrys Plains, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna aff. intertincta</i> WA1	Waroona, WA, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna aff. intertincta</i> WA2	WA, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna aff. intertincta</i> WA3	Karridale, WA, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna aff. intertincta</i> WA4	Denmark, WA, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna agricola</i> (Chapuis, 1877)	Kanangra-Boyd National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna aurea</i> (Blackburn, 1899)	Mount Girini, ACT, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna beata</i> aggr. 1	Cessnock, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna bimaculata</i> (Olivier, 1807)	Arve Loop Forest Reserve, Tasmania, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna cloelia</i> (Stål, 1860)	Saramea, Nouvelle Calédonie.	-	1
<i>Paropsisterna crocata</i> (Boisduval, 1835)	Kingsbury Lookout, WA, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna debilis</i> (Chapuis, 1877)	Beedelup National Park, WA, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna decolorata</i> (Chapuis, 1877)	Marulan, NSW, Australia.	1	1
<i>Paropsisterna decolorata</i> (Chapuis, 1877)	Jerrys Plains, NSW, Australia.	2	1
<i>Paropsisterna decolorata</i> (Chapuis, 1877)	Cessnock, NSW, Australia.	3	1
<i>Paropsisterna decolorata</i> (Chapuis, 1877)	Bellbird, NSW, Australia.	4	1
<i>Paropsisterna geniculata</i> (Boisduval, 1835)	Black Mountain, ACT, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna laesa</i> (Germar, 1848)	Muswelbrook, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna lignea</i> (Erichson, 1842)	Barrington Tops National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna liturata</i> (Marsham, 1808)	Darques Forest, NSW, Australia.	1, 2	2
<i>Paropsisterna liturata</i> (Marsham, 1808)	Black Mountain, ACT, Australia.	3	1
<i>Paropsisterna m-fuscum</i> (Boheman, 1859)	Marulan, NSW, Australia.	1	1
<i>Paropsisterna m-fuscum</i> (Boheman, 1859)	Molonglo Gorge Nature Reserve,	2	1



	ACT, Australia.		
<i>Paropsisterna nigerrima</i> (Germar, 1848)	Balingup, WA, Australia.	1	1
<i>Paropsisterna nigerrima</i> (Germar, 1848)	Noble Falls, WA, Australia.	2	1
<i>Paropsisterna nobilitata</i> (Erichson, 1842)	Kanangra-Boyd National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna rufipes</i> (Fabricius, 1801)	Dilgry Circle. Barrington Tops. NSW	-	1
<i>Paropsisterna semifumata</i> (Blackburn, 1901)	Woko National Park, NSW, Australia.	1, 2	2
<i>Paropsisterna sexpustulata</i> (Marsham, 1808)	NSW, Australia	-	1
<i>Paropsisterna</i> sp. 1	Murmorah State Recreation Area, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna</i> sp. aff. <i>atalanta</i> 1	Mount Hyland Nature Reserve, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna</i> sp. aff. <i>aurea</i> 1	Washpool National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna</i> sp. aff. <i>captiosa</i> WA1	Blackwood River, WA, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna</i> sp. aff. <i>decolorata</i> WA1	Denmark, WA, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna</i> sp. aff. <i>nobilitata</i>	Black Mountain, ACT	1	1
<i>Paropsisterna</i> sp. aff. <i>nobilitata</i>	Picadilly Circus, ACT, Australia.	2	1
<i>Paropsisterna</i> sp. aff. <i>variabilis</i> WA1	Willow Springs, WA, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna subcostata</i> (Chapuis, 1877)	Florentine Valley, Tasmania, Australia.	-	1
<i>Paropsisterna variicollis</i> (Chapuis, 1877)	Molonglo Gorge Nature Reserve, ACT, Australia.	1	1
<i>Paropsisterna variicollis</i> (Chapuis, 1877)	Black Mountain, ACT, Australia.	2	1
<i>Pataya nitida</i> Philippi y Philippi, 1864	Isla Negra, San Antonio, Chile	-	1
<i>Peltoschema amabilis</i> (Chapuis, 1877)	Woko National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Peltoschema cardinalis</i> (Lea, 1924)	Black Mountain, ACT, Australia.	-	1
<i>Peltoschema delicatula</i> (Chapuis, 1924)	Arve Loop Forest Reserve, Tasmania, Australia.	-	1
<i>Peltoschema festiva</i> (Chapuis, 1877)	Edith, NSW, Australia.	-	1
<i>Peltoschema hera</i> (Stål, 1860)	Yalgorup National Park, WA, Australia.	-	1
<i>Peltoschema maculiventris</i> (Lea, 1924)	Wagga Wagga, NSW, Australia.	-	1
<i>Peltoschema mansueta</i> (Weise, 1901)	Mount Keira, NSW, Australia.	-	1
<i>Peltoschema oceánica</i> (Boisduval, 1835)	Marulan, NSW, Australia.	1, 2	2
<i>Peltoschema orphana</i> (Erichson, 1842)	Wilmot, Tasmania, Australia.	-	1
<i>Peltoschema pandora</i> (Blackburn, 1899)	Stirling Range National Park, WA, Australia.	-	1
<i>Peltoschema scutifera</i> (Chapuis, 1877)	Mumballup, WA, Australia.	-	1
<i>Peltoschema</i> sp. 1	Marulan, NSW, Australia.	1	1
<i>Peltoschema</i> sp. 1	Wentworth Falls, NSW, Australia.	2	1
<i>Peltoschema</i> sp. 2	Illawarra State Recreation Area, NSW, Australia.	-	1
<i>Peltoschema</i> sp. 3	Girard State Forest, NSW, Australia.	-	1
<i>Peltoschema</i> sp. aff. <i>delicatula</i>	Black Mountain, ACT, Australia.	1	1
<i>Peltoschema</i> sp. aff. <i>delicatula</i>	Illawarra State Recreation Area, NSW, Australia.	2	1
<i>Peltoschema</i> sp. aff. <i>orphana</i>	Lane Pool Conservation Reserve, WA, Australia.	-	1
<i>Peltoschema</i> sp. WA1	Waroon, WA, Australia.	-	1
<i>Peltoschema</i> sp. WA2	Yalgorup National Park, WA, Australia.	-	1
<i>Peltoschema</i> sp. WA3	Yalgorup National Park, WA, Australia.	-	1
<i>Peltoschema</i> sp. WA4	Yalgorup National Park, WA, Australia.	-	1
<i>Peltoschema</i> sp. WA5	Yalgorup National Park, WA, Australia.	-	1
<i>Peltoschema</i> sp. WA6	Walpole-Nornalup National Park,	-	1

	WA, Australia.		
<i>Peltoschema</i> sp. WA7	Denmark, WA, Australia.	-	1
<i>Peltoschema trilineata</i> (Boisduval, 1835)	Windsor, NSW, Australia.	-	1
<i>Peltoschema turbata</i> (Chapuis, 1877)	Yalgorup National Park, WA, Australia.	-	1
<i>Phaedon cochleriae</i> (Fabricius, 1792)	Paradinha Vekha, Bragança, Portugal.	-	1
<i>Philhydronopa aeneipennis</i> (Chapuis, 1877)	Wemen, Victoria, Australia.	-	1
<i>Phola octodecimgutata</i> (Fabricius, 1775)	Presquile labris, Nouvelle Calédonie.	1, 2	2
<i>Phola</i> sp. 1	Buahio River, Nouvelle Calédonie.	-	1
<i>Phola</i> sp. 2	Mae Hong Son, Tailandia.	-	1
<i>Phratora vitellinae</i> (Linnaeus, 1758)	n.a.	1, 2	2
<i>Phyllocharis cyanicornis</i> (Fabricius, 1801)	Royal National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Phyllocharis marmorata</i> Lea, 1903	Mount Moombil, NSW, Australia.	-	1
<i>Phyllocharis melanospila</i> Baly, 1862	Cascade, NSW, Australia.	-	1
<i>Phyllocharis</i> sp. 1	Mount Warning National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Phyllocharis wollumbina</i> (Daccordi, 2003)	Mount Warning National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Plagioderma versicolora</i> (Laicharting, 1781)	Fisteus, Lugo, España.	-	1
<i>Plagioderma violaceipennis</i> Bryant, 1925	República de Fiyi.	-	1
<i>Plagiosterna aenea</i> (Linnaeus, 1758)	Valcava de Soba, Cantrabria, España.	-	1
<i>Plagiosterna lutescens</i>	Pretoria, Gauteng, Suráfrica.	-	1
<i>Platymela cephalotes</i> (Lea, 1903)	Broome, WA, Australia.	-	1
<i>Platymela flavescens</i> (Blackburn, 1890)	Norman Jolly Forest Reserve, NSW, Australia.	-	1
<i>Platyphora</i> sp. 1	Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes, Costa Rica.	-	1
<i>Platyphora</i> sp. 2	Campus universitario sede San Ramón. Costa Rica.	-	1
<i>Platyphora spectabilis</i> (Stål)	Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes, Costa Rica.	-	1
<i>Poropteromela epipleuralis</i> Lea, 1916	Mount Moombil, NSW, Australia.	-	1
<i>Promechus</i> sp.	Mount Madong Adelbert, Papua Nueva Guinea.	-	1
<i>Rhaebosterna sciola</i> Weise, 1917	Mildura, Victoria, Australia.	-	1
<i>Sphaeratrix</i> sp.	Kruger National Park, Punda María, Suráfrica.	-	1
<i>Timarcha balearica</i> (Gory, 1829)	Campus Universitat de les Illes Balears, España.	-	1
<i>Timarcha nicaeensis</i> Villa, 1853	Capo Palinuro, Salerno, Italia.	-	1
<i>Timarcha</i> sp.	n.a.	-	1
<i>Trachymela rugosa</i> (Chapuis, 1877)	Mount Canobolas, NSW, Australia.	-	1
<i>Trachymela</i> sp. 1	Marulan, NSW, Australia.	1	1
<i>Trachymela</i> sp. 1	Black Mountain, ACT, Australia.	2, 3	2
<i>Trachymela</i> sp. 2	Black Mountain, ACT, Australia.	-	1
<i>Trachymela</i> sp. 3	Black Mountain, ACT, Australia.	-	1
<i>Trachymela</i> sp. 4	Black Mountain, ACT, Australia.	-	1
<i>Trachymela</i> sp. 5	Darkes Forest, NSW, Australia.	1, 2	2
<i>Trachymela</i> sp. 5	Stanwell Tops, NSW, Australia.	3	1
<i>Trachymela</i> sp. 6	Mount Nameless, WA, Australia.	-	1
<i>Trachymela</i> sp. 7	Mount Kosciuszko National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Trachymela</i> sp. 8	Mount Kosciuszko National Park, NSW, Australia.	-	1
<i>Trachymela</i> sp. 11	Mount Hyland Nature Reseve,	-	1

		NSW, Australia.		
	<i>Trachymela sp.</i> 14	Hattah-Kullkyne National Park, Victoria, Australia.	-	1
	<i>Trachymela sp.</i> 16	Gol Gol State Forest, NSW, Australia.	-	1
	<i>Trachymela sp. aff. seriata</i> WA1	Northam, WA, Australia.	-	1
	<i>Trachymela sp. aff. tincticollis</i> WA1	Jarrahdale, WA, Australia.	-	1
	<i>Trachymela sp. aff. tincticollis</i> WA2	Balingup, WA, Australia.	-	1
	<i>Trachymela sp.</i> WA1	Yalgorup National Park, WA, Australia.	-	1
	<i>Trachymela sp.</i> WA3	Yalgorup National Park, WA, Australia.	-	1
	<i>Trachymela tincticollis</i> (Blackburn, 1896)	Albany, WA, Australia.	-	1
	<i>Zira nitens</i> Reid y Smith, 2004	Mount Humboldt, Nueva Caledonia.	-	1
Clytrinae	<i>Lachnaia variolosa</i> (Linnaeus, 1767)	Torre de Ucles, Priego de Córdoba, España.	-	1
Eumolpinae	<i>Hermesia aurata</i> Olivier	Cayenne Harbour, Mount Rorota, Guayana Francesa.	-	1
	<i>Megascelis sp.</i>	Managua, Ticuantepe, Nicaragua.	-	1
	<i>Rhyparida alleni</i> Lea, 1915	Mount Coot-tha, QLD, Australia.	-	1
Galerucinae	<i>Galeruca rufa</i> Germar, 1824	Campus Universitat de les Illes Balears, España.	-	1
	<i>Luperus pyrenaicus</i> Germar, 1824		-	1
Spilopyrinae	<i>Macrolema marginata</i> Jacoby, 1898	Norman Jolly Forest Reserve, NSW, Australia.	-	1
	<i>Richmondia olliffi</i> (Blackburn, 1891)	Cascade, NSW, Australia.	-	1
	<i>Spilopyra sumptuosa</i> Baly, 1860	Mount Warning National Park, NSW, Australia.	-	1

**Tabla 4.1-1.** Especies estudiadas y localidades de colecta.

#### 4.1.3.2.- Preparación del material y extracción de ADN

Los especímenes se diseccionaron en condiciones de esterilidad para posteriormente ser sometidos a un protocolo de extracción de ADN tal y como se describe en los apartados 3.2.1 y 3.2.2 (páginas 17-19).

#### 4.1.3.3.- Marcadores genéticos: amplificación, secuenciación y edición de secuencias

Se seleccionaron cinco marcadores moleculares de los genomas tanto nuclear como mitocondrial: (i) una región parcial del gen mitocondrial codificante para la primera subunidad de la citocromo *c* oxidasa (*cox1*; cebadores: C1-J-2183 5'-CAACATTTATTTTGATTTTTGG-3' y TL2-N-3014 5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'; Simon *et al.*, 1994), (ii) un fragmento del gen para la subunidad mayor del ARN ribosomal mitocondrial (*rrnL*; cebadores: LR-N-13398 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' y LR-J-12887 5'-CTCCGGTTTGA ACTCAGATCA-3'; Simon *et al.*, 1994), (iii) un fragmento

correspondiente a la región D3-D6 de la subunidad mayor del ARN ribosomal nuclear (LSU D3-D6; cebadores: 28S-DD 5'-GGGACCCGTCTTGAACAC-3' y 28S-FF 5'-TTACACACTCCTTAGCGGAT-3'; Hillis y Dixon, 1991), (iv) un fragmento del gen nuclear codificante para la proteína factor de elongación 1-alfa (EF1a; cebadores efs149 5'-ATCGAGAAGTTTCGAGAAGGAGGCYCARGAAATGGG-3' y efa1043 5'-GTATATCCATTGGAAATTTGACCNGGRTGRTT-3'; Normark *et al.*, 1999), aunque en algunos casos se utilizó una porción interna del mismo fragmento obtenida mediante los cebadores específicos para Chrysomelinae (efs303 5'-CACAGAGATTTTCATCAAGAAC-3' y efa923 5'-CGTTCTTAACGTTGAAACCAA-3'; Jurado-Rivera *et al.*, 2009), y (v) un fragmento del gen nuclear codificante para la proteína CAD (conocida como *r* o *rudimentary* en *Drosophila melanogaster*) (cebadores: CD667F 5'-GGATGGAAGGAAGTDGARTAYGARGT-3' y CD851R 5'-GGATCGAAGCCATTHACATTYTCRTCHACCAT -3'; Wild y Maddison, 2008).

Las reacciones de PCR se realizaron, evaluaron y purificaron siguiendo los protocolos desarrollados en los apartados 3.2.4, 3.2.5 y 3.2.6 (páginas 24-26). Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en ambos sentidos con el método de Sanger *et al.* (1977). Para ello se realizaron reacciones con un volumen total de 10 µl utilizando *ABI PRISM™ BigDye™ terminator Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems), y siguiendo los pasos detallados en el apartado 3.2.7 (página 26). Los cromatogramas obtenidos se visualizaron y editaron con el programa CHROMAS 2 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia <<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>>). Las secuencias de las hebras complementarias fueron utilizadas para la obtención de una secuencia consenso empleando el programa CONTIG ASSEMBLY PROGRAM (Huang, 1992) implementado en el programa BIOEDIT v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Como último paso de la edición, se eliminaron las secuencias de los cebadores.

#### 4.1.3.4.- Composición nucleotídica y divergencia entre secuencias

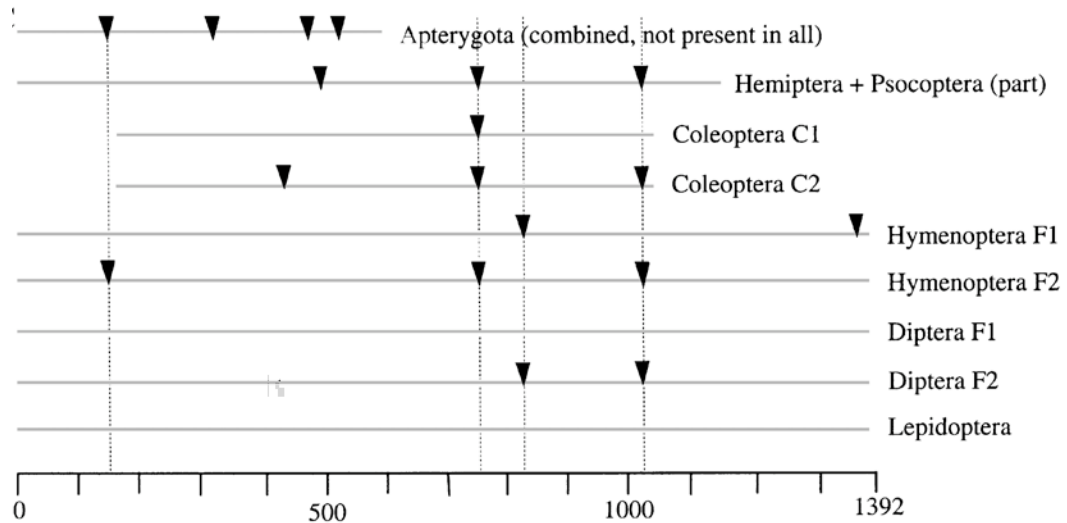
La información relativa a la diversidad y divergencia de las secuencias, así como el análisis de la existencia de saturación mutacional en sus respectivos alineamientos, se obtuvieron siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.3.3 (página 31).

#### 4.1.3.5.- *Alineamiento de secuencias*

El alineamiento múltiple de las secuencias se llevó a cabo con el programa MAFFT 5 y mediante el algoritmo FFT-NS-i (Kato *et al.*, 2005). En el caso de los marcadores moleculares codificantes para proteína (*cox1*, EF1a y CAD) las matrices alineadas se tradujeron a secuencias aminoacídicas y se inspeccionaron para certificar la ausencia de inserciones o deleciones, así como de codones de parada. Para los marcadores moleculares ribosomales (*rrnL* y LSU D3-D6) se implementó en MAFFT 6 la estrategia de alineamiento Q-INS-i (Kato y Toh, 2008), la cual ha sido especialmente desarrollada para procesar secuencias con estructura secundaria.

#### 4.1.3.6.- *Ortología de las secuencias EF1a.*

El factor de elongación 1 alfa (EF1a) está considerado un marcador molecular muy útil en estudios filogenéticos de insectos (*e.g.*, Yang *et al.*, 2000; Rokas *et al.*, 2002; Jordal *et al.*, 2002; Rasmussen y Cameron, 2007; Ruiz *et al.*, 2009; Brady *et al.*, 2011). No obstante, y a pesar de su popularidad, este marcador no se encuentra exento de inconvenientes. El más destacado de ellos está relacionado con la existencia de múltiples copias parálogas en los genomas de varios órdenes de insectos, entre los que se cuentan Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Thysanoptera y algunos miembros de Neuropterida (Hovemann *et al.*, 1988; Danforth y Ji, 1998; Normark *et al.*, 1999; Jordal *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2001; Downie y Gullan, 2004; Haring y Aspöck, 2004; Djernæs y Damgaard, 2006). Sin embargo, esta particularidad de las secuencias EF1a no necesariamente constituye un impedimento para su utilización en la inferencia de filogenias de especies, ya que las copias pueden ser diferenciadas por el elevado nivel de divergencia nucleotídica en las regiones exónicas y por la presencia o ausencia de intrones en determinadas posiciones muy concretas (Figura 4.1-1; Jordal, 2002; Jordal *et al.*, 2002; Djernæs y Damgaard, 2006; Ruiz *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2010; Brady *et al.*, 2011).



**Figura 4.1-1.** Representación gráfica de las posiciones intrónicas (triángulos) en algunos grupos de insectos. Las líneas verticales indican la homología posicional entre los intrones y la longitud de las líneas horizontales muestra la longitud máxima del gen *ef1a* secuenciada en cada orden. Figura modificada a partir de Jordal (2002).

Para verificar la ortología de las secuencias EF1a generadas en el presente trabajo se llevaron a cabo tres aproximaciones analíticas diferentes: (1) Por un lado se estudió la presencia o ausencia de intrones en nuestro conjunto de datos, y los resultados se contrastaron con la estructura de los parálogos conocidos en Coleoptera. A partir del alineamiento múltiple de EF1a, los intrones se identificaron gracias a los huecos por inserción o delección debidos a sus diferencias de longitud en los alineamientos, y por la identificación de los motivos GT y AC flanqueantes de intrones e implicados en el proceso de escisión y empalme post-transcripcional del ARN durante su maduración. (2) La segunda estrategia consistió en calcular y comparar entre sí las divergencias genéticas no corregidas (distancia  $p$ ) entre secuencias EF1a de los Chrysomelidae aquí estudiados y respecto a las copias parálogas C1 y C2 de coleópteros pertenecientes a cuatro individuos de distintas especies obtenidas de las bases de datos (números de acceso GenBank en la tabla 4.1-2). Para este último análisis se empleó el programa MEGA v3.1. Los análisis estuvieron basados únicamente en los exones debido a la elevada variabilidad de los intrones, que dificultaba considerablemente su alineamiento. (3) Finalmente se realizó un análisis filogenético de los exones EF1a de Chrysomelidae junto a secuencias de otras copias del mismo gen descritas en insectos. Para ello se descargaron de GenBank distintas copias parálogas EF1a obtenidas a partir de un mismo organismo, entre las que se cuentan las descritas por Jordal *et al.* (2002) para coleópteros (copias C1 y C2), además de copias descritas en otros órdenes de insectos Hymenoptera

(copias F1 y F2), Lepidoptera (copia única) y Odonata (copia única). El alineamiento de las mismas se llevó a cabo con MAFFT 5 y la inferencia filogenética se realizó con PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010), especificando el modelo evolutivo GTR+I+G estimado por nosotros para este conjunto de datos bajo el criterio de información de Akaike en jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). El objetivo de este análisis fue inferir la posición filogenética de nuestras secuencias EF1a en el contexto de la filogenia de las copias parálogas de insectos para este mismo marcador.

Orden	Especie	Copia	nº de acceso
Coleoptera	<i>Agonum muelleri</i>	C1	FJ173176.1
Coleoptera	<i>Amaroschema gaudini</i>	C1	FJ173192.1
Coleoptera	<i>Anchomenidius astur</i>	C1	FJ173183.1
Coleoptera	<i>Anchomenus dorsalis</i>	C1	FJ173177.1
Coleoptera	<i>Calathus circumseptus</i>	C1	FJ173180.1
Coleoptera	<i>Calathus rotundicollis</i>	C1	FJ173174.1
Coleoptera	<i>Coccotrypes advena</i>	C1	AF186668.2
Coleoptera	<i>Coccotrypes impressus</i>	C1	AF259874.1
Coleoptera	<i>Laemostenus terricola</i>	C1	FJ173179.1
Coleoptera	<i>Lindrothius caucasicus</i>	C1	FJ173182.1
Coleoptera	<i>Paranchus albipes</i>	C1	FJ173184.1
Coleoptera	<i>Poecilus purpurascens</i>	C1	FJ173185.1
Coleoptera	<i>Pterostichus globosus</i>	C1	FJ173191.1
Coleoptera	<i>Synuchus angusticeps</i>	C1	FJ173190.1
Coleoptera	<i>Synuchus cycloderus</i>	C1	FJ173189.1
Coleoptera	<i>Synuchus melantho</i>	C1	FJ173187.1
Coleoptera	<i>Synuchus nitidus</i>	C1	FJ173188.1
Coleoptera	<i>Synuchus sp.</i>	C1	FJ173175.1
Coleoptera	<i>Theoborus ricini</i>	C1	AF186691.2
Coleoptera	<i>Xyleborus sphenos</i>	C1	AF186692.2
Coleoptera	<i>Coccotrypes advena</i>	C2	AF508928.1
Coleoptera	<i>Coccotrypes impressus</i>	C2	AF508924.1
Coleoptera	<i>Theoborus ricini</i>	C2	AF508927.1
Coleoptera	<i>Xyleborus sphenos</i>	C2	AF508926.1
Hymenoptera	<i>Apis mellifera</i>	F1	X52884.1
Hymenoptera	<i>Apis mellifera</i>	F2	AY208278.1
Hymenoptera	<i>Ctenoplectra albolimbata</i>	F2	EU122133.1
Hymenoptera	<i>Ctenoplectra terminalis</i>	F2	EU122151.1
Hymenoptera	<i>Liotrigona sp.</i>	F2	EU122152.1
Hymenoptera	<i>Megachile willughbiella</i>	F2	EU122153.1
Hymenoptera	<i>Nomada fucata</i>	F2	EU122154.1
Hymenoptera	<i>Trigona sp.</i>	F2	EU122155.1
Hymenoptera	<i>Xylocopa violacea</i>	F2	GU245055.1
Lepidoptera	<i>Araschnia doris</i>	Única	EF683654.1

Lepidoptera	<i>Argynnis hyperbius</i>	Única	GU372617.1
Lepidoptera	<i>Doleschallia bisaltide</i>	Única	EF683662.1
Lepidoptera	<i>Inurois nikkoensis</i>	Única	AB468048.1
Lepidoptera	<i>Limenitis arthemis</i>	Única	EU098240.1
Lepidoptera	<i>Lythria venustata</i>	Única	GQ857126.1
Lepidoptera	<i>Mimathyma schrenckii</i>	Única	EF683659.1
Lepidoptera	<i>Parnassius smintheus</i>	Única	FJ756873.1
Lepidoptera	<i>Sephisia chandra</i>	Única	EF683656.1
Odonata	<i>Agriocnemis exsudans</i>	Única	AY179094.1
Odonata	<i>Cordulia shurtleffii</i>	Única	EF640540.1
Odonata	<i>Dythemis fugax</i>	Única	EF640533.1
Odonata	<i>Ischnura aurora</i>	Única	AY179097.1
Odonata	<i>Macrodiplax balteata</i>	Única	EF640538.1
Odonata	<i>Megalagrion xanthomelas</i>	Única	DQ083373.1
Odonata	<i>Miathyria marcella</i>	Única	EF640528.1
Odonata	<i>Pseudagrion palauense</i>	Única	AY179101.1
Odonata	<i>Rhyothemis variegata</i>	Única	EF640530.1
Odonata	<i>Tramea lacerata</i>	Única	EF640532.1
Odonata	<i>Trithemis festiva</i>	Única	EF640537.1
Odonata	<i>Urothemis assignata</i>	Única	EF640539.1

**Tabla 4.1-2.** Listado taxonómico, tipos de copias EF1a y números de acceso de las secuencias extraídas de las bases de datos para su comparación con las secuencias de Chrysomelinae obtenidas en el presente estudio.

#### 4.1.3.7.- Matrices de datos moleculares

Para algunas especies no se pudieron secuenciar todos los marcadores moleculares. Por este motivo, ensayamos tres tipos de concatenación de datos: (i) la matriz original compuesta por 273 ejemplares ("matriz-273" en adelante), (ii) una matriz reducida con los 99 individuos para los cuales se obtuvieron los cinco marcadores moleculares ("matriz-99"), y (iii) una matriz reducida integrada por los 245 ejemplares para los que se disponía de secuencias *cox1* ("matriz-245"). En este último caso, la elección del marcador *cox1* como región compartida estuvo justificada por el hecho de ser el marcador molecular con mayor información filogenética de entre los cinco estudiados (ver sección de resultados), además de ser el fragmento con mayor tasa de éxito de secuenciación. Esto permitió la construcción de una matriz que maximizaba el número de ejemplares incluidos en la misma, al tiempo que se garantizaba que todas las secuencias tomadas dos a dos compartiesen como mínimo una región homóloga en el alineamiento. A pesar de disponer de secuencias *cox1* para los grupos externos *Altica iberica* (Alticinae) y *Luperus pyrenaicus* (Galerucinae),



ninguna de ellas se incluyó en la "matriz-245", usada para calibrar y datar la filogenia, en parte por tratarse de un linaje que análisis moleculares previos mostraban incluido en un grado de Chrysomelinae (Gómez-Zurita *et al.*, 2007a, 2008), una situación que en efecto reflejó también nuestro análisis de la "matriz-273", pero fundamentalmente por estar asociadas a ramas largas (ver sección de resultados).

#### 4.1.3.8.- Selección de modelos evolutivos y de la estrategia de partición de datos

Se estimó el modelo evolutivo que mejor se ajustaba a la variación observada en cada marcador molecular individual y según diferentes esquemas de subdivisión de los mismos mediante el criterio de información de Akaike (AIC; Akaike, 1974), la versión corregida de AIC para muestras pequeñas (AICc; Sugiura, 1978; Hurvich y Tsai, 1989) y el criterio de información bayesiano (BIC: Schwarz, 1978) utilizando el programa MrAIC v1.4.4 (Nylander, 2004). En el caso de los genes codificantes para proteína (es decir, *cox1*, EF1a y CAD) se establecieron tres esquemas de partición de secuencias en función de sus posiciones de codón: (i) primeras / segundas / terceras posiciones de codón, (ii) primeras y segundas posiciones / terceras posiciones, y (iii) gen sin subdividir. Respecto a los genes ribosomales (es decir, *rnl* y LSU D3-D6), éstos se trataron como una única partición. Las estrategias de partición fueron analizadas del modo que se describe en el apartado 3.3.4.2 (página 33).

Tras determinar la mejor estrategia de partición para cada gen, se llevó a cabo un análisis combinado de los alineamientos de los distintos marcadores con el programa Phyutility (Smith y Dunn, 2008) y dividiendo el alineamiento resultante en las siguientes particiones: (i) partición por marcador; (ii) por marcador, cada uno de ellos con su mejor estrategia de partición individual; (iii) marcadores nucleares / marcadores mitocondriales; (iv) ADN codificante / ADN no codificante; (v) ADN codificante mitocondrial / ADN no codificante mitocondrial / ADN codificante nuclear / ADN no codificante nuclear; (vi) primeras posiciones de codón / segundas posiciones / terceras posiciones / *rnl* / LSU D3-D6; (vii) primeras y segundas posiciones de codón / terceras posiciones / *rnl* / LSU D3-D6; (viii) primeras posiciones de codón mitocondriales / segundas posiciones mitocondriales / terceras posiciones mitocondriales / primeras posiciones nucleares / segundas posiciones nucleares / terceras posiciones nucleares / *rnl* / LSU D3-D6; (ix) primeras y segundas posiciones de codón mitocondriales / terceras posiciones mitocondriales / primeras y segundas posiciones nucleares / terceras posiciones nucleares / *rnl* / LSU D3-D6; y (x)

alineamiento no subdividido. Los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaron a cada una de estas particiones del conjunto combinado de marcadores fueron escogidos con el programa MrAIC v1.4.4. GARLI-PART v.0.97 (Zwickl, 2006) se utilizó para calcular los valores de log-verosimilitud correspondientes a cada estrategia para luego calcular sus respectivos valores de AIC, AICc y BIC.

#### 4.1.3.9.- *Congruencia entre marcadores moleculares*

La congruencia filogenética entre los cinco marcadores moleculares secuenciados se evaluó siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 3.3.4.1 (página 32).

#### 4.1.3.10.- *Análisis filogenéticos*

La inferencia filogenética a partir de los esquemas de partición seleccionados fue llevada a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.4.3 (página 35), utilizando en las búsquedas bayesianas un número de generaciones por análisis variable en función de la complejidad de la matriz analizada:  $3 \cdot 10^7$  en el caso de la "matriz-99",  $10^8$  para la "matriz-245", y  $1,5 \cdot 10^8$  en el caso de la "matriz-273".

Las evaluaciones de hipótesis filogenéticas alternativas se llevó a cabo mediante el test Approximately Unbiased (test AU; Shimodaira, 2000) con el programa CONSEL (Shimodaira y Hasegawa, 2001). Concretamente se contrastaron con nuestros datos moleculares las propuestas taxonómicas para la subfamilia Chrysomelinae de autores como Weise (1916), Seeno y Wilcox (1982), Daccordi (1994) y Reid (2002). La clasificación de Kippenberg (2010) no se evaluó debido a que únicamente incluye géneros paleárticos. También se evaluó la monofilia de los géneros cuyas especies no formaron grupos monofiléticos en los análisis filogenéticos, para contrastar si estos resultados tenían su raíz en la falta de señal filogenética y la estocasticidad topológica resultante, o en una señal filogenética claramente contradictoria con la taxonomía. Como paso previo a la evaluación de cada hipótesis, se realizó un análisis filogenético de máxima verosimilitud con GARLI-PART v.0.97 (Zwickl, 2006) como el llevado a cabo para la inferencia de las relaciones filogenéticas en nuestro conjunto de datos, pero con la diferencia de que se forzó la monofilia de los taxones en cuestión. Una vez obtenidos los árboles se calcularon sus respectivos valores de log-verosimilitud por

sitio con el programa RAxML v8.0.X (Stamatakis, 2014), esto es, los valores de verosimilitud correspondientes a cada una de las posiciones (columnas) en la matriz alineada de secuencias de ADN computadas mediante el algoritmo de poda de Felsenstein (1973). La matriz de valores log-verosimilitud por sitio se utilizó como archivo de entrada en CONSEL, con el que se calcularía el valor del estadístico p del test AU asociado a cada uno de los árboles evaluados. Se trata de un test desarrollado para la selección de árboles filogenéticos, y que se caracteriza por la implementación de un método de remuestreo de tipo bootstrap multiescala que genera unos valores de probabilidad más fiables que los del resto de pruebas comúnmente utilizadas en el análisis de topologías alternativas (Shimodaira y Hasegawa, 2001).

#### 4.1.3.11- *Congruencia entre métodos filogenéticos*

Los árboles obtenidos con distintos métodos de inferencia filogenética a partir del mismo conjunto de datos fueron sometidos a un análisis comparativo como se describe en el apartado 3.3.4.4 (página 36).

#### 4.1.3.12.- *Reloj molecular*

La calibración del reloj molecular se realizó a partir de las edades asignadas a la separación entre varios linajes del grupo externo pertenecientes a cuatro subfamilias de Chrysomelidae y entre dos géneros de Timarchinae, y cuyas edades fueron estimadas por Gómez-Zurita *et al.* (2007a). Para calibrar nuestra filogenia se asignó como edad al ancestro común más reciente de cada uno de los diferentes linajes representados en el grupo externo el intervalo temporal comprendido entre las dataciones máxima y mínima de dos estrategias de calibración usadas por Gómez-Zurita *et al.* (2007a) (Tabla 4.1-3). En concreto, los análisis de datación molecular fueron llevados a cabo utilizando la "matriz-245" y siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.3.4.5 (página 37), y las edades de los nodos se especificaron en todos los casos siguiendo una distribución de tipo uniforme con sus respectivos valores superiores e inferiores (Tabla 4.1-3). La estrategia de partición de los datos fue la seleccionada como óptima para los análisis filogenéticos, pero forzando primeras y segundas posiciones de codón en los tres genes codificantes para proteína como una sola partición. Esta decisión viene justificada por los resultados obtenidos en varios análisis preliminares ejecutados en BEAST (datos no mostrados), donde se pudo

concluir que la variación en las primeras y segundas posiciones de codón era tan escasa que su análisis por separado obstaculizaba enormemente la convergencia de los parámetros relacionados con las mismas. Se ejecutaron dos cadenas MCMC independientes cada una de ellas con 260 millones de generaciones, muestreando los resultados cada mil generaciones. El archivo final con los árboles remuestreados se analizó con el programa TreeAnnotator v.1.7.1 (Drummond *et al.*, 2012).

Nodo	Intervalo de edad
a	71.5 - 77.3
b	67.3 - 72.7
c	64.7 - 70.0
d	59.3 - 64.7
e	48.0 - 51.5

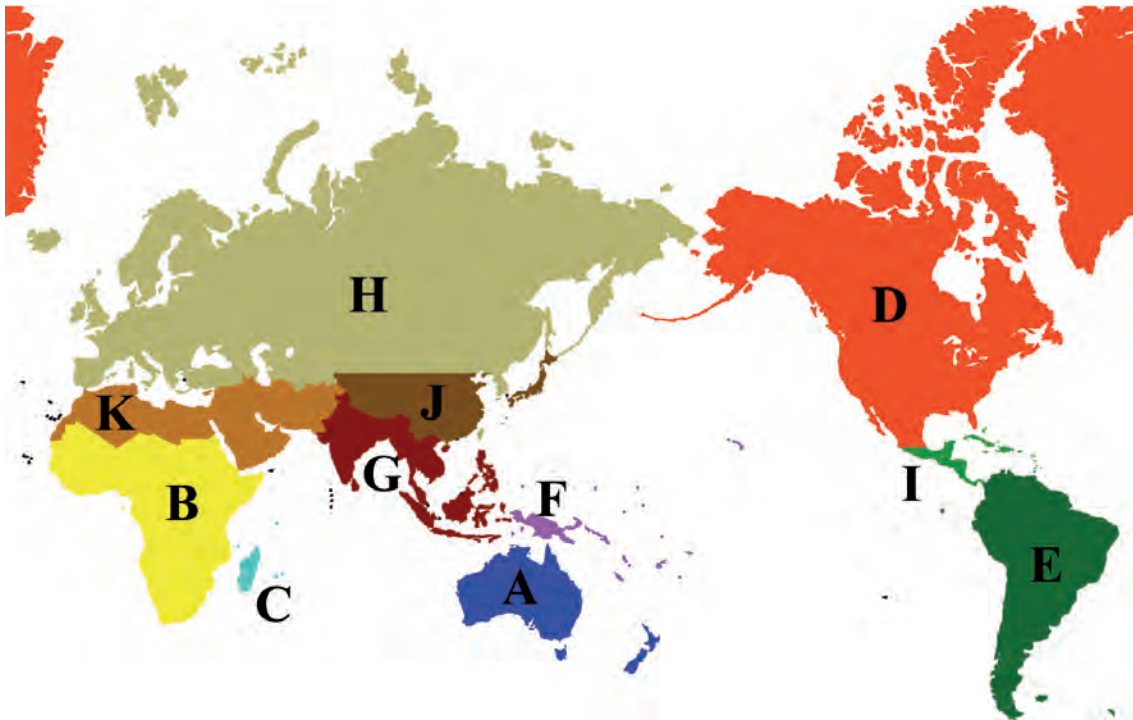
**Tabla 4.1-3.** Rangos de divergencia en millones de años entre las subfamilias de Chrysomelidae incluidas del grupo externo. Las letras que definen a los nodos se corresponden con la figura 4.1-19 (página 98). La primera de las cifras en cada rango se refiere a la edad del ancestro común más reciente calculada por Gómez-Zurita *et al.* (2007a) a partir del evento biogeográfico de separación entre los linajes *Americanotimarcha* y *Timarcha*, mientras que la segunda cifra es la edad obtenida por los mismos autores tras usar para la calibración la edad de un crisomélido fósil (ver texto principal).

#### 4.1.3.13.- Señal filogenética de los marcadores moleculares

La información filogenética contenida en cada uno de los cinco marcadores moleculares para cada instante de la historia evolutiva de las especies de Chrysomelinae estudiadas se analizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.4.7 (página 39). Se ejecutaron dos análisis diferentes con PhyDesign ambos basados en la "matriz-99" (es decir, la matriz con menor proporción de posiciones indefinidas). En el primero de los análisis se calculó la señal filogenética de cada uno de los cinco marcadores por separado, mientras que en el segundo se hizo lo propio para cada una de las particiones que constituyeron el esquema óptimo de subdivisión de los datos. El cronograma requerido por PhyDesign se obtuvo mediante la ultrametrización del árbol bayesiano derivado de la "matriz-99" con el programa PATHd8 (Britton *et al.*, 2007) y fijando la edad del ancestro común más reciente entre las especies del grupo externo *Cassida viridis* y *Macrolema marginata* en 71,94 Ma, que fue la edad obtenida para este nodo en los análisis de datación molecular.

#### 4.1.3.14.- *Análisis biogeográfico*

La historia biogeográfica del grupo de estudio se analizó utilizando el método bayesiano de inferencia de distribuciones ancestrales *Bayesian Binary MCMC* (BBM) implementado en el programa RASP v2.0b (Yu *et al.*, 2011). Esta aproximación modela la dispersión entre áreas como un proceso estocástico representado por una cadena de Markov que contempla la transición entre dos o más estados discretos con diferentes tasas o probabilidades. En nuestro caso, estimamos la evolución temporal del rango geográfico de los Chrysomelinae incluidos en la “matriz-245” mediante la aplicación del modelo más general y complejo de los cuatro que se implementan en RASP (F81 + G). El método requiere de un árbol filogenético resuelto, que en nuestro caso consistió en el árbol bayesiano obtenido a partir de la “matriz-245” podado hasta dejar un solo representante por género. Para eliminar cualquier interferencia en la reconstrucción biogeográfica se siguió una estrategia conservativa en la que se excluyeron del análisis aquellos géneros recuperados como parafiléticos o polifiléticos y que carecieron de soporte en sus relaciones basales. Entre los taxones eliminados se encuentran los integrantes de los géneros *Paropsisterna*, *Paropsides*, y la especie *Chalcomela sp.* 1. Para poder ejecutar los análisis, RASP necesita además información sobre la distribución actual de los taxones, y que elaboramos a partir de los datos zoogeográficos publicados por Seeno y Wilcox (1982), Daccordi (1994) y Reid (2006). Esta distribución se definió en función de las áreas biogeográficas establecidas por Holt *et al.* (2013): Afrotropical, Australiana, Malgache, Neártica, Neotropical, Oceánica, Oriental, Paleártica, Panameña, Saharo-Arábica y Sino-Japonesa (Figura 4.1-2).



**Figura 4.1-2.** Regiones en las que se ha subdividido el Planeta para realizar los análisis biogeográficos de los géneros de Chrysomelinae muestreados. A = Australiana, B = Afrotropical, C = Malgache, D = Neártica, E = Neotropical, F = Oceánica, G = Oriental, H = Paleártica, I = Panameña, J = Sino-Japonesa, y K = Saharo-Arábica.

#### 4.1.3.15.- Asociaciones con plantas hospedadoras

Con el objeto de indagar en las asociaciones tróficas de los crisomelinos australianos, así como evaluar la potencial existencia de condicionantes evolutivos entre las plantas y estos insectos, se recopiló información bibliográfica relativa a la alimentación para cada uno de los géneros incluidos en nuestra muestra. La principal referencia utilizada para recabar dicha información fue la revisión taxonómica de los crisomelinos australianos publicada por Reid (2006), donde se ofrece una relación detallada de los hospedadores conocidos para cada género. Entre las demás obras consultadas se incluyen las aportaciones de Gressitt (1963), Selman y Lowman (1983), Monteith (1991), Jolivet y Hawkeswood (1995), Hawkeswood y Takizawa (2002), Reid (2002, 2006), Daccordi (2003), y Reid *et al.* (2009). Las anotaciones personales de campo realizadas durante el muestreo de los escarabajos para esta tesis doctoral, así como los resultados del apartado 4.3 (Jurado-Rivera *et al.*, 2009) también se tuvieron en consideración.

La inferencia de los estados ancestrales de las asociaciones alimenticias entre los linajes de crisomelinos y sus plantas hospedadoras se obtuvo bajo el criterio de parsimonia con el programa Mesquite v.2.75 (Maddison y Maddison, 2011).

#### 4.1.4.- Resultados

##### 4.1.4.1.- *Diversidad y divergencia de datos de secuencia en Chrysomelinae*

La tabla 4.1-4 resume los resultados de la descripción estadística de diversidad y divergencia de las secuencias para cada uno de los cinco marcadores moleculares estudiados. El alineamiento con mayor proporción de posiciones informativas fue el de *cox1* (51%), seguido de cerca por *rrnL* (49%) y CAD (41%), y lejos de los reducidos valores detectados para EF1a y LSU (9,7 y 4,1%, respectivamente). Las pruebas Chi-Cuadrado para la homogeneidad de las frecuencias nucleotídicas generaron resultados no significativos, sugiriendo que tales proporciones se mantienen conservadas sin diferencias significativas entre secuencias. El sesgo en cuanto a composición nucleotídica fue alto en los dos marcadores mitocondriales, presentando una elevada riqueza en bases A+T típica del ADN mitocondrial de insectos.

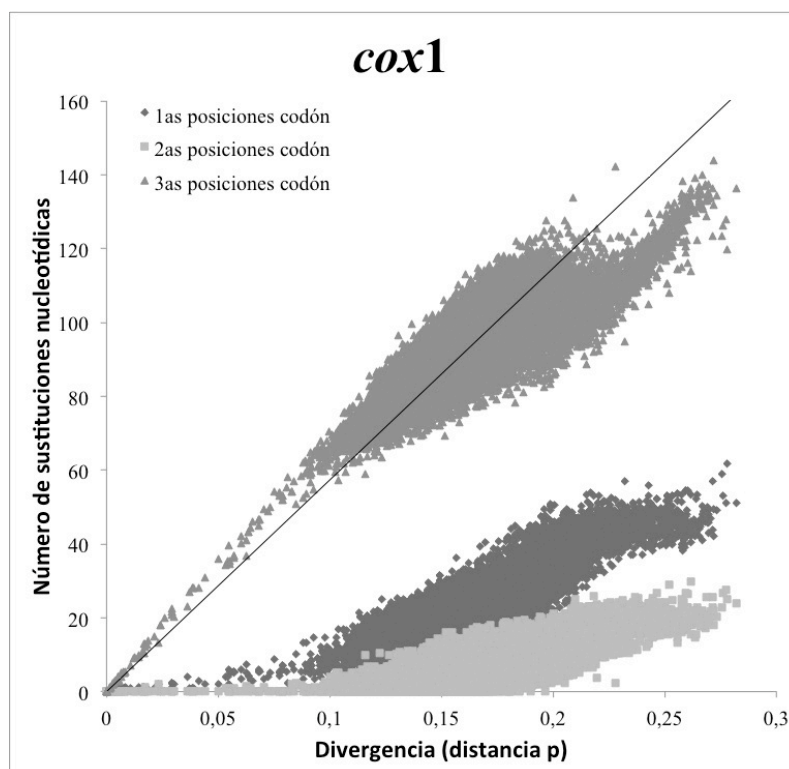
En ningún caso se detectó saturación mutacional (Figuras 4.1-3 a 4.1-8), ni siquiera en las terceras posiciones de codón de los marcadores codificantes (EF1a:  $Y=542,31X+1,6003$ ,  $R^2=0,98$ ; CAD:  $Y=439,18X$ ,  $R^2=0,97$ ), donde la tasa de cambio es considerablemente más elevada (Kimura, 1981). En el caso de *cox1* para estas mismas posiciones se recuperó un valor de ajuste bajo para la recta de regresión ( $Y=573,55X$ ,  $R^2=0,46$ ), por lo que se procedió a la ejecución del test de Xia *et al.* (2003) en DAMBE. Dicho análisis devolvió unos índices de saturación de sustituciones ISS de 0,117, 0,022, y 0,203 para las primeras, segundas y terceras posiciones de codón de *cox1*, respectivamente. Dichos valores se sitúan significativamente por debajo de los índices críticos de saturación de sustituciones (ISSc), que fueron respectivamente para cada posición 1,050 ( $p < 0,0001$ ), 1,039 ( $p < 0,0001$ ) y 0,704 ( $p < 0,0001$ ), y también sugieren bajos niveles de saturación mutacional en el alineamiento *cox1*. En el caso de los marcadores no codificantes *rrnL* y LSU, las gráficas de saturación se obtuvieron contrastando el número total de sustituciones nucleotídicas frente al número total de transiciones y transversiones, y también sugirieron bajos niveles de saturación en estos marcadores (transiciones *rrnL*:  $Y=376,36X+0,1615$ ,  $R^2=0,92$ ; transversiones *rrnL*:  $Y=170,64X+0,1615$ ,  $R^2=0,71$ ;

transiciones LSU:  $Y=591,9X+0,4298$ ,  $R^2=0,96$ ; transversiones LSU:  $Y=151,1X-0,4298$ ,  $R^2=0,62$ ).

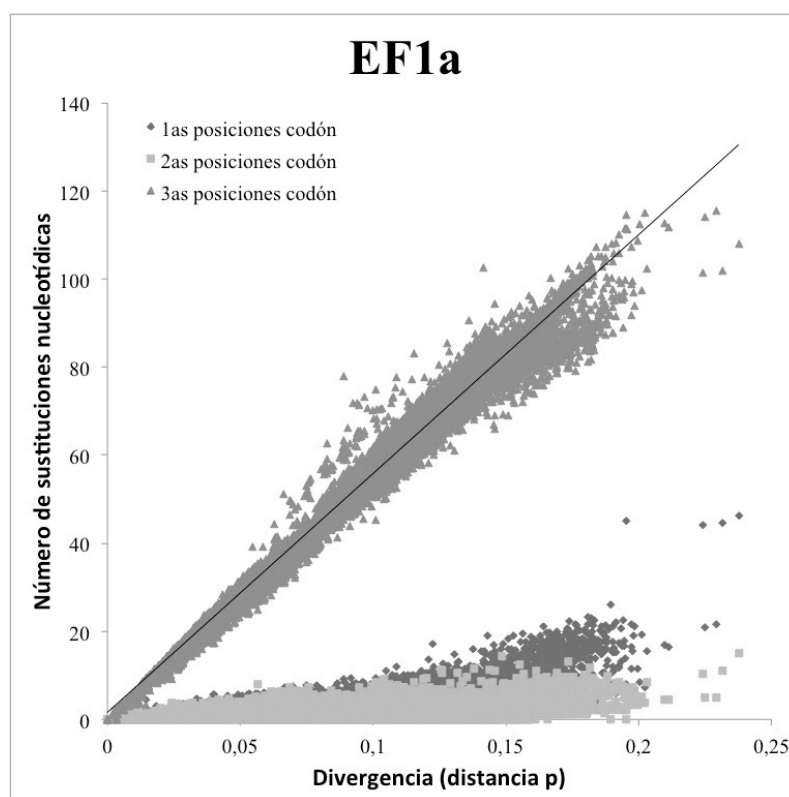
	cox1	EF1a	CAD	rrnL	LSU
Secuencias obtenidas	245	186	172	208	243
Longitud del alineamiento (nt)	750	619	485	547	747
Posiciones variables	407	68	212	316	97
Posiciones informativas	381	60	201	266	31
Composición nucleotídica (T:C:A:G)	0,38:0,15:0,32:0,15	0,25:0,24:0,27:0,24	0,27:0,2:0,3:0,23	0,41:0,09:0,35:0,15	0,21:0,22:0,27:0,3
Prueba Chi-Cuadrado <sup>a</sup>	$\chi^2=424,071$ ; P=1,00;	$\chi^2=214,03$ ; P=1,00;	$\chi^2=162,27$ ; P=1,00;	$\chi^2=132,61$ ; P=1,00;	$\chi^2=23,20$ ; P=1,00;
Sesgo (C) ( <i>sensu</i> Irwin, 1994)	0,26	0,03	0,09	0,34	0,08
<i>p-distance</i> media global (desv. est.)	0,15 (0,03)	0,38 (0,02)	0,05 (0,02)	0,11 (0,03)	0,01 (0,01)

**Tabla 4.1-4.** Resumen de los análisis estadísticos relacionados con diversidad y divergencia de las secuencias para cada uno de los cinco marcadores moleculares estudiados. <sup>a</sup> = Prueba de la Chi-Cuadrado para la homogeneidad de las frecuencias nucleotídicas ejecutada en PAUP\* 4.0

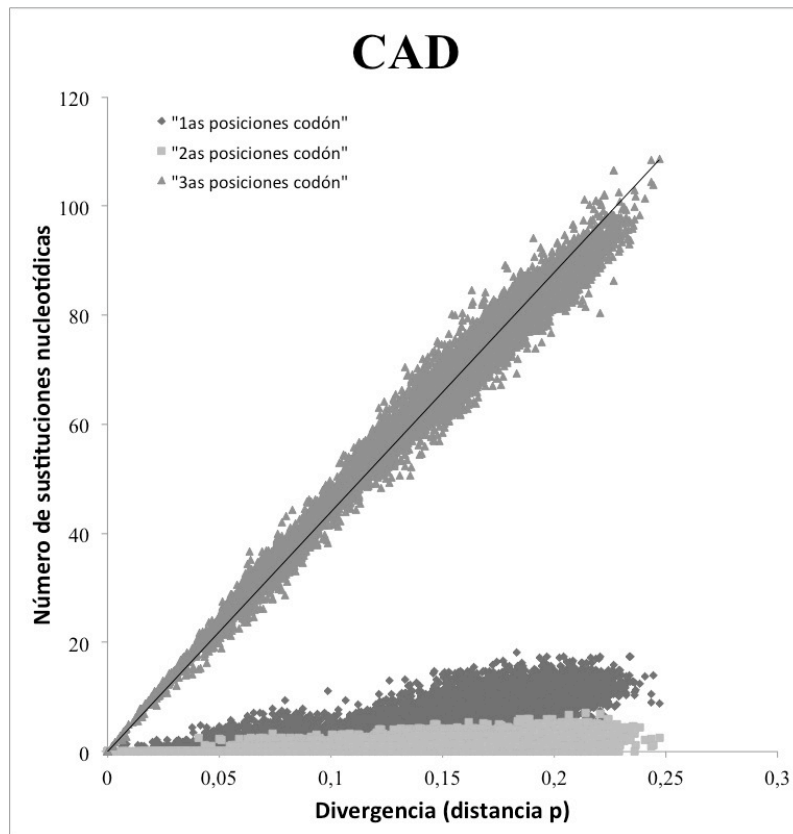




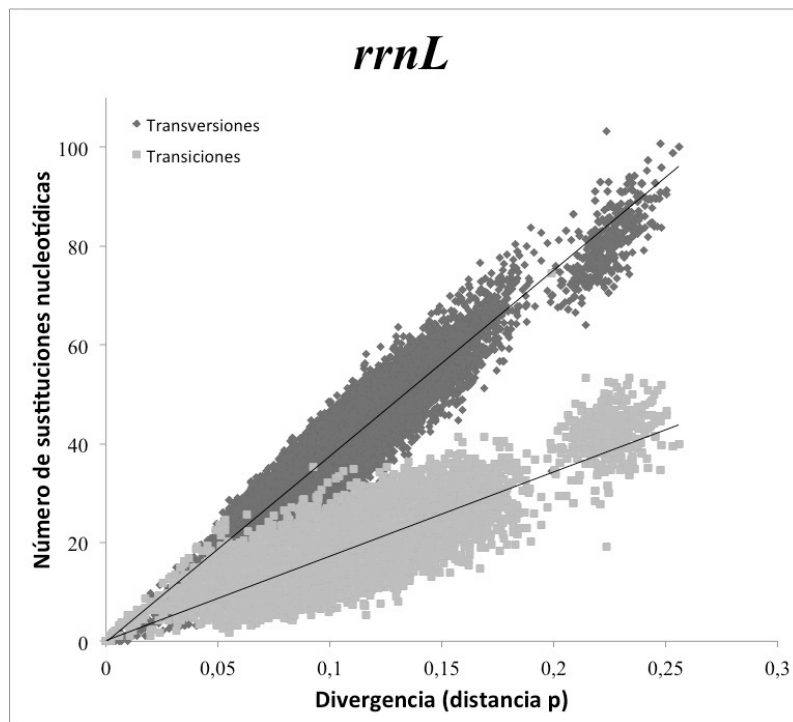
**Figura 4.1-3.** Gráficas de saturación de sustituciones nucleotídicas no corregidas para la matriz alineada de secuencias *cox1*. Se muestran las curvas de saturación individualizadas por posiciones de codón.



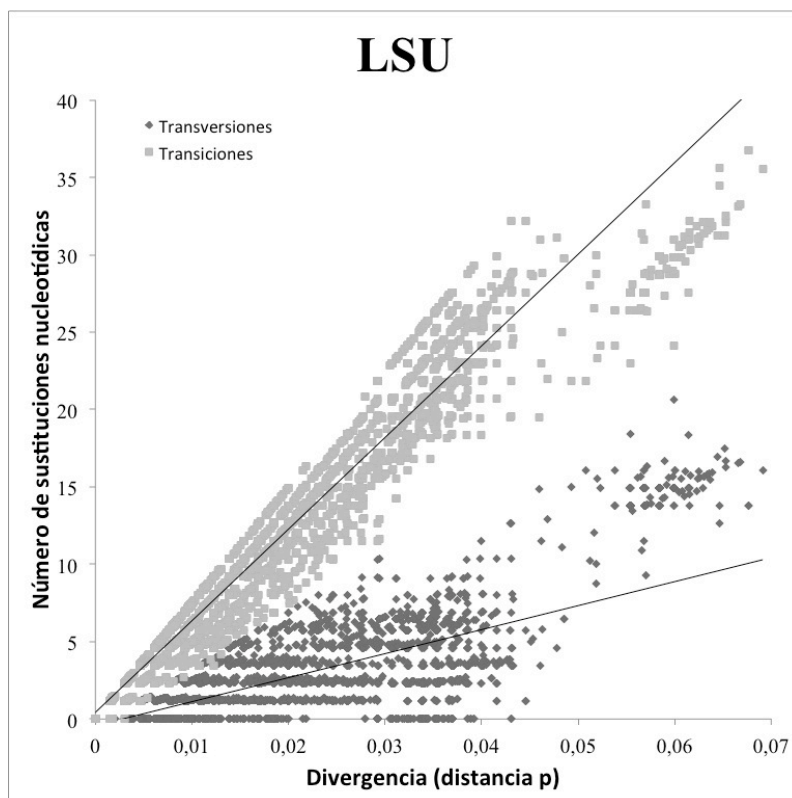
**Figura 4.1-4.** Gráficas de saturación de sustituciones nucleotídicas no corregidas para la matriz alineada de secuencias *EF1a*. Se muestran las curvas de saturación individualizadas por posiciones de codón.



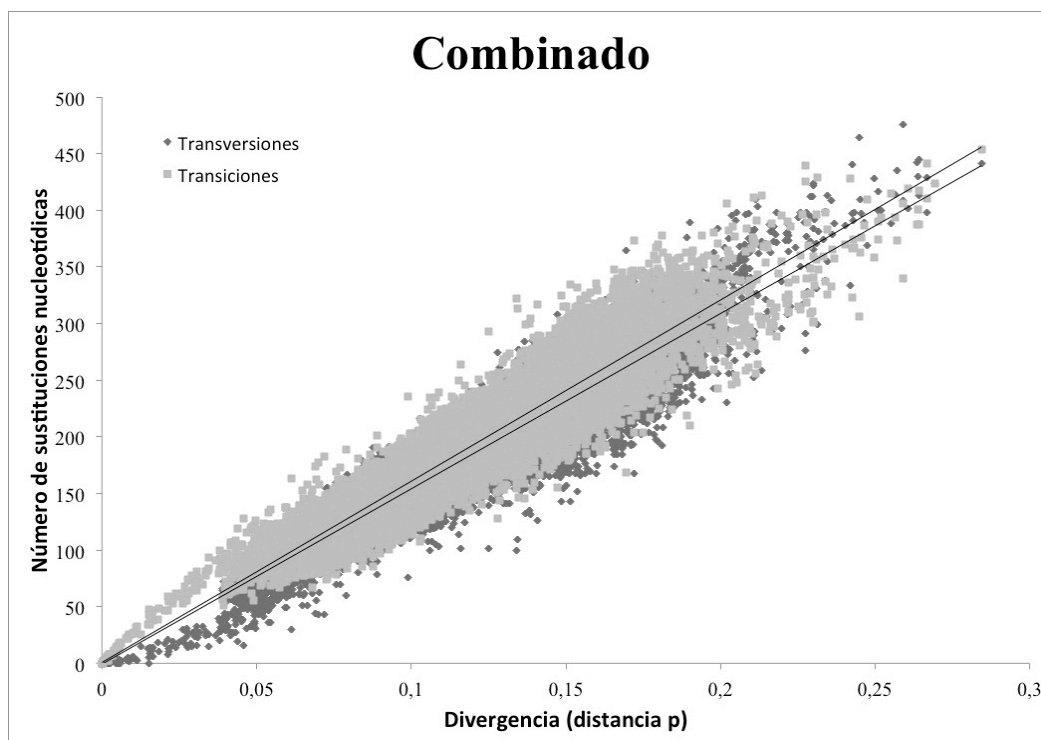
**Figura 4.1-5.** Gráficas de saturación de sustituciones nucleotídicas no corregidas para la matriz alineada de secuencias CAD. Se muestran las curvas de saturación individualizadas por posiciones de codón.



**Figura 4.1-6.** Gráficas de saturación de sustituciones nucleotídicas no corregidas para la matriz alineada de secuencias *rrnL*. Se muestran las curvas de saturación individualizadas para transiciones y transversiones.



**Figura 4.1-7.** Gráficas de saturación de sustituciones nucleotídicas no corregidas para la matriz alineada de secuencias LSU. Se muestran las curvas de saturación individualizadas para transiciones y transversiones.



**Figura 4.1-8.** Gráficas de saturación de sustituciones nucleotídicas no corregidas para la matriz alineada de secuencias combinadas de los marcadores *cox1*, EF1a, CAD, *rmL* y LSU. Se muestran las curvas de saturación individualizadas para transiciones y transversiones.

#### 4.1.4.2.- Ortología de las secuencias EF1a

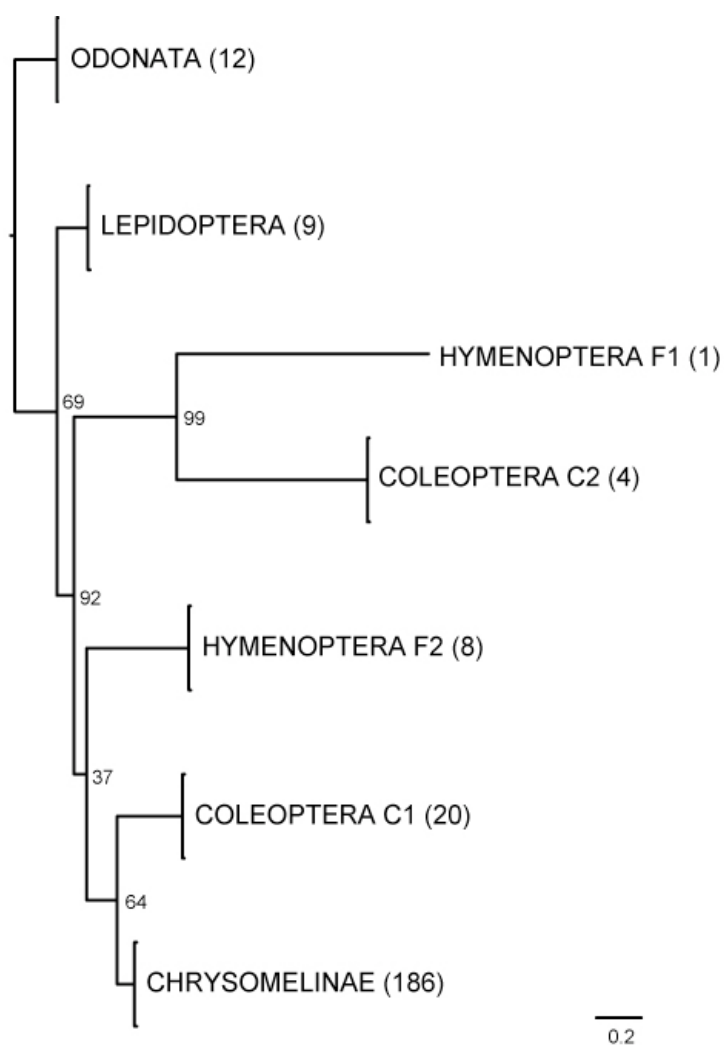
Una vez alineadas las 186 secuencias EF1a de Chrysomelidae junto a las 24 secuencias EF1a de coleópteros descargadas de las bases de datos (Tabla 4.1-2) se pudo comprobar la presencia en las copias C2 de un intrón de entre 52 y 60 nt exclusivo de las mismas (Jordal, 2002; Djernæs y Damgaard, 2006), y que se recuperó en la posición 430/431 tomando como referencia al transcrito del RNA mensajero de la copia F1 EF1a de *Drosophila melanogaster* (número de acceso X06869). Tanto las secuencias EF1a de Chrysomelidae generadas en el presente estudio como las relativas a las 20 especies de escarabajos con copia C1 extraídas de la base de datos carecieron del mencionado intrón, con lo que dedujimos la pertenencia de nuestras secuencias a la copia C1. Por otro lado, todas las secuencias EF1a de Coleoptera analizadas presentaron un intrón en la posición 753/754, que se sabe es común a las dos copias descritas en coleópteros (Jordal, 2002). La longitud de dicho intrón en nuestro conjunto de secuencias de Chrysomelidae resultó ser muy variable, oscilando entre 48 y 798 nt.

Las divergencias genéticas entre las secuencias EF1a de las especies de Chrysomelidae y las copias C1 y C2 publicadas por Jordal (2002) para cuatro especies de Curculionidae se muestran en la tabla 4.1-5. En la misma se puede apreciar que las copias C2 están más distanciadas con respecto a las copias C1 y al conjunto de Chrysomelidae (27% de divergencia), de lo que lo están estos dos últimos grupos entre sí (17 %). El significado de esta diferencia adquiere aún más relevancia si tenemos en cuenta que las copias C1 y C2 de EF1a utilizadas en la comparaciones fueron secuenciadas por Jordal (2002) a partir de las mismas especies e individuos.

El análisis filogenético de máxima verosimilitud basado en los dos exones EF1a concatenados de las 186 secuencias de Chrysomelinae junto a las 54 secuencias procedentes de cuatro órdenes de insectos generó un árbol (Figura 4.1-9) en el que el clado de los Chrysomelinae se recuperó como grupo hermano de las copias C1 de Coleoptera, y ambos grupos a su vez como hermanos de las copias F2 de Hymenoptera, como ya se había descrito (Simon *et al.*, 2010). Por otra parte, las copias C2 se recuperaron en una posición filogenética alejada de nuestro grupo de estudio, resultando más cercanas a la copia F1 de Hymenoptera que al resto de secuencias de Coleoptera.

	Divergencia genética media ± desviación estándar			
	intergrupala		intragrupal	
	Chrysomelinae	Coleoptera C1	Coleoptera C2	
Chrysomelinae	-	-	-	0.09 ± 0.01
Coleoptera C1	0.17 ± 0.01	-	-	0.07 ± 0.01
Coleoptera C2	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	-	0.11 ± 0.01

**Tabla 4.1-5.** Divergencias genéticas (distancia p) entre las secuencias EF1a de una selección de Chrysomelinae incluidos en el presente estudio (210 secuencias), y las secuencias de las copias C1 y C2 descritas por Jordal (2002) para cuatro especies de coleópteros de la familia Curculionidae.



**Figura 4.1-9.** Representación esquemática del árbol de máxima verosimilitud obtenido en PHYML a partir de la matriz alineada de las regiones exónicas EF1a de cuatro órdenes de insectos incluyendo las dos copias descritas en Coleoptera e Hymenoptera. El análisis pone de manifiesto la proximidad evolutiva entre las secuencias de nuestro grupo de estudio (Chrysomelinae) y las copias C1 de coleópteros.

4.1.4.3.- *Filogenia molecular de Chrysomelinae*

La tabla 4.1-6 resume el resultado de la selección estadística bajo el criterio de selección de Akaike de los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaron a cada una de las particiones de datos. Respecto a los marcadores combinados, en la mayoría de los casos (10, 12 y 6, respectivamente para las matrices 99, 245 y 273) se asignó un modelo GTR+I+G.

		Modelo seleccionado		
		Matriz 99	Matriz 245	Matriz 273
<i>cox1</i>	<i>cox1</i> sin subdividir	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
	<i>cox1</i> 1as posiciones de codón	K2P+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
	<i>cox1</i> 2as posiciones de codón	JC69+I	GTR+I+G	GTR+I+G
	<i>cox1</i> 3as posiciones de codón	HKY+G	HKY+G	HKY+I+G
	<i>cox1</i> 1as y 2as posiciones de codón	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
EF1a	EF1a sin subdividir	SYM+I+G	HKY+I+G	HKY+I+G
	EF1a 1as posiciones de codón	JC69	GTR+I+G	GTR+I+G
	EF1a 2as posiciones de codón	SYM+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
	EF1a 3as posiciones de codón	HKY+I+G	HKY+I+G	GTR+I+G
	EF1a 1as y 2as posiciones de codón	K2P+I+G	JC69+I+G	JC69+G
CAD	CAD sin subdividir	HKY+I+G	HKY+I+G	HKY+I+G
	CAD 1as posiciones de codón	GTR+I	GTR+G	GTR+G
	CAD 2as posiciones de codón	SYM+I	GTR+I	GTR+I
	CAD 3as posiciones de codón	HKY+I+G	HKY+I+G	HKY+I+G
	CAD 1as y 2as posiciones de codón	SYM+I	SYM+G	SYM+I+G
LSU	LSU sin subdividir	SYM+I	SYM+I+G	K2P+I+G
<i>rrnL</i>	<i>rrnL</i> sin subdividir	HKY+I+G	HKY+G	HKY+I+G
marcadores combinados	sin subdividir	GTR+I+G	GTR+I+G	HKY+I+G
	genes mitocondriales	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
	genes nucleares	GTR+I+G	GTR+I+G	HKY+I+G
	genes codificantes	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
	genes no codificantes	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
	1as posiciones de codón	GTR+I+G	GTR+I+G	K2P+I+G
	2as posiciones de codón	GTR+I+G	GTR+I+G	JC69+G
	3as posiciones de codón	GTR+G	GTR+G	HKY+G
	1as y 2as posiciones de codón	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
	1as posiciones de codón nuclear	GTR+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
	2as posiciones de codón nuclear	JC69+I+G	GTR+I+G	GTR+I+G
	3as posiciones de codón nuclear	HKY+I+G	GTR+I+G	HKY+I+G
1as y 2as posiciones de codón nuclear	SYM+I+G	K2P+I+G	K2P+I+G	

**Tabla 4.1-6.** Resumen de los modelos evolutivos seleccionados en las tres matrices estudiadas para cada una de las particiones analizadas bajo el criterio de información de Akaike tanto a nivel de genes individuales como de marcadores combinados.

Las tablas 4.1-7 a 4.1-9 muestran los resultados de la selección de los esquemas óptimos de partición de datos tanto en los marcadores individuales como en su combinación, y para cada una de las matrices de datos. Con respecto a los genes separados, los valores optimizados de verosimilitud obtenidos con GARLI-PART v.0.97 fueron mejores en los casos en los que se consideraron las posiciones de codón de los genes codificantes como particiones independientes, excepto en los genes *cox1* y *EF1a* para la "matriz-99", donde la fusión de las primeras y segundas posiciones de codón resultó ser la estrategia óptima. Los criterios de decisión AIC, AICc y BIC coincidieron en seleccionar dichas estrategias como las más apropiadas, independientemente de si se computaron o no las longitudes de rama como parámetros libres. A pesar de que los criterios de selección empleados penalizan el exceso de parámetros, la estrategia de partición de datos seleccionada para los cinco marcadores resultó ser siempre la más subdividida de entre las evaluadas, y por consiguiente la que más parámetros libres incluía. En cuanto a la estrategia de partición de datos de los genes combinados, todos los criterios de selección también determinaron como más apropiada a la que contemplaba a los cinco genes separados, cada uno de ellos subdividido según su mejor esquema de partición individual.

Los resultados del test ILD no mostraron niveles significativos de incongruencia entre los cinco genes analizados simultáneamente ( $P = 0,71$ ). Consistentemente, el análisis de PBS basado en el árbol bayesiano de la "matriz-99" mostró que las diferencias de signo detectadas para un mismo nodo estaban generalmente asociadas a valores reducidos de soporte, siendo los valores negativos minoritarios (Figuras 4.1-10 y 4.1-11). Estos resultados permiten mantener la hipótesis de que los cinco marcadores moleculares comparten una historia evolutiva común en el grupo de estudio, por lo que se procedió a su análisis combinado.

Part.	n	N	Verosimilitud	Parámetros Libres (*/**)	Longitudes de rama son parámetros libres			Longitudes de rama no son parámetros libres		
					AIC	AICc	BIC	AIC	AICc	BIC
<i>cox1</i> sin subdividir	1	750	99	-20052.1283	10/205	39724.91081	40693.64416	40124.2566	40126.7566	40133.00721
<i>cox1</i> posiciones de codón separadas	3	750	99	-19693.1791	18/213	39019.62777	39998.74625	39422.3582	39430.9082	39438.1093
<i>cox1</i> 1as+2as/3as posiciones de codón	2	750	99	-19574.0681	16/211	<b>39570.1362</b>	<b>38778.41939</b>	<b>39180.1362</b>	<b>39186.77035</b>	<b>39194.13718</b>
EF1a sin subdividir	1	619	99	-7975.0721	10/205	16360.1442	15570.79841	16522.44078	15970.1442	15978.06111
EF1a posiciones de codón separadas	3	619	99	-7869.0611	22/217	16172.1222	15377.06338	16343.91907	15782.1222	15795.43799
EF1a 1as+2as/3as posiciones de codón	2	619	99	-7723.7696	13/208	<b>15863.5392</b>	<b>15073.1392</b>	<b>16028.21085</b>	<b>15473.5392</b>	<b>15483.83118</b>
CAD sin subdividir	1	485	99	-8567.9565	6/201	17537.913	16749.52465	17675.74709	17147.913	17148.82604
CAD posiciones de codón separadas	3	485	99	-8247.3185	26/221	<b>16936.637</b>	<b>16138.8809</b>	<b>17088.18592</b>	<b>16546.637</b>	<b>16564.46629</b>
CAD 1as+2as/3as posiciones de codón	2	485	99	-8294.2345	16/211	17010.469	16218.75219	17155.16051	16620.469	16631.44087
genes combinados sin subdividir	1	3056	99	-49586.16	10/205	99582.32	98792.97421	99886.77644	99192.32	99194.82
ADN mitocondrial/ADN nuclear	2	3056	99	-48604.0219	21/216	97640.0438	96845.60312	97960.83692	97250.0438	97281.23202
genes separados	5	3056	99	-47824.8384	45/240	96129.6768	95315.02891	96486.1136	95739.6768	95817.79001
1as+2as/3as/ <i>rnmL</i> / <i>LSU</i>	4	3056	99	-47660.4437	37/232	95784.8874	94978.08143	96129.44298	95394.8874	95449.83807
1as/2as/3as/ <i>rnmL</i> / <i>LSU</i>	5	3056	99	-47356.4747	48/243	95198.9494	94381.12871	95559.84166	94808.9494	94880.23676
ADN codificante mitocondrial/ADN no codificante mitocondrial/ADN codificante nuclear/ADN no codificante nuclear	4	3056	99	-47850.926	38/233	96167.852	95360.11867	96513.89273	95777.852	95827.252
1as mitocondriales/2as mitocondriales/3as mitocondriales/1as nucleares/2as nucleares/3as nucleares/ <i>rnmL</i> / <i>LSU</i>	8	3056	99	-47001.8364	59/254	94511.6728	93681.28818	94888.90175	94121.6728	94209.29685
1as+2as mitocondriales/3as mitocondriales/1as+2as nucleares/3as nucleares/ <i>rnmL</i> / <i>LSU</i>	6	3056	99	-47034.6301	51/246	94561.2602	93740.15209	94926.60792	94171.2602	94247.00302
ADN codificante/ADN no codificante genes separados cada uno con su estrategia óptima de partición	2	3056	99	-48972.0957	21/216	98376.1914	97581.75072	98696.98452	97986.1914	98017.37962
	11	3056	99	-46732.3424	76/271	<b>94006.6848</b>	<b>93154.52295</b>	<b>94409.16136</b>	<b>93616.6848</b>	<b>93729.55645</b>

**Tabla 4.1-7.** Resultados de la selección de los esquemas de partición de datos para la “matriz-99” bajo los criterios de AIC, AICc y BIC tanto a nivel de marcadores individuales como de marcadores combinados. Los datos se analizaron sin considerar las longitudes de rama como parámetros libres (\*) y considerándolas (\*\*). En negrita se marcan los resultados seleccionados. Abreviaturas: Part. = número de particiones; n = número de caracteres en la partición; N = número de taxones.

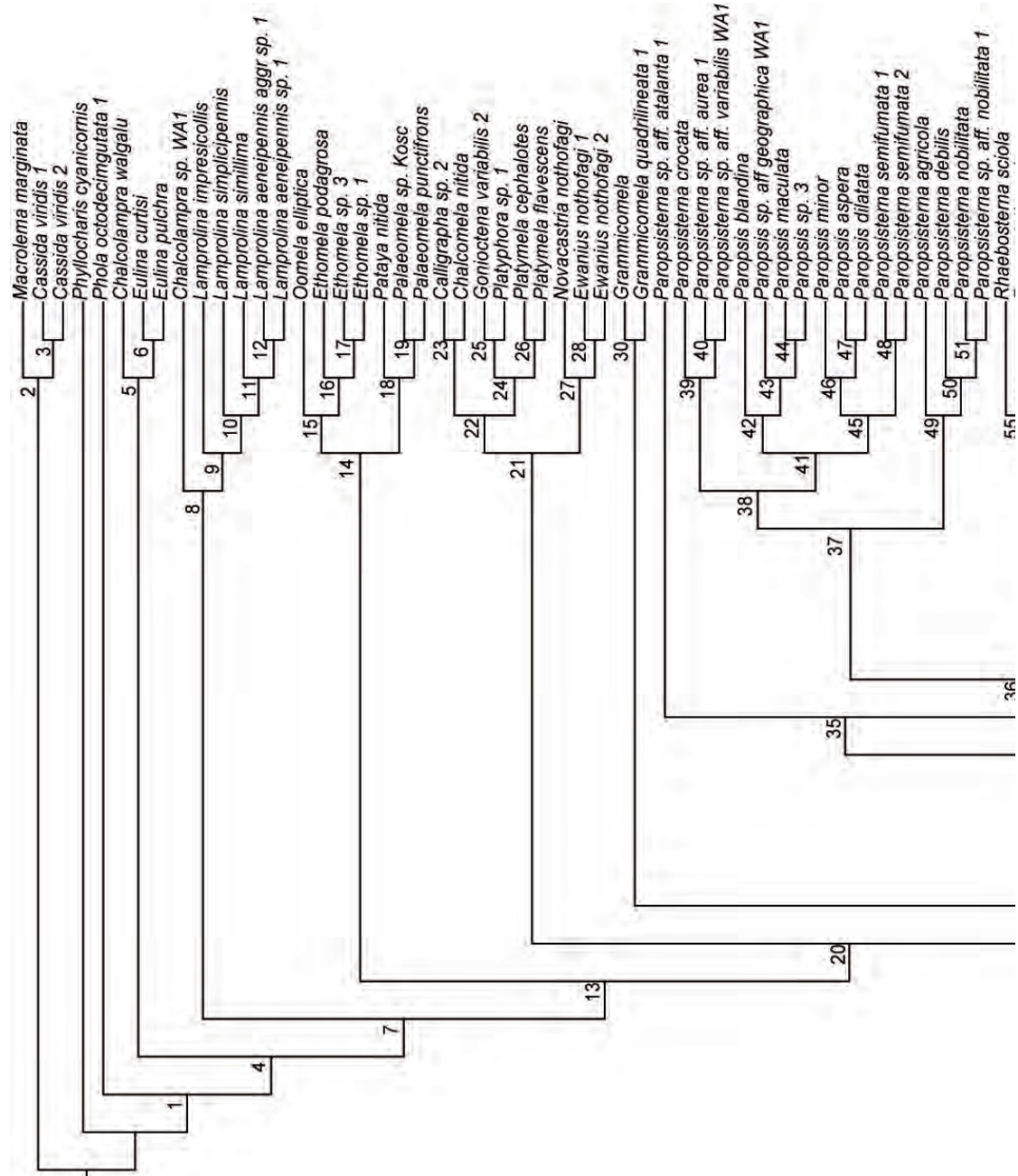


Part.	n	N	Verosimilitud	Parámetros Libres (*/**)	AIC	AICc	BIC	AIC	AICc	BIC
cox1 sin subdividir	1	750	245	-42076.98486	10/497	85147.96973	83191.40056	85582.87518	84173.96973	84182.72034
cox1 posiciones de codón separadas	3	750	245	-41316.79659	27/514	<b>83661.59318</b>	<b>81700.77837</b>	<b>84111.37467</b>	<b>82694.56092</b>	<b>82711.21983</b>
cox1 1as+2as/3as posiciones de codón	2	750	245	-41407.286	16/503	83820.572	81862.95038	84260.72782	82846.572	82860.57298
EF1a sin subdividir	1	619	176	-12171.30698	6/355	25052.61396	23648.39174	25333.66414	24354.61396	24359.36411
EF1a posiciones de codón separadas	3	619	176	-11799.29349	28/377	<b>24352.58697</b>	<b>22941.63647</b>	<b>24651.05434</b>	<b>23665.63459</b>	<b>23676.75431</b>
EF1a 1as+2as/3as posiciones de codón	2	619	176	-11944.58239	13/362	24613.16479	23207.75302	24899.7568	23915.16479	23925.45677
CAD sin subdividir	1	485	152	-12114.36056	6/307	24842.72112	23630.46471	25053.24383	24240.72112	24241.30043
CAD posiciones de codón separadas	3	485	152	-11766.95024	26/327	<b>24187.90048</b>	<b>22969.0823</b>	<b>24412.13803</b>	<b>23585.90048</b>	<b>23603.72976</b>
CAD 1as+2as/3as posiciones de codón	2	485	152	-11818.99	16/317	24271.98	23057.44988	24489.36013	23669.98	23680.95187
genes combinados sin subdividir	1	3144	245	-88628.59978	10/497	178251.1996	176294.6304	178995.4484	177277.1996	177292.1744
ADN mitocondrial/ADN nuclear	2	3144	245	-87304.15638	21/508	175624.3128	173665.434	176385.0339	174650.3128	174681.7599
genes separados	5	3144	245	-86261.211	42/529	173580.422	171612.9132	174372.5903	172606.422	172669.3163
1as+2as/3as/rnmL/LSU	4	3144	245	-86710.955	38/525	174471.91	172506.4296	175258.0883	173497.91	173512.2983
1as/2as/3as/rnmL/LSU	5	3144	245	-86080.43203	49/536	173232.8641	171261.412	174035.5147	172258.8641	172232.2407
ADN codificante mitocondrial/ADN no codificante	4	3144	245	-86174.01483	31/518	173384.0297	171421.6793	174159.7256	172410.0297	172456.4516
ADN codificante nuclear/ADN no codificante nuclear	4	3144	245	-86174.01483	31/518	173384.0297	171421.6793	174159.7256	172410.0297	172456.4516
1as mitocondriales/2as mitocondriales/3as mitocondriales/1as nucleares/2as nucleares/3as nucleares/rnmL/LSU	8	3144	245	-84790.588	78/565	170711.176	168718.7149	171557.2536	169737.176	169853.9796
1as+2as mitocondriales/3as mitocondriales/1as+2as nucleares/3as nucleares/rnmL/LSU	6	3144	245	-86058.86525	52/539	173195.7305	171222.4424	174002.8736	172221.7305	172299.5996
ADN codificante/ADN no codificante	2	3144	245	-87720.79564	21/508	176457.5913	174498.7125	177218.3124	175483.5913	175487.7348
genes separados cada uno con su estrategia óptima de partición	11	3144	245	-84709.94545	96/583	<b>170585.8909</b>	<b>168577.2065</b>	<b>171458.9232</b>	<b>169611.8909</b>	<b>169757.7287</b>

**Tabla 4.1-8.** Resultados de la selección de los esquemas óptimos de partición de datos para la "matriz-245" bajo los criterios de AIC, AICc y BIC tanto a nivel de marcadores individuales como de marcadores combinados. Los datos se analizaron sin considerar las longitudes de rama como parámetros libres (\*) y considerándolas (\*\*). En negrita se marcan los resultados seleccionados. Abreviaturas: Part. = número de particiones; n = número de particiones; N = número de taxones.

Part.	n	N	Verosimilitud	Parámetros Libres (*/**)	Longitudes de rama son parámetros libres			Longitudes de rama no son parámetros libres			
					AIC	AICc	BIC	AIC	AICc	BIC	
<i>cox1</i> sin subdividir	1	750	245	-43183.4093	10/497	87360.8186	85404.24943	87795.72405	86386.8186	86387.75877	86395.56921
<i>cox1</i> posiciones de codón separadas	3	750	245	-42415.5851	28/515	<b>85861.1702</b>	<b>83899.98939</b>	<b>86311.82675</b>	<b>84887.1702</b>	<b>84894.68872</b>	<b>84911.67192</b>
<i>cox1</i> 1as+2as/3as posiciones de codón	2	750	245	-42570.937	17/504	86149.874	84192.02785	86590.90488	85175.874	85178.57004	85190.75004
EF1a sin subdividir	1	619	187	-12876.1323	6/377	26506.2646	25014.05518	26804.73197	25764.2646	25764.73127	25769.01474
EF1a posiciones de codón separadas	3	619	187	-12476.5417	32/403	<b>25759.0834</b>	<b>24258.51197</b>	<b>26078.13473</b>	<b>25017.0834</b>	<b>25030.79769</b>	<b>25042.4175</b>
EF1a 1as+2as/3as posiciones de codón	2	619	187	-12627.0517	16/387	26028.1034	24534.01385	26334.48768	25286.1034	25289.3034	25298.77045
CAD sin subdividir	1	485	173	-13294.4937	6/349	27286.9874	25906.76141	27526.31127	26600.9874	26601.49342	26605.10185
CAD posiciones de codón separadas	3	485	173	-12943.1835	26/369	<b>26624.367</b>	<b>25238.27563</b>	<b>26877.4057</b>	<b>25938.367</b>	<b>25947.98344</b>	<b>25956.19629</b>
CAD 1as+2as/3as posiciones de codón	2	485	173	-12998.0476	17/360	26716.0952	25333.54201	26962.96223	26030.0952	26034.04359	26041.75281
genes combinados sin subdividir	1	3148	273	-93064.8162	6/549	187227.6324	185047.488	188050.0535	186141.6324	186141.9482	186150.6206
ADN mitocondrial/ADN nuclear	2	3148	273	-91657.9183	17/560	184435.8366	182254.1699	185274.736	183349.8366	183352.2366	183375.3032
genes separados	5	3148	273	-90399.0247	38/581	181960.0494	179771.428	182830.4076	180874.0494	180886.7161	180930.9747
1as+2as/3as/ <i>rnl</i> /LSU	4	3148	273	-90487.1614	30/573	182120.3228	179934.9275	182978.6967	181034.3228	181042.0088	181079.2638
1as/2as/3as/ <i>rnl</i> /LSU	5	3148	273	-90720.3767	32/575	182590.7534	180404.6148	183452.1234	181504.7534	181513.5534	181552.6905
ADN codificante mitocondrial/ADN no codificante mitocondrial/ADN codificante nuclear/ADN no codificante nuclear	4	3148	273	-90434.2107	31/574	182016.4214	179830.6598	182876.2933	180930.4214	180938.6538	180976.8605
1as mitocondriales/2as mitocondriales/3as mitocondriales/1as nucleares/2as nucleares/3as nucleares/ <i>rnl</i> /LSU	8	3148	273	-88938.6005	66/609	179095.201	176890.5126	180007.5041	178009.201	178052.133	178108.0713
1as+2as mitocondriales/3as mitocondriales/1as+2as nucleares/3as nucleares/ <i>rnl</i> /LSU	6	3148	273	-89155.0261	49/592	179494.0522	177299.9522	180380.8888	178408.0522	178430.0253	178481.4559
ADN codificante/ADN no codificante	2	3148	273	-91996.5205	21/564	185121.041	182938.4383	185965.9326	184035.041	184038.7223	184066.4997
genes separados cada uno con su estrategia óptima de partición	11	3148	273	-88834.6064	96/639	<b>178947.2128</b>	<b>176718.5479</b>	<b>179904.457</b>	<b>177861.2128</b>	<b>177967.031</b>	<b>178005.0241</b>

**Tabla 4.1-9** Resultados de la selección de los esquemas óptimos de partición de datos para la “matriz-273” bajo los criterios de AIC, AICc y BIC tanto a nivel de marcadores individuales como de marcadores combinados. Los datos se analizaron sin considerar las longitudes de rama como parámetros libres (\*) y considerándolas (\*\*). En negrita se marcan los resultados seleccionados. Abreviaturas: Part. = número de particiones; n = número de particiones; N = número de taxones.



**Figura 4.1-10.** Árbol bayesiano obtenido a partir de la “matriz-99” con los nodos numerados para la interpretación de los resultados del análisis PBS recogidos en la figura 4.1-11. (Continúa en la página siguiente).

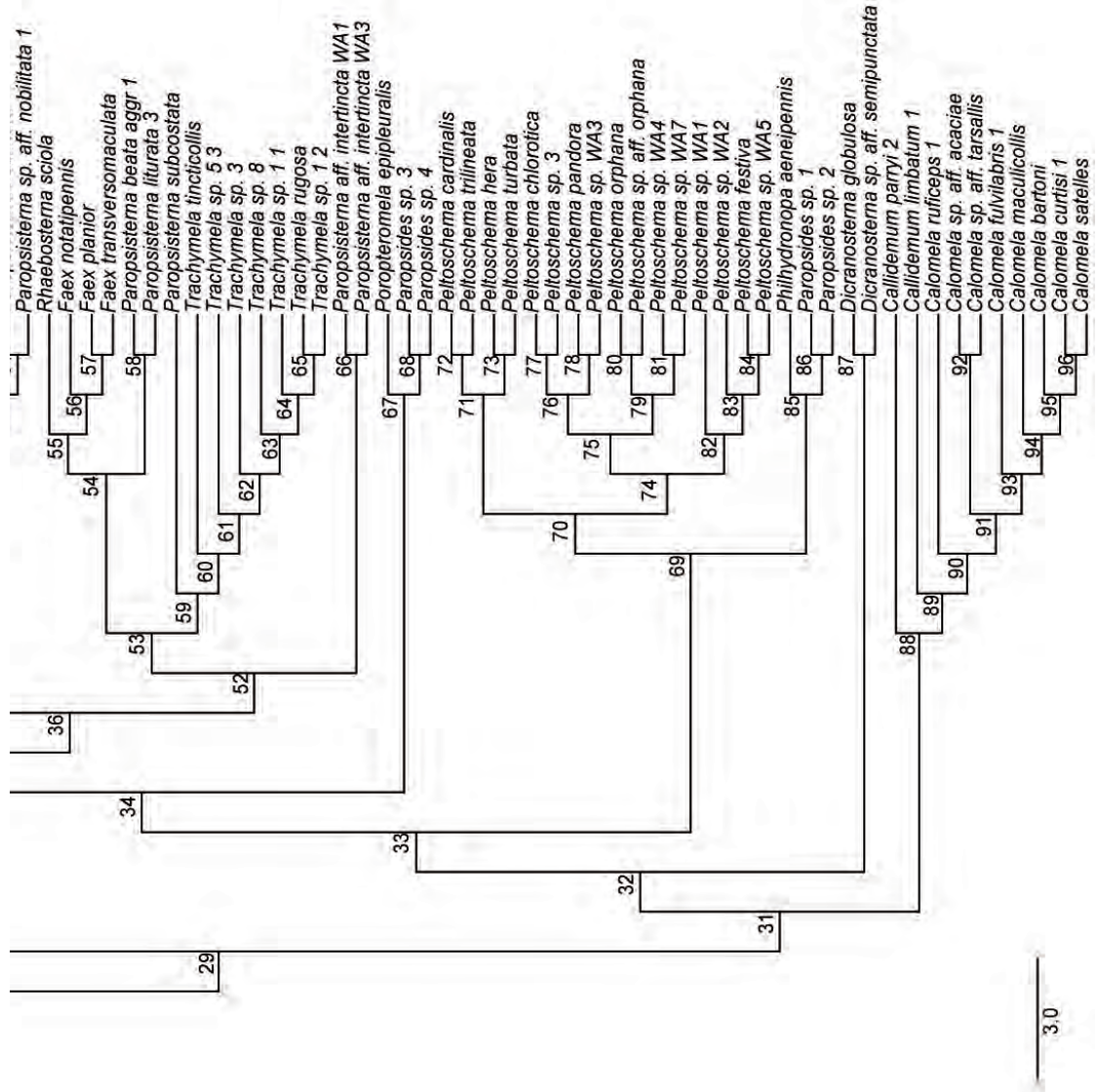
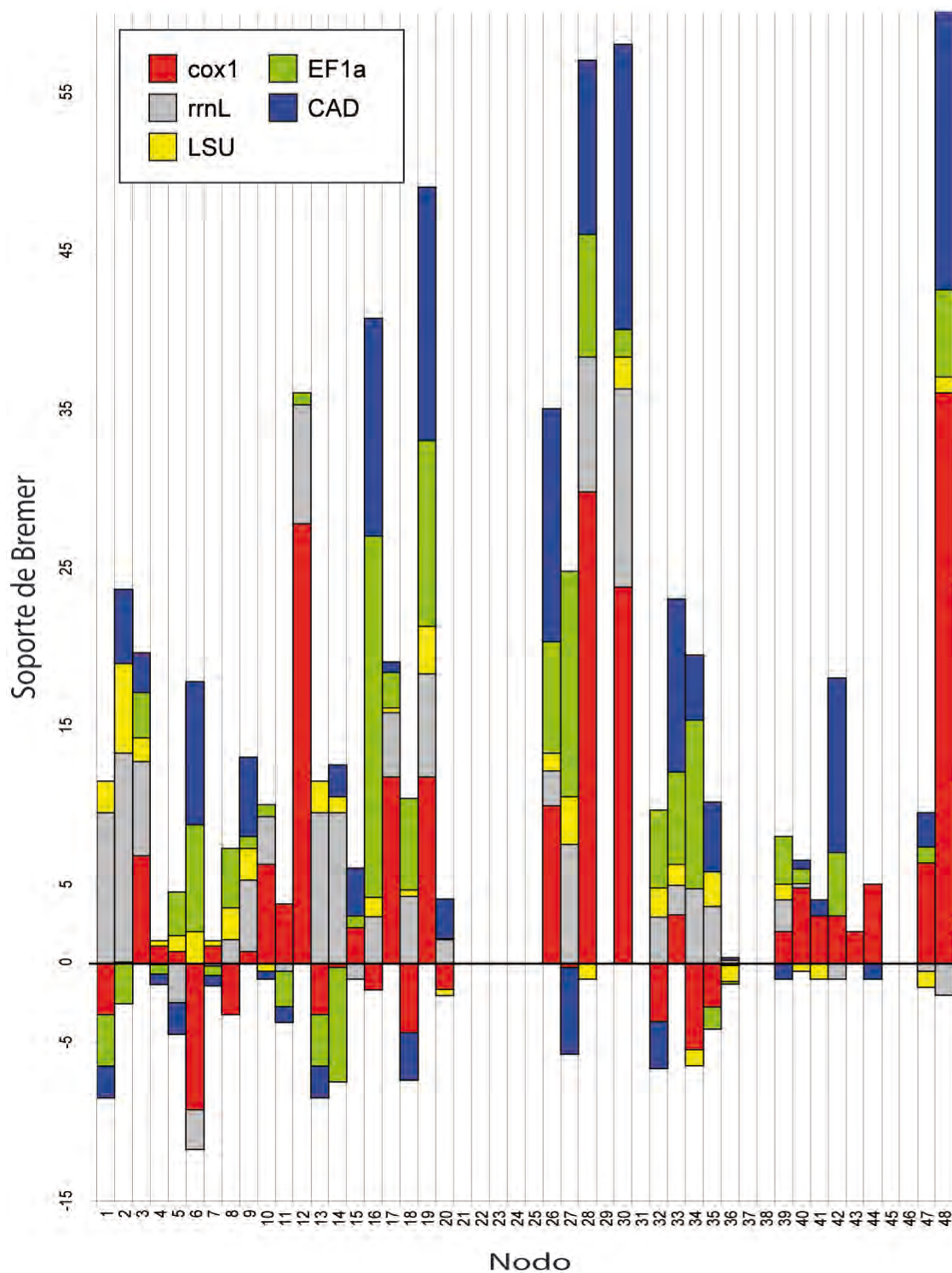


Figura 4.1-10. Continuación



**Figura 4.1-11.** Histograma representando la contribución relativa de cada marcador molecular en el análisis particionado de Bremer de la matriz-99 y su árbol bayesiano derivado. La numeración nodal se corresponde con la utilizada en la figura 4.1-10. (Continúa en la página siguiente).

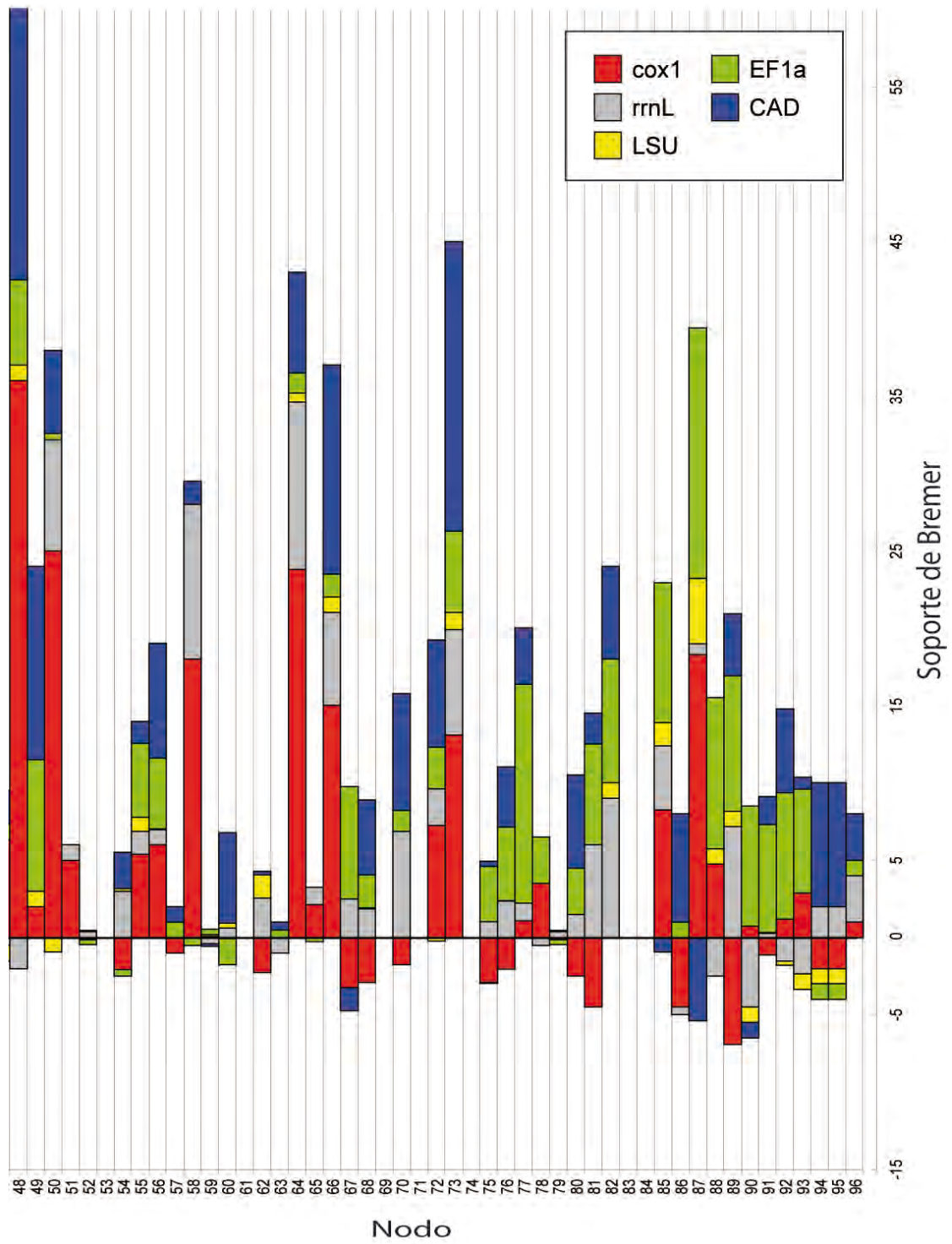


Figura 4.1-11. Continuación.

Los árboles de máxima verosimilitud seleccionados a partir de las réplicas independientes de análisis en GARLI (Tabla 4.1-10) y derivados de las tres matrices de marcadores combinados y sus respectivos valores de soporte *bootstrap* se muestran en las figuras 4.1-12 a 4.1-14. Estos árboles aparecen enfrentados con los obtenidos a partir del análisis de datos mediante inferencia bayesiana, ilustrando su elevado grado de concordancia, confirmada también estadísticamente (Tabla 4.1-11). En particular, para la obtención de las topologías bayesianas resultantes de cada una de las matrices, se aplicaron fracciones de *burn-in* de 16 millones de generaciones (53% del total, "matriz-99"), 60 millones (60%, "matriz-245") y 30 millones (20%, "matriz-273"), respectivamente. Los gráficos obtenidos con AWYT a partir de los árboles colectados durante las búsquedas MCMC demostraron que los valores de *burnin* escogidos garantizan un análisis lo suficientemente largo en todos los casos. (Figuras 4.1-15 a 4.1-17). Todos los análisis fueron ejecutados bajo el esquema óptimo de partición de datos excepto en el caso de la "matriz-273", que no daba signos de convergencia en los parámetros ni tras 300 millones de generaciones, debido probablemente a la elevada proporción de posiciones indeterminadas afectando especialmente a algunas particiones. En este caso se optó por analizar la matriz sin subdividir.

	matriz-99	matriz-245	matriz-273
Réplica 1	<b>-46732.34200</b>	-84716.48600	-88835.39400
Réplica 2	-46758.62843	-84744.21952	-88837.18490
Réplica 3	-46847.00274	-84733.54336	-88836.80474
Réplica 4	-46732.54794	<b>-84709.94545</b>	<b>-88834.60637</b>
Réplica 5	-46732.34262	-84716.96318	-88867.28703

**Tabla 4.1-10.** Valores de máxima verosimilitud obtenidos en los cinco análisis independientes ejecutados en Garli para cada uno de los conjuntos de datos estudiados. Los resultados señalados en negrita representan la mejor de las búsquedas.

Matriz	Comparaciones entre árboles bayesianos y de máxima verosimilitud		
	Similitud global	Índice de congruencia	Distancia Robinson-Foulds
99	0.99	6.089 ( $P < 0.0001$ )	0.06
245	0.95	7.634 ( $P < 0.0001$ )	0.21
273	0.92	6.654 ( $P < 0.0001$ )	0.32

**Tabla 4.1-11.** Resultados de las pruebas de congruencia topológica entre los análisis de máxima verosimilitud y bayesianos para cada uno de los conjuntos de datos estudiados.

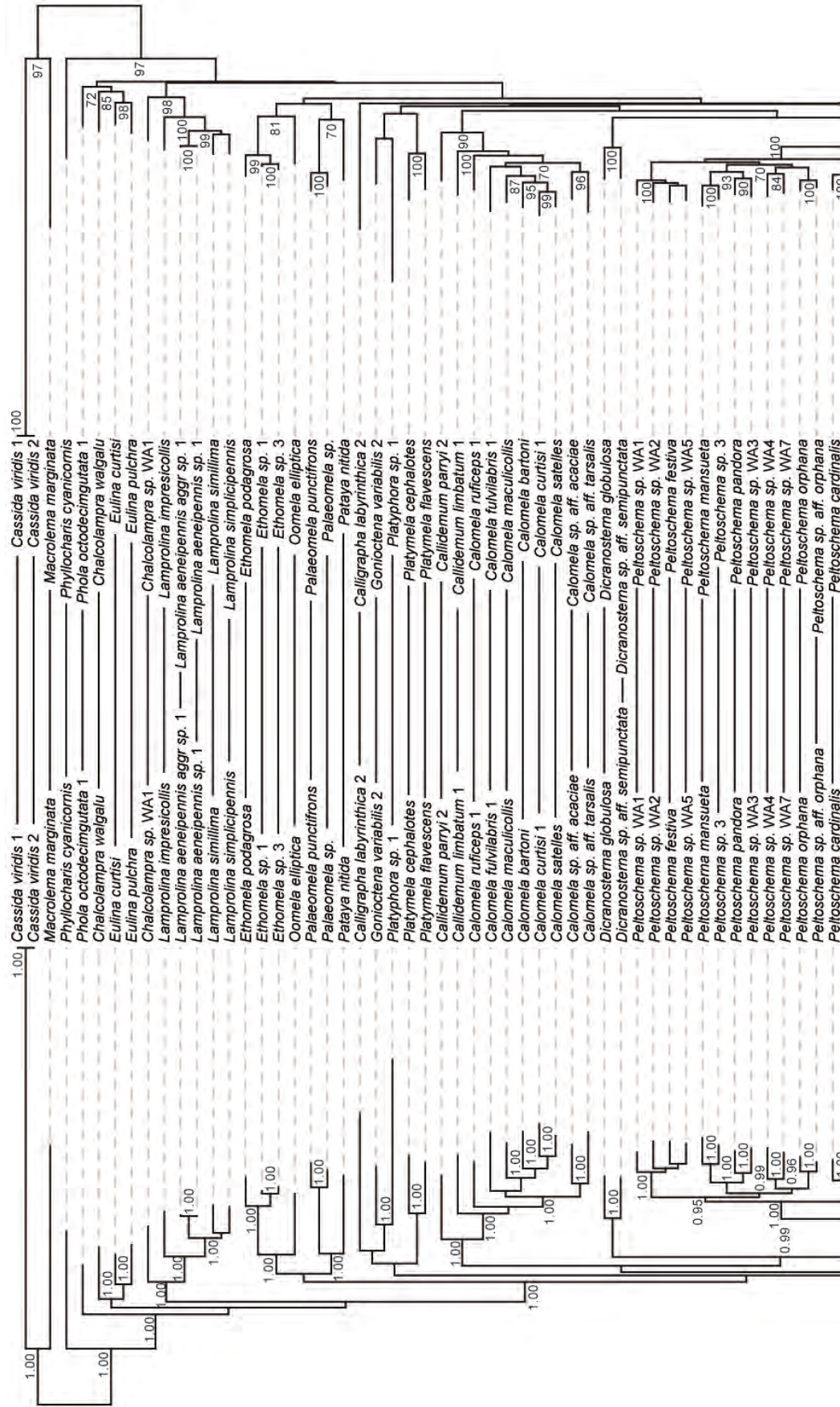


Figura 4.1-12. Árboles filogenéticos enfrentados basados respectivamente en los análisis de marcadores combinados de máxima verosimilitud (izquierda) y bayesiano (derecha) de la "matriz-99". Se muestran los valores de *bootstrap*  $\geq 70$  y de probabilidad posterior  $\geq 0.95$ . (Continúa en la página siguiente).



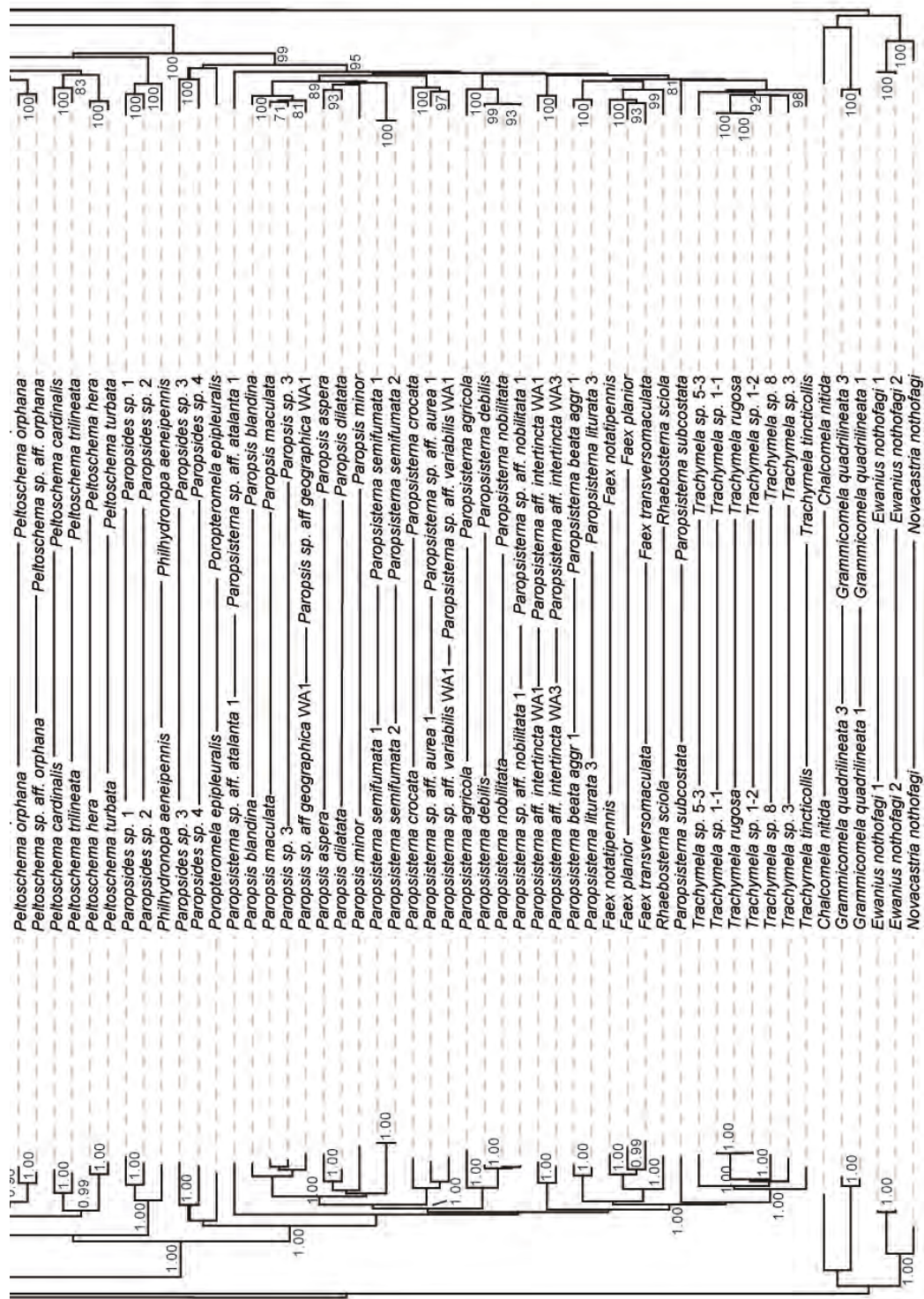


Figura 4.1-12. Continuación

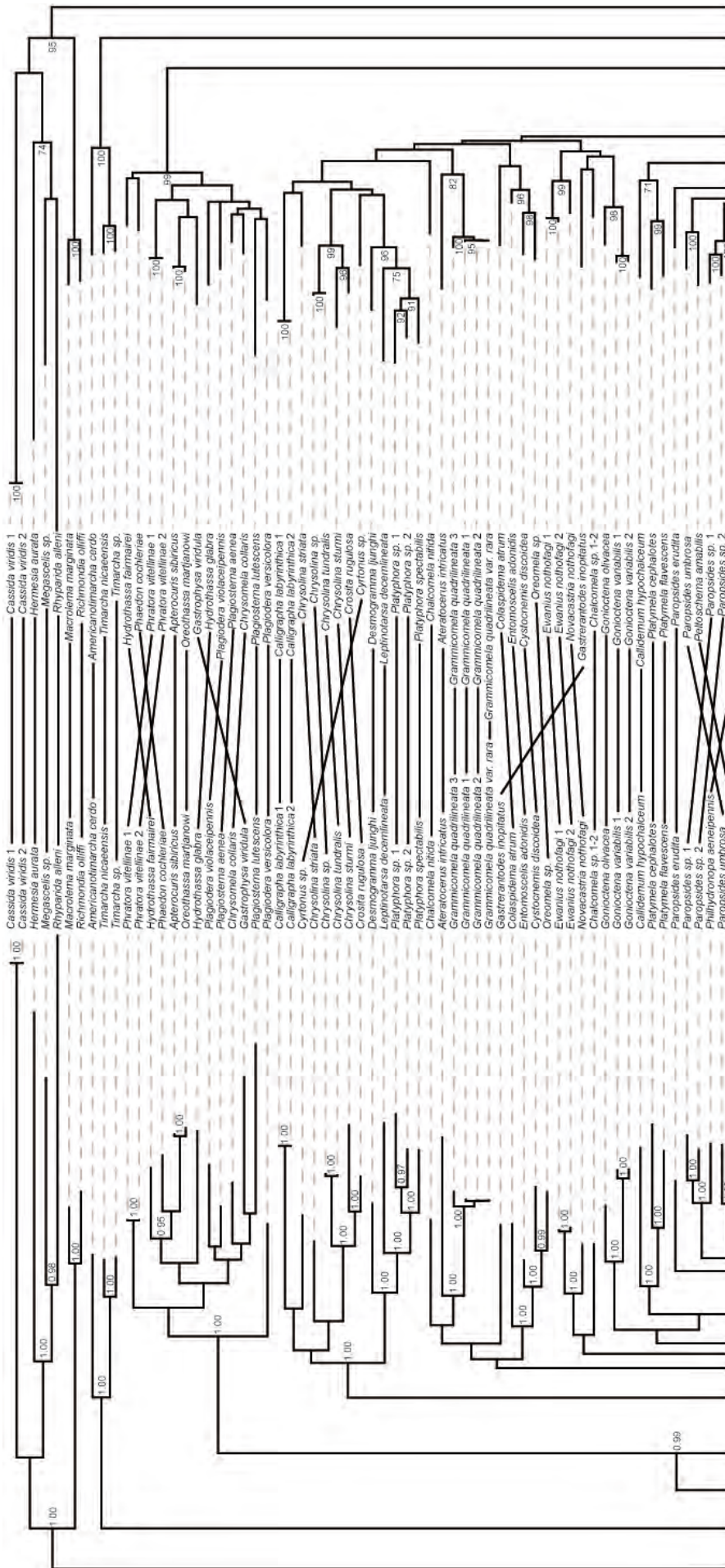


Figura 4.1-13. Árboles filogenéticos enfrentados basados respectivamente en los análisis de marcadores combinados de máxima verosimilitud (izquierda) y bayesiano (derecha) de la "matriz-245". Se muestran los valores de *bootstrap*  $\geq 70$  y de probabilidad posterior  $\geq 0.95$ . (Continúa en la página siguiente).

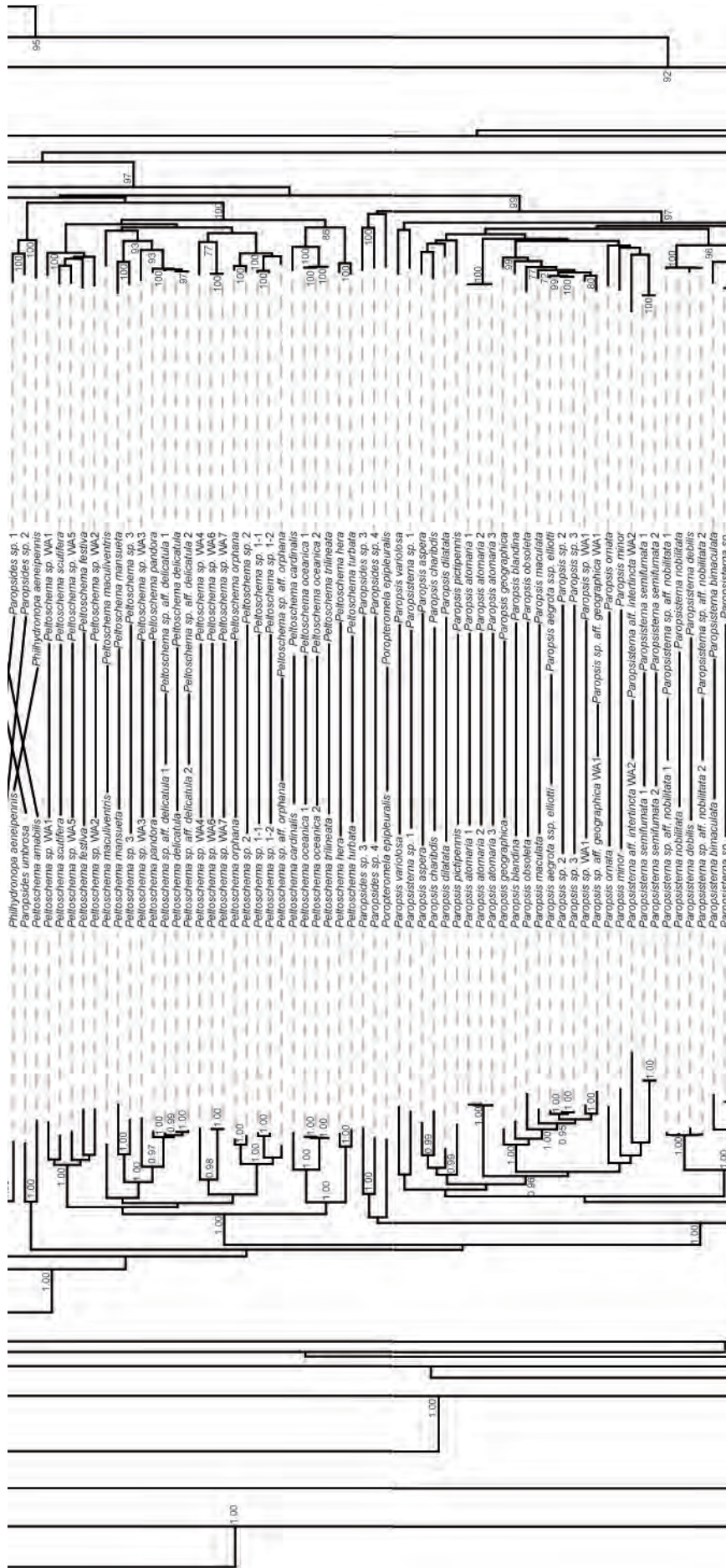


Figura 4.1-13. Continuación

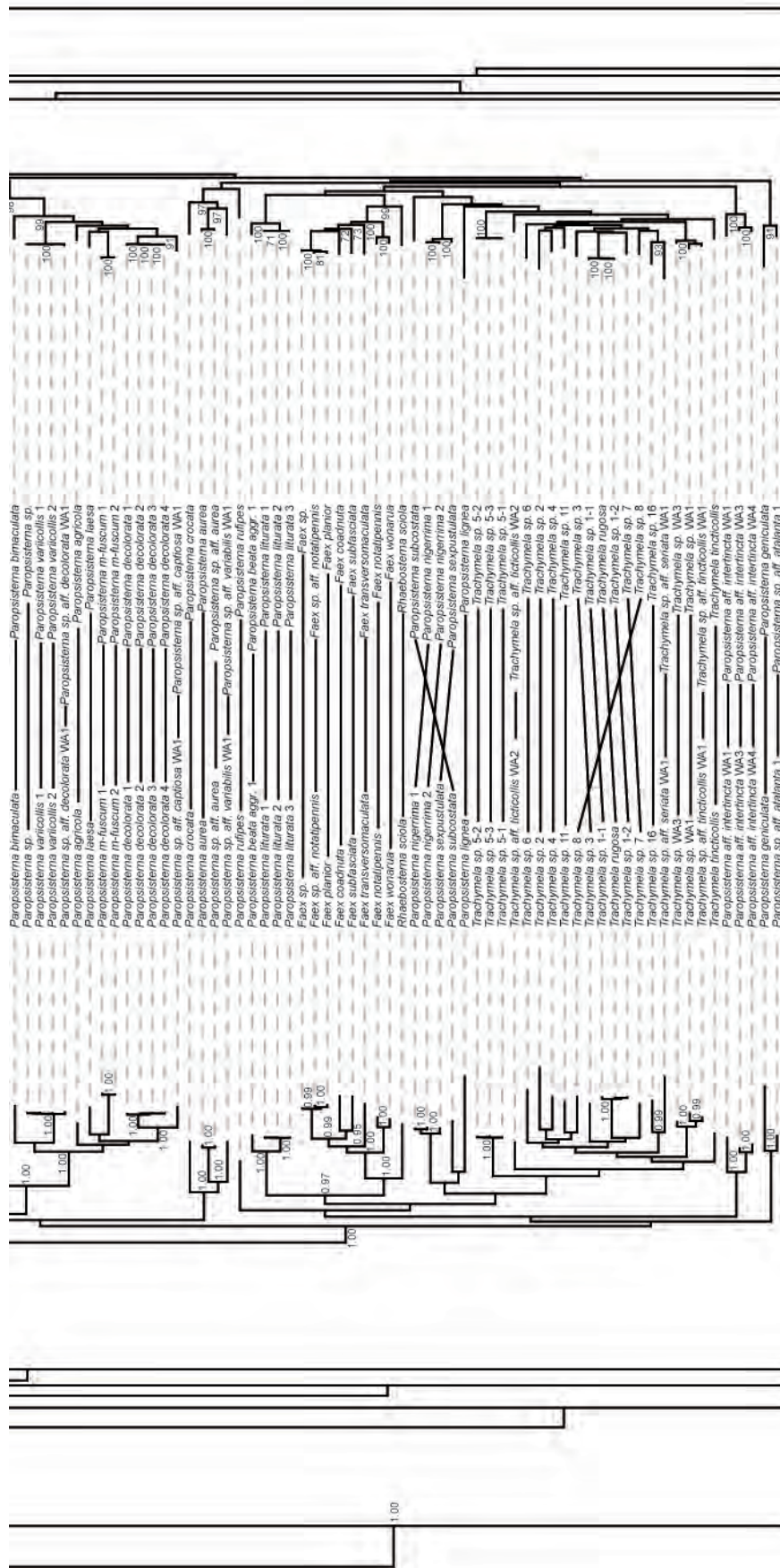


Figura 4.1-13. Continuación

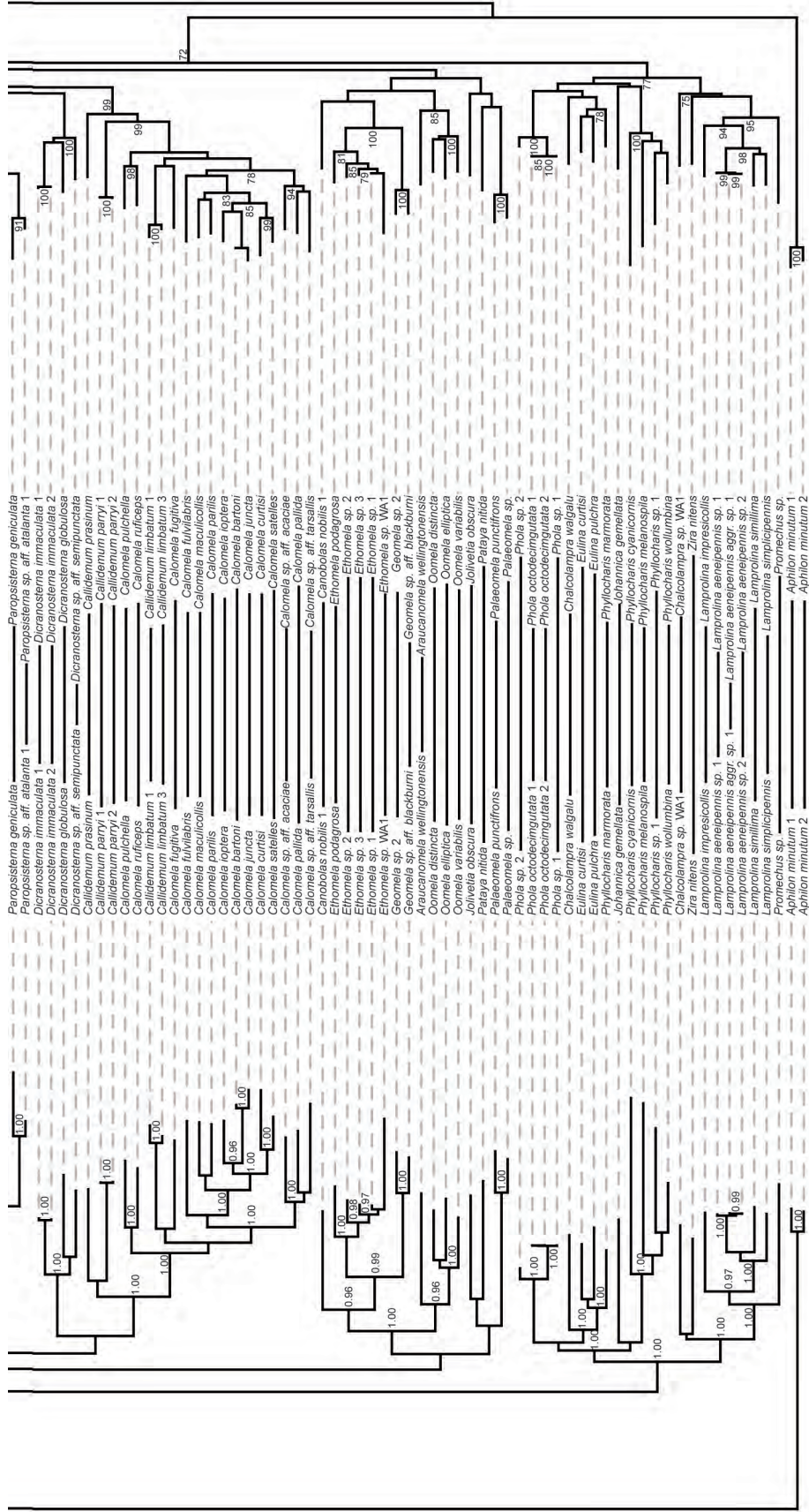
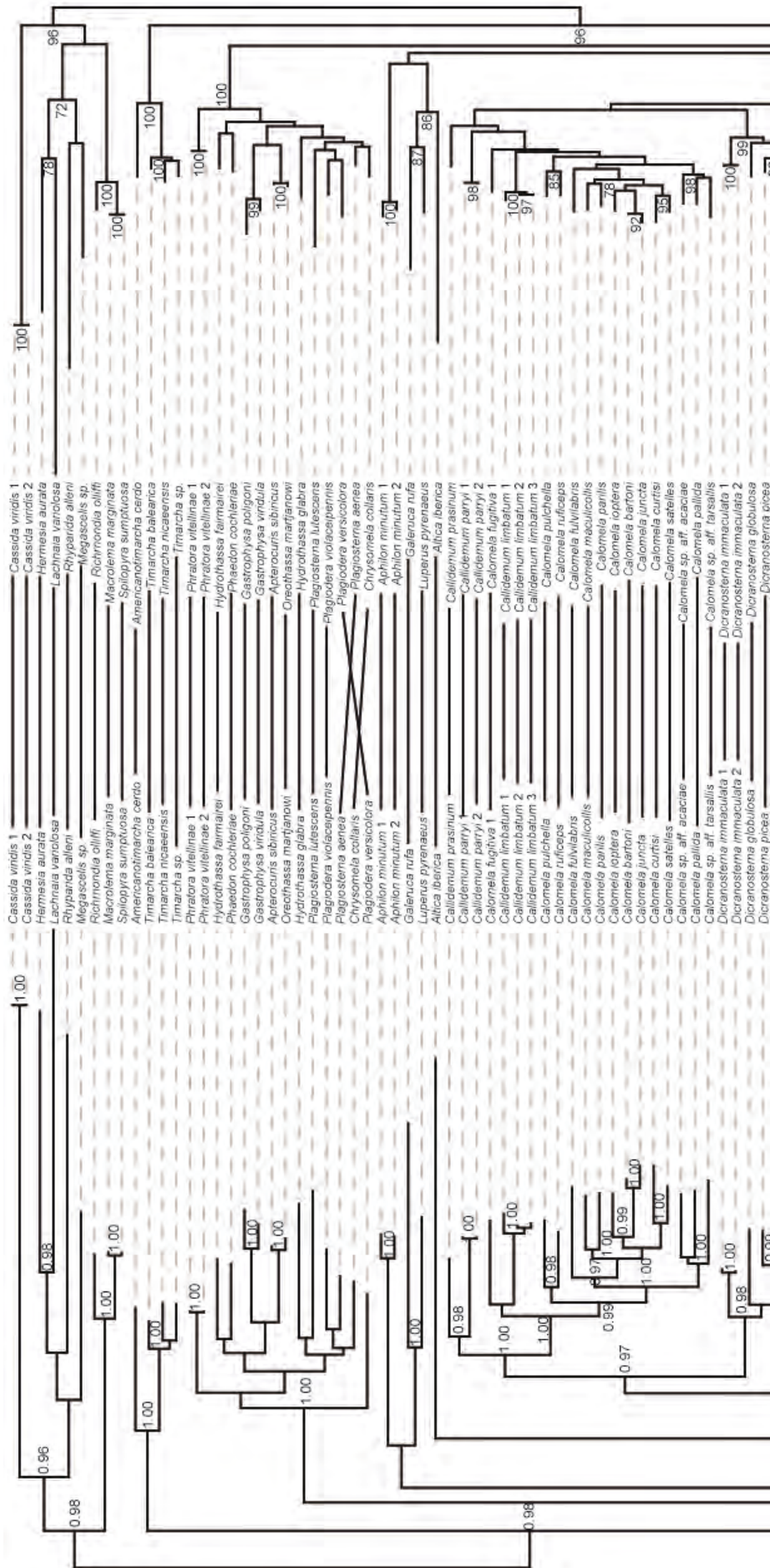


Figura 4.1-13. Continuación



**Figura 4.1-14.** Árboles filogenéticos enfrentados basados respectivamente en los análisis de marcadores combinados de máxima verosimilitud (izquierda) y bayesiano (derecha) de la "matriz-273". Se muestran los valores de *bootstrap*  $\geq 70$  y de probabilidad posterior  $\geq 0.95$ . (Continúa en la página siguiente).



Figura 4.1-14. Continuación



Figura 4.1-14. Continuación





Figura 4.1-14. Continuación

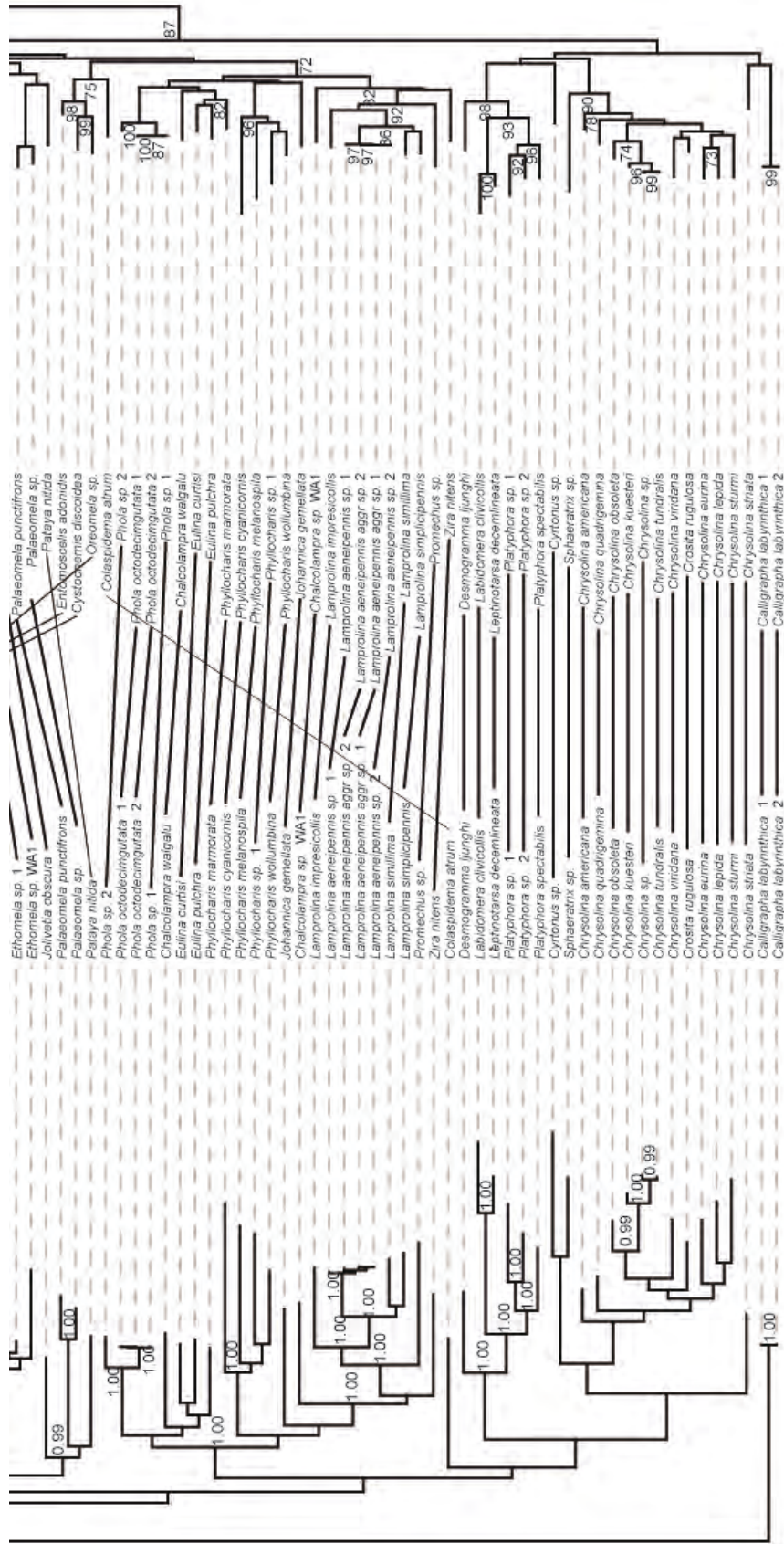
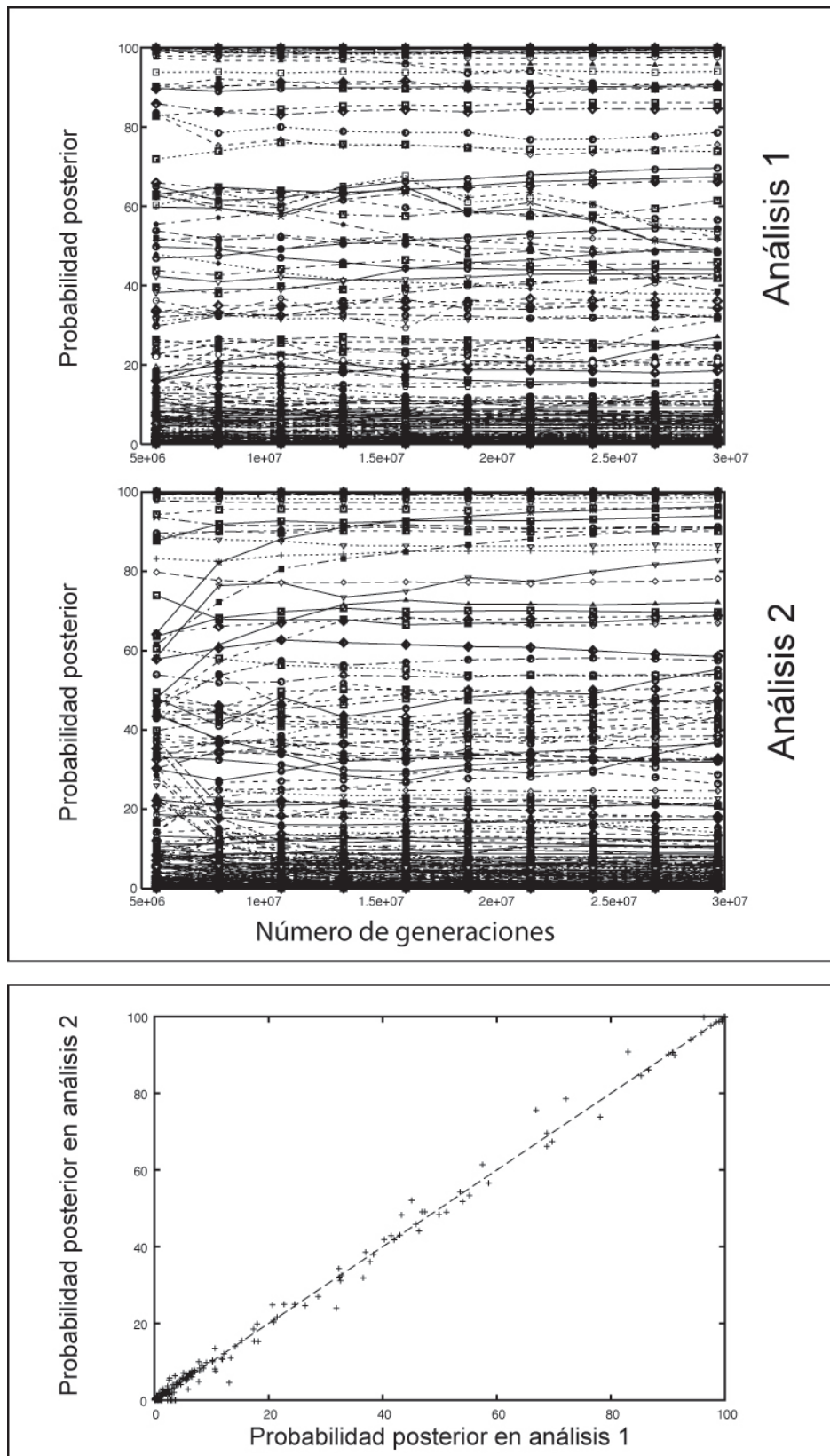
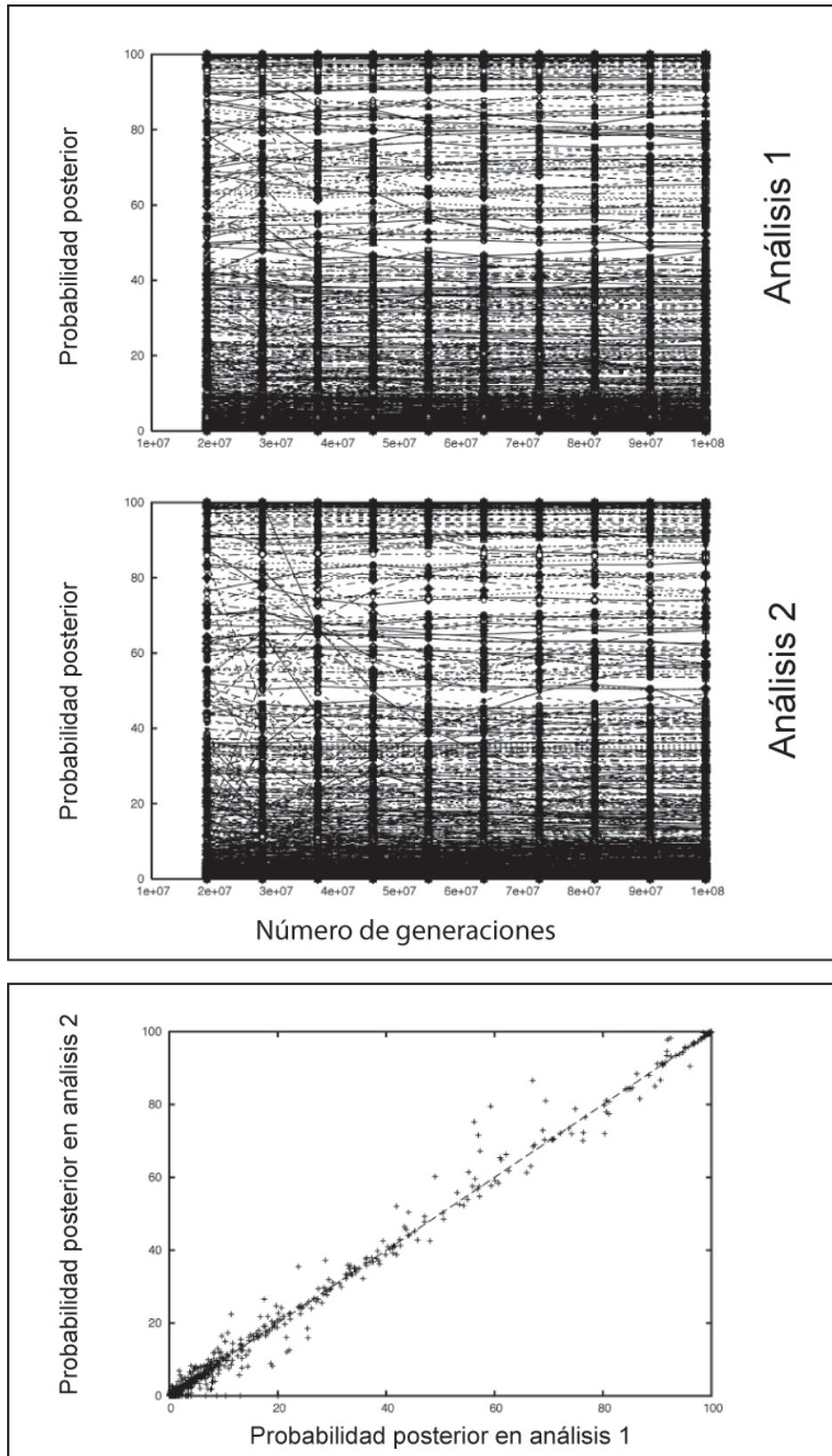


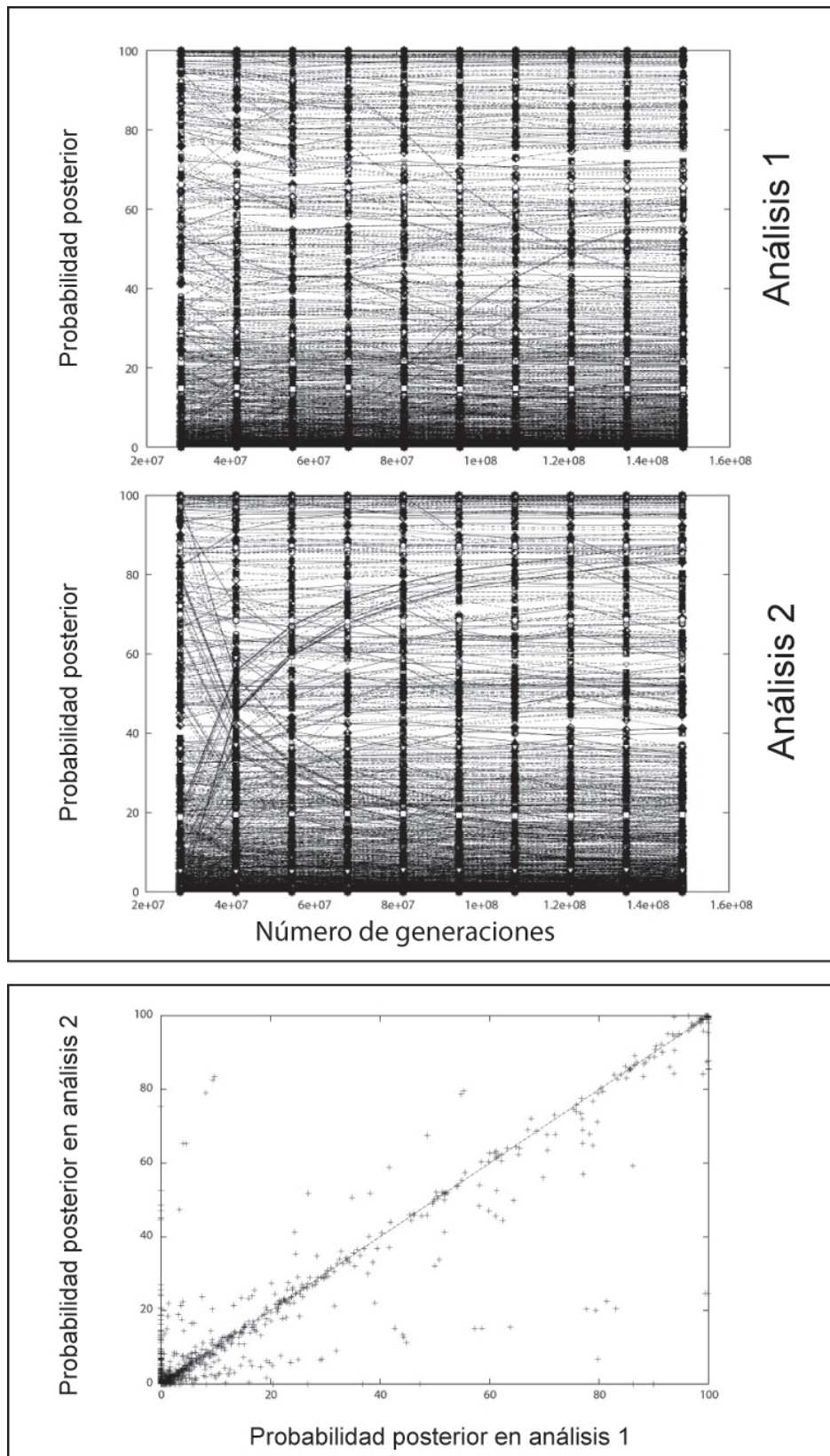
Figura 4.1-14. Continuación



**Figura 4.1-15.** Graficas AWTY para los análisis bayesianos realizados a partir de la “matriz-99”. El recuadro superior contiene las representaciones de los valores de probabilidad posterior asociados a cada una de las bifurcaciones recuperadas en el análisis a lo largo de las generaciones. El recuadro inferior muestra un enfrentamiento de los valores de probabilidad recuperados de manera independiente en los dos análisis.



**Figura 4.1-16.** Graficas AWTY para los análisis bayesianos realizados a partir de la “matriz-245”. El recuadro superior contiene las representaciones de los valores de probabilidad posterior asociados a cada una de las bifurcaciones recuperadas en el análisis a lo largo de las generaciones. El recuadro inferior muestra un enfrentamiento de los valores de probabilidad recuperados de manera independiente en los dos análisis.



**Figura 4.1-17.** Graficas AWTY para los análisis bayesianos realizados a partir de la “matriz-273”. El recuadro superior contiene las representaciones de los valores de probabilidad posterior asociados a cada una de las bifurcaciones recuperadas en el análisis a lo largo de las generaciones. El recuadro inferior muestra un enfrentamiento de los valores de probabilidad recuperados de manera independiente en los dos análisis.

Las relaciones entre subfamilias incluidas en el análisis fueron las mismas que las obtenidas por Gómez-Zurita *et al.* (2007a, 2008), incluyendo la parafilia de Chrysomelinae por inclusión de Alticinae y Galerucinae en los resultados derivados de la "matriz-273". La figura 4.1-18 resume las relaciones filogenéticas inferidas entre los géneros de Chrysomelinae incluidos en el estudio en contraste con cinco hipótesis sistemáticas relevantes para la subfamilia: Weise (1916); Seeno y Wilcox (1982); Daccordi (1994); Reid (2002) y Kippenberg (2010). Se identificaron grandes linajes coherentes con algunas de las clasificaciones supragenéricas previas, todos ellos con soporte estadístico (probabilidad posterior bayesiana  $\geq 0,95$ ; *bootstrap*  $\geq 70\%$ ) en al menos uno de los análisis derivados de las tres matrices de datos estudiadas. Sería el caso de las agrupaciones genéricas pertenecientes a la subtribu Timarchina (*sensu* Seeno y Wilcox, 1982; Daccordi, 1994) o tribu Timarchini (*sensu* Reid, 2002) (figura 4.1-18 - "clado A), tribu Chrysomelini (*sensu* Reid, 2002; Kippenberg, 2010) ("clado C") y subtribu Chrysolinina (*sensu* Daccordi, 1994; "clado D"). Los géneros de las tribus Goniocetenini y Phyllocharitini (ambas *sensu* Reid, 2002) a excepción de *Aphilon* se recuperaron como un linaje monofilético soportado ("clado E"). En cuanto a las relaciones filogenéticas entre las tribus, Timarchini (*sensu* Reid 2002) se recuperó como hermana del resto de Chrysomelinae, y entre estos últimos la tribu Chrysomelini (*sensu* Reid, 2002) representó el linaje hermano de las otras tres tribus, Doryphorini (*sensu* Kippenberg, 2010), Goniocetenini (*sensu* Reid, 2002) y Phyllocharitini (*sensu* Reid, 2002). Entre estas últimas, Doryphorini se obtuvo como hermana del clado con las otras dos. El test AU para la evaluación estadística de hipótesis filogenéticas alternativas rechazó la monofilia de la mayoría de las restantes agrupaciones supragenéricas propuestas para la subfamilia Chrysomelinae (Tabla 4.1-12). Las excepciones fueron la tribu Phyllocharini de Weise (1916), y las subtribus Doryphorina y Phyllocharina de Seeno y Wilcox (1982).

La recuperación de monofilia para las especies de los géneros de Chrysomelinae no monotípicos y con más de una especie en el muestreo para cada una de las matrices analizadas se resume en la tabla 4.1-13. En general, la mayoría de estos géneros se recuperaron como entidades monofiléticas con soporte estadístico, si bien se detectaron algunos casos de parafilia en relación a las especies de *Callidemum* (por inclusión de las especies de *Calomela* y por la ubicación divergente de *Callidemum hypochalceum*), *Calomela* (por inclusión de *Callidemum limbatum*), *Paropsis* (por inclusión de *Paropsisterna semifumata*, *Paropsisterna aff. intertincta* WA2 y *Paropsisterna sp. 1*) y *Chrysolina* (por inclusión de *Crosita*). Los casos de polifilia afectaron a los géneros *Callidemum*, *Chalcolampra*, *Chalcomela*,

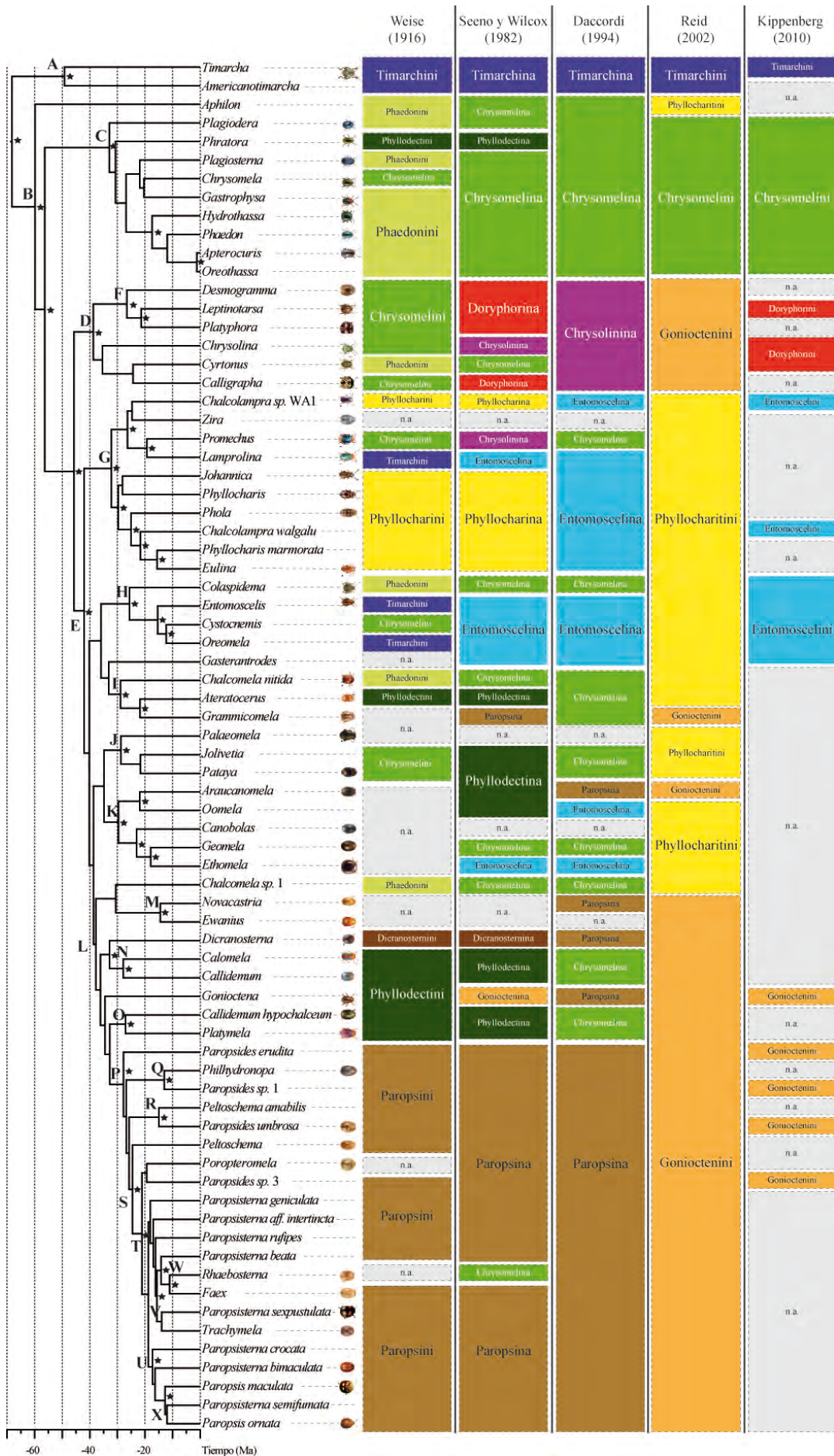


Figura 4.1-18. Cladograma derivado del árbol bayesiano de la "matriz-245" donde se han podido especies terminales hasta obtener la topología a nivel de géneros. Se han respetado aquellas especies que por su posición filogenética podrían representar líneas evolutivas diferentes de los géneros a los que actualmente se adscriben. Las figuras en forma de estrella identifican aquellos nodos soportados por valores de probabilidad posterior y/o de bootstrap en al menos uno de los análisis realizados a partir de las tres matrices (99, 245 y 273). Las columnas de la derecha se corresponden con cinco de las clasificaciones tribales más relevantes publicadas para Chrysomelinae.

Hipótesis sistemática	Autoría	Test AU
Tribu Chrysomelini	Weise (1916)	<b>5·10<sup>-61</sup></b>
Tribu Dicranosternini	Weise (1916)	<b>6·10<sup>-75</sup></b>
Tribu Paropsini	Weise (1916)	<b>5·10<sup>-5</sup></b>
Tribu Phaedonini	Weise (1916)	<b>2·10<sup>-34</sup></b>
Tribu Phyllocharini	Weise (1916)	0,263
Tribu Phyllodectini	Weise (1916)	<b>2·10<sup>-5</sup></b>
Tribu Timarchini	Weise (1916)	<b>3·10<sup>-7</sup></b>
Subtribu Chrysolinina	Seeno y Wilcox (1982)	<b>8·10<sup>-7</sup></b>
Subtribu Chrysomelina	Seeno y Wilcox (1982)	<b>4·10<sup>-88</sup></b>
Subtribu Dicranosternina	Seeno y Wilcox (1982)	<b>6·10<sup>-75</sup></b>
Subtribu Doryphorina	Seeno y Wilcox (1982)	0,519
Subtribu Entomoscelina	Seeno y Wilcox (1982)	<b>0,001</b>
Subtribu Paropsina	Seeno y Wilcox (1982)	<b>0,003</b>
Subtribu Phyllocharina	Seeno y Wilcox (1982)	0,263
Subtribu Phyllodectina	Seeno y Wilcox (1982)	<b>1·10<sup>-55</sup></b>
Subtribu Chrysomelina	Daccordi (1994)	<b>2·10<sup>-94</sup></b>
Subtribu Entomoscelina	Daccordi (1994)	<b>0,001</b>
Subtribu Paropsina	Daccordi (1994)	<b>5·10<sup>-6</sup></b>
Tribu Goniocetenini	Reid (2002)	<b>3·10<sup>-4</sup></b>
Tribu Phyllocharitini	Reid (2002)	<b>0,011</b>
Clados G,H,I,J,K monofiléticos		0,615
<i>Aphilon</i> y Clado A monofiléticos		<b>0,024</b>
<i>Aphilon</i> y Clado C monofiléticos		0,072
<i>Aphilon</i> y Clado D monofiléticos		<b>0,014</b>
<i>Aphilon</i> y Clado E monofiléticos		<b>0,010</b>
Gasterantrodes y Clado K monofiléticos	Daccordi (1994)	0,553

**Tabla 4.1-12.** Resultados de la evaluación de hipótesis filogenéticas alternativas a nivel supragenérico mediante el test *Approximately Unbiased* (test AU; Shimodaira, 2000). Los valores estadísticamente significativos se marcan en negrita. Los clados referidos en la tabla se corresponden con los representados en el árbol filogenético de la figura 4.1-18.

*Paropsides*, *Peltoschema*, *Phyllocharis*, *Paropsisterna*, *Hydrothassa*, *Plagiodera* y *Plagiosterna*, sin soporte en los tres últimos. Los resultados del test AU para evaluar la monofilia de los mencionados géneros recuperados como parafiléticos y/o polifléticos en nuestros análisis se resumen en la tabla 4.1-14. De los mismos se desprende que no es posible rechazar la monofilia de las especies de los géneros *Calomela*, *Chalcomela*, *Hydrothassa*, *Paropsis*, *Phyllocharis*, *Plagiodera* y *Plagiosterna*, mientras que si se rechaza la monofilia de los géneros *Callidemum*, *Chalcolampra*, *Chrysolina*, *Paropsides*, *Paropsisterna* y *Peltoschema*.



	Matriz combinada		
	99	245	273
<b>Callidemum</b>	▲*	■	■
<i>Calligrapha</i>		★	★
<b>Calomela</b>	☆	▲	▲
<b>Chalcolampra</b>		■	■
<b>Chalcomela</b>		□	■
<i>Chrysolina</i>		△	△
<b>Dicranosterna</b>	★	★	★
<b>Ethomela</b>	★	★	★
<b>Eulina</b>	★	☆	☆
<b>Faex</b>	★	★	★
<i>Gastrophysa</i>			★
<b>Geomela</b>		★	☆
<i>Gonioctena</i>		★	★
<i>Hydrothassa</i>		△	□
<b>Lamprolina</b>	★	★	★
<b>Oomela</b>		★	★
<b>Palaeomela</b>	★	★	★
<b>Paropsides</b>	■	■	■
<b>Paropsis</b>	△	△	△
<b>Paropsisterna</b>	▲	▲	△
<b>Peltoschema</b>	■**	□	□
<b>Phola</b>		★	★
<b>Phyllocharis</b>		■	□
<i>Plagiodera</i>		△	△
<i>Plagiosterna</i>		□	□
<b>Platymela</b>	★	★	★
<i>Platyphora</i>		★	★
<i>Timarcha</i>	★	★	★
<b>Trachymela</b>	★	☆	☆

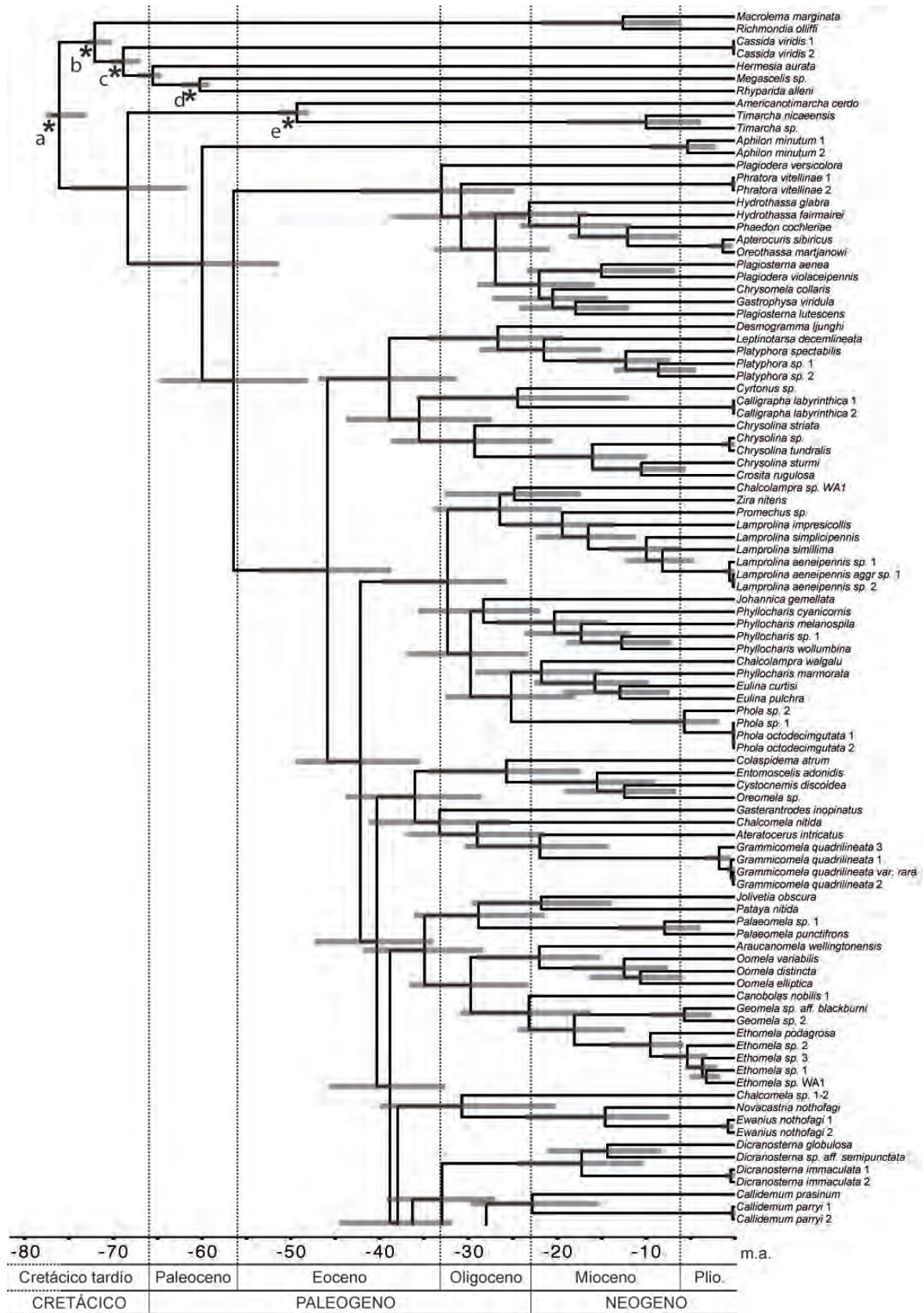
**Tabla 4.1-13.** Resumen de las relaciones filogenéticas recuperadas a partir de cada una de las tres matrices de marcadores moleculares combinados para los géneros de Chrysomelinae con dos o más especies incluidas en el análisis. Los géneros australianos se destacan en negrita a excepción de *Plagiodera*, el cual no cuenta con ninguna especie Australiana en el muestreo. Los símbolos con forma de estrella indican grupos monofiléticos, los triángulos parafiléticos y los cuadrados polifiléticos. El relleno de color negro de las figuras geométricas indica que la relación obtenida está soportada por valores de bootstrap y/o de probabilidad posterior. \* = *C. hypochalceum* no incluido en el conjunto de datos; \*\* = *P. amabilis* no incluido en el conjunto de datos.

Hipótesis sistemática	Test AU
<i>Callidemum</i> monofilético	<b>8·10<sup>-7</sup></b>
<i>Callidemum</i> monofilético excluyendo <i>C. hypochalceum</i>	<b>0,031</b>
<i>Calomela</i> monofilético	0,396
<i>Chalcolampra</i> monofilético	<b>0,009</b>
<i>Chalcomela</i> monofilético	0,346
<i>Chrysolina</i> monofilético	<b>0,029</b>
<i>Hydrothassa</i> monofilético	0,152
<i>Paropsides</i> monofilético	<b>4·10<sup>-39</sup></b>
<i>Paropsis</i> monofilético	0,314
<i>Paropsisterna</i> monofilético	<b>0,004</b>
<i>Peltoschema</i> monofilético	<b>0,02</b>
<i>Phyllocharis</i> monofilético	0,464
<i>Plagiodes</i> monofilético	0,64
<i>Plagiosterna</i> monofilético	0,543

**Tabla 4.1-14.** Resultados de la evaluación de hipótesis filogenéticas alternativas a nivel intragenérico mediante el test *Approximately Unbiased* (test AU; Shimodaira, 2000). Los valores estadísticamente significativos se marcan en negrita.

#### 4.1.4.4.- Reloj molecular, distribución de la señal filogenética y tiempos de divergencia

La figura 4.1-19 muestra el cronograma obtenido en BEAST con la edad de los nodos y su intervalo de confianza del 95% (IC-95%). Los tamaños efectivos de muestra fueron lo suficientemente elevados en la mayoría de los casos (ESS > 200), garantizando una buena estima de la distribución posterior de los parámetros (Drummond *et al.*, 2006). El valor medio de las tasas de sustitución mitocondrial (*cox1* + *rrnL*) por rama y por millón de años fue de 0,0119, equivalente a una divergencia media entre linajes de 2,37%/Ma. Dicha tasa es muy similar a la tasa estándar del 2,3%/Ma estimada para artrópodos (Brower, 1994; Pons *et al.*, 2010), lo que refuerza nuestro método de calibración y así como los resultados obtenidos en el análisis de datación molecular con BEAST. En el caso de la partición nuclear (LSU + EF1a + CAD), el valor promedio de las tasas de sustitución fue de 0,0077, lo que supone una divergencia media entre linajes de 1,54%/Ma. En ambos casos se obtuvo un valor del estadístico *ucl.d.stdev* próximo a 0,55, y asumimos que para el nivel de divergencia evolutiva estudiado los datos se ajustan mejor a un modelo de reloj relajado (Drummond *et al.*, 2006; Andújar *et al.*, 2014).



**Figura 4.1-19.** Cronograma derivado del análisis filogenético bayesiano con la aplicación de un reloj molecular relajado a partir de la “matriz-245”. El intervalo del 95% de confianza para la edad de los nodos se indica mediante las barras de error de color gris. Los nodos marcados asteriscos se han utilizado para calibrar la filogenia. (Continúa en la siguiente página).

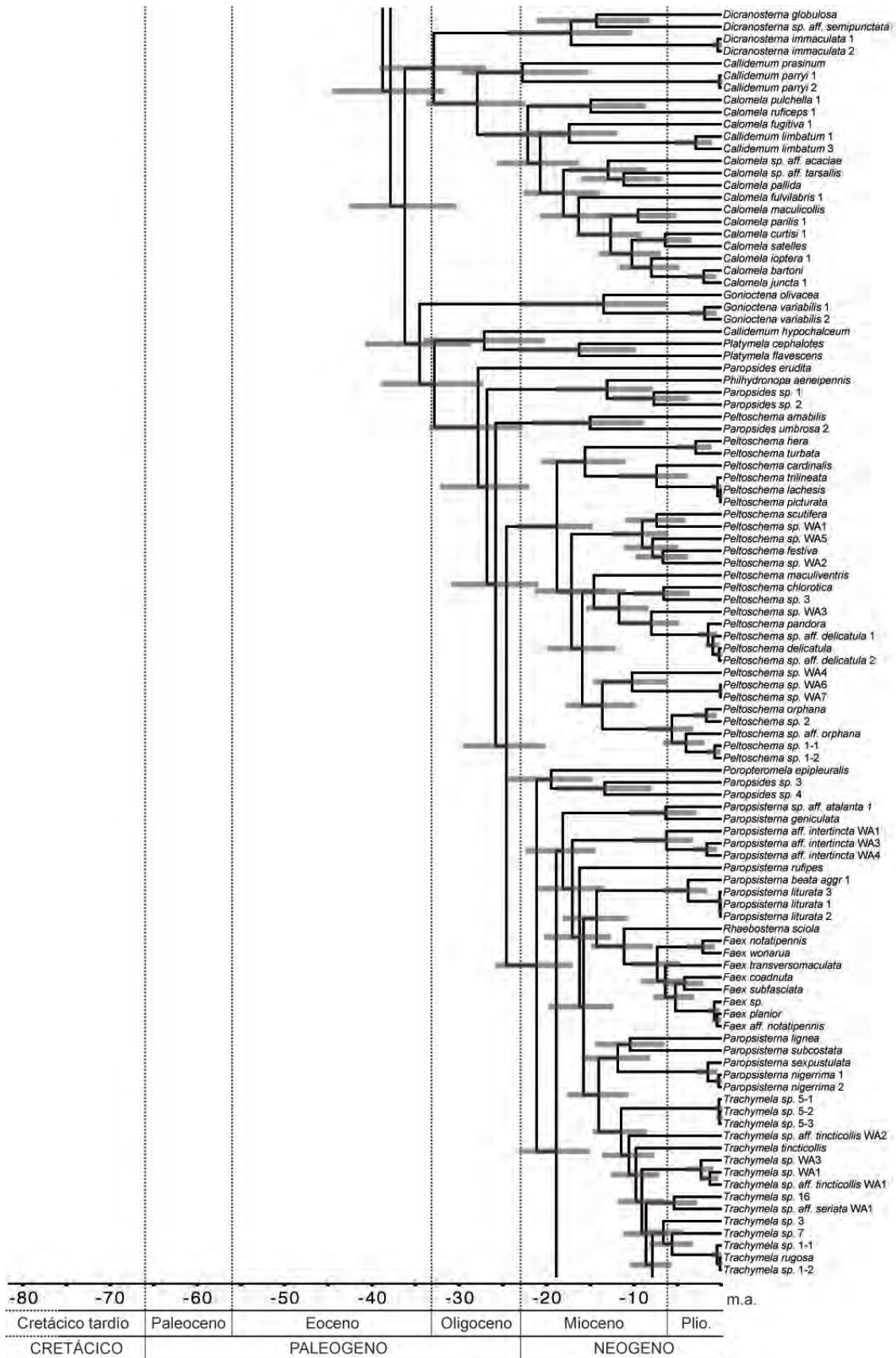


Figura 4.1-19. Continuación.

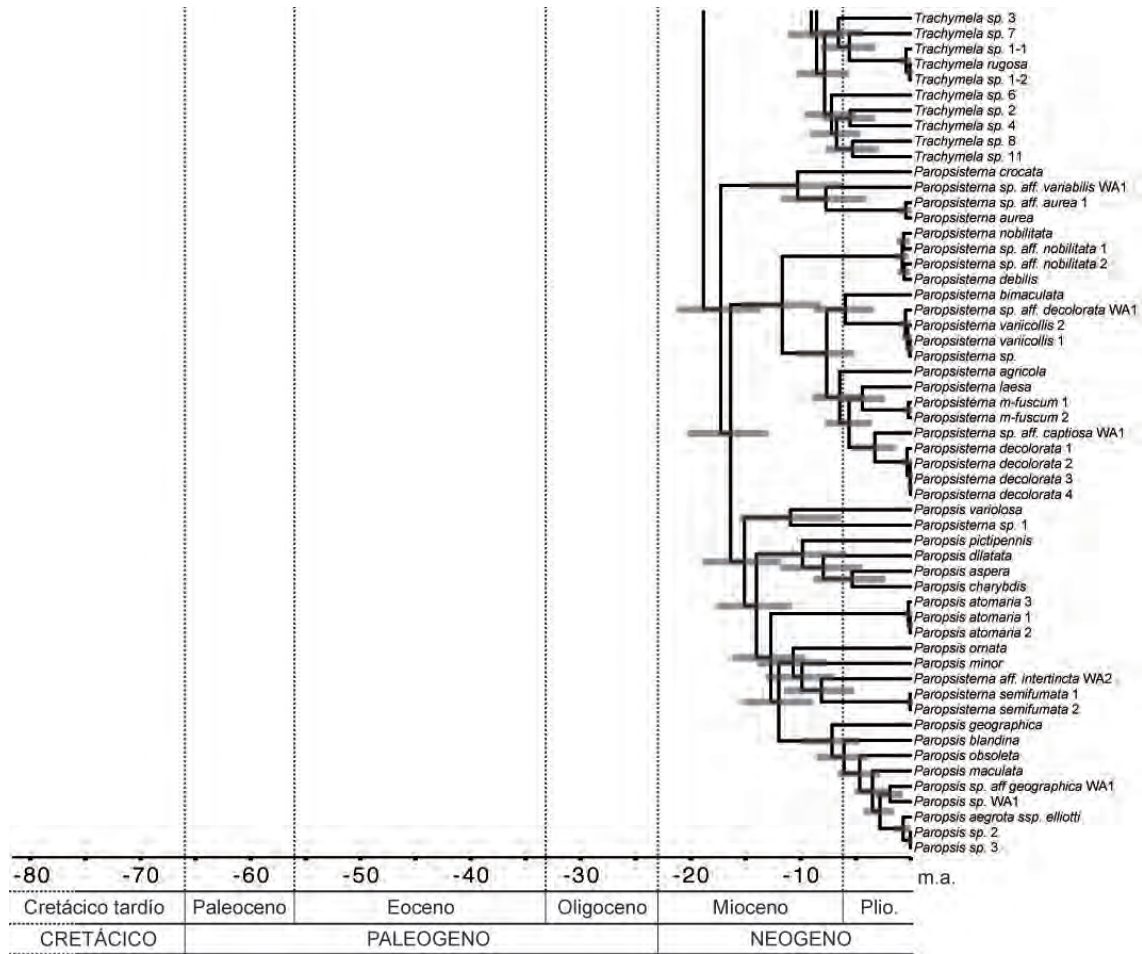
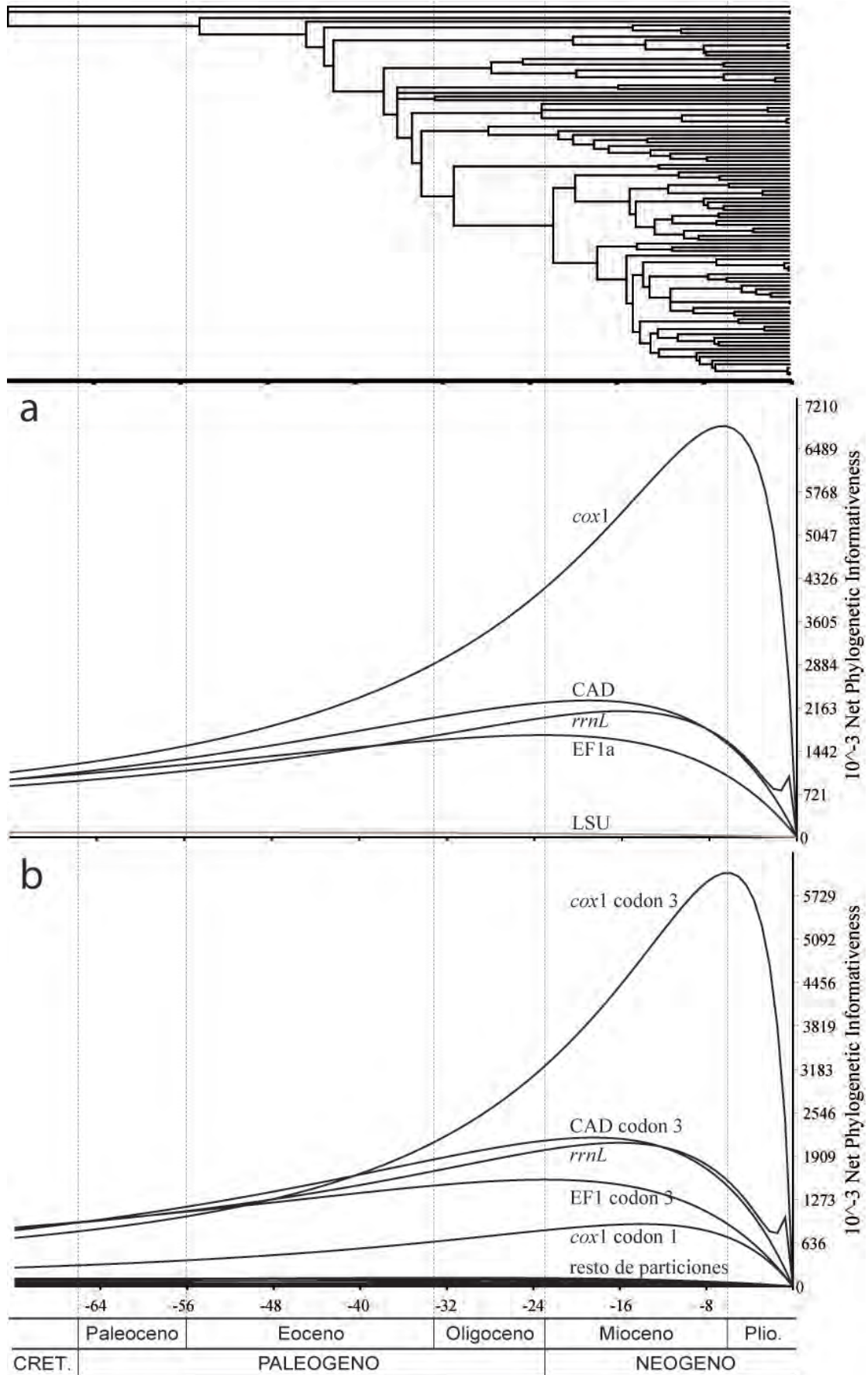


Figura 4.1-19. Continuación.

La información filogenética de cada uno de los marcadores o sus particiones mostró en todos los casos la misma tendencia (Figura 4.1-20), incrementándose la señal desde el reciente hasta alcanzar un pico máximo, a partir del cual decrecía de nuevo hacia la raíz, lo que podría asociarse a la ausencia de caracteres soportando las ramificaciones profundas en el árbol. La mayor intensidad de señal filogenética correspondió al marcador *cox1*, y en particular a sus terceras posiciones de codón, cuyos valores máximos coinciden con finales del Mioceno, en el Messiniense. Por su parte CAD, EF1a, las terceras posiciones de ambos, y *rrnL* mostraron niveles de intensidad de señal muy parecidos entre sí, con máximos respectivos hace 18,7 Ma, 23,02 Ma y 15,83 Ma, aunque en todos estos casos ésta fue sensiblemente inferior a la calculada para *cox1*. La partición LSU y el resto de particiones de los otros marcadores mostraron niveles de señal muy reducidos a lo largo de toda la filogenia.



**Figura 4.1-20.** Perfiles de señal filogenética obtenidos en PhyDesign a partir del cronograma generado por BEAST para (a) cada uno de los cinco marcadores analizados y (b) las once particiones que constituyen el esquema óptimo de partición de los datos.

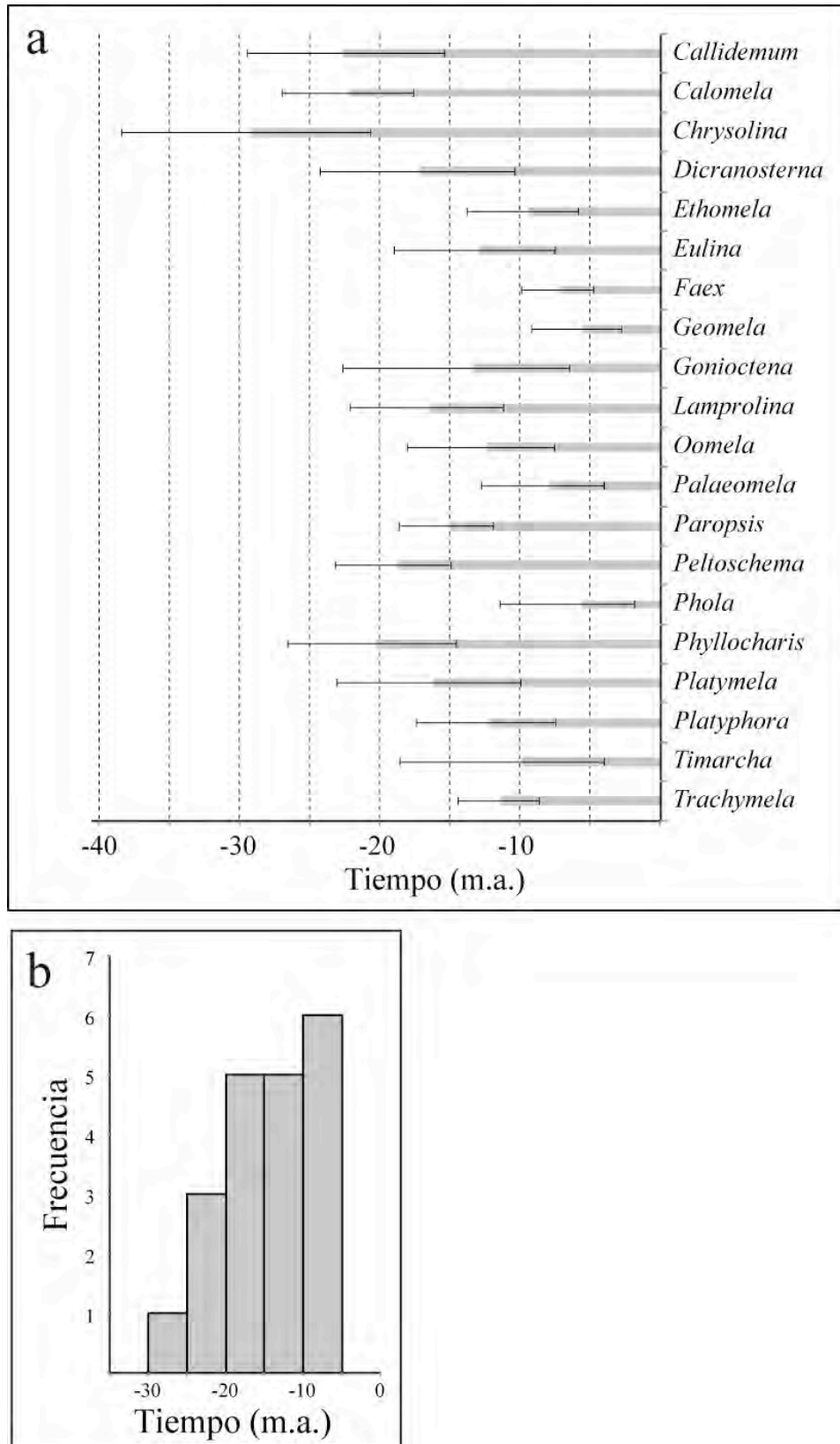
Según los resultados de los análisis de datación, la diversificación inicial de la subfamilia Chrysomelinae tuvo lugar en el periodo de transición del Mesozoico al Cenozoico, hace unos 68 Ma (IC-95% = 74,59 - 61,77). Las edades obtenidas para las tribus de Chrysomelinae se resumen en la tabla 4.1-15., mostrando que el origen de las mismas se remonta al periodo comprendido entre el Eoceno y el Oligoceno medios (hace entre 50 y 30 Ma). Por otro lado, la tabla 4.1-16 describe las edades de los grupos corona para aquellos géneros no monotípicos con dos o más especies representadas en el conjunto de datos. Complementariamente, las gráficas contenidas en la figura 4.1-21 resumen dicha información, ilustrando que el origen del grupo corona para la mayoría de los géneros tuvo lugar a lo largo del Mioceno (entre hace 20 y 5 Ma, aproximadamente).

Tribu	Edad (Ma. desde el presente)
Timarchini ( <i>sensu</i> Reid 2002)	49.18 (51.13-48.00)
Chrysomelini ( <i>sensu</i> Reid 2002)	32.90 (41.94-24.94)
Doryphorini ( <i>sensu</i> Kippenberg, 2010)	38.77 (46.62-31.45)
Phyllocharitini + Gonioceteni ( <i>sensu</i> Reid 2002)	42.04 (49.16-35.54)

**Tabla 4.1-15.** Resumen de las edades obtenidas tras el análisis con BEAST para las tribus de Chrysomelinae recuperadas en la filogenia bayesiana basada en la "matriz-245".

Linaje	Edad en Ma. (Int. conf. 95%)
<i>Callidemum</i> <sup>1</sup>	22.7 (29.45-15.44)
<i>Calomela</i> <sup>2</sup>	22.1 (26.99-17.57)
<i>Chalcolampra</i>	No monofilético
<i>Chalcomela</i>	No monofilético
<i>Chrysolina</i> <sup>3</sup>	29.19 (38.41-20.65)
<i>Dicranosterna</i>	17.13 (24.29-10.39)
<i>Ethomela</i>	9.39 (13.85-5.87)
<i>Eulina</i>	12.81 (19.01-7.46)
<i>Faex</i>	7.25 (10.02-4.81)
<i>Geomela</i>	5.56 (9.22-2.77)
<i>Gonioctena</i>	13.39 (22.7-6.45)
<i>Lamprolina</i>	16.37 (22.09-11.24)
<i>Oomela</i>	12.34 (18.02-7.61)
<i>Palaeomela</i>	7.8 (12.83-4.02)
<i>Paropsides</i>	No monofilético
<i>Paropsis</i> <sup>4</sup>	15.09 (18.64-12.01)
<i>Paropsisterna</i>	No monofilético
<i>Peltoschema</i> <sup>5</sup>	18.75 (23.19-14.93)
<i>Phola</i>	5.56 (11.47-1.86)
<i>Phyllocharis</i> <sup>6</sup>	20.21 (26.6-14.57)
<i>Plagiodes</i>	No monofilético
<i>Plagiosterna</i>	No monofilético
<i>Platymela</i>	16.22 (23.1-9.88)
<i>Platyphora</i>	12.14 (17.46-7.44)
<i>Timarcha</i>	9.88 (18.63-3.96)
<i>Trachymela</i>	11.39 (14.49-8.64)

**Tabla 4.1-16.** Resumen de las edades medias e intervalos de confianza al 95% obtenidas para los géneros no monotípicos con dos o más especies incluidas en el muestreo partir del análisis con BEAST de la matriz 245. <sup>1</sup> excluyendo a *C. hypochalceum* y a *C. limbatum*; <sup>2</sup> en parafilia con *C. limbatum*; <sup>3</sup> en parafilia con *Crosita rugulosa*; <sup>4</sup> en parafilia con *Paropsisterna semifumata* y *P. sp. aff. interincta* WA2; <sup>5</sup> excluyendo a *P. amabilis*; <sup>6</sup> excluyendo a *P. marmorata*.

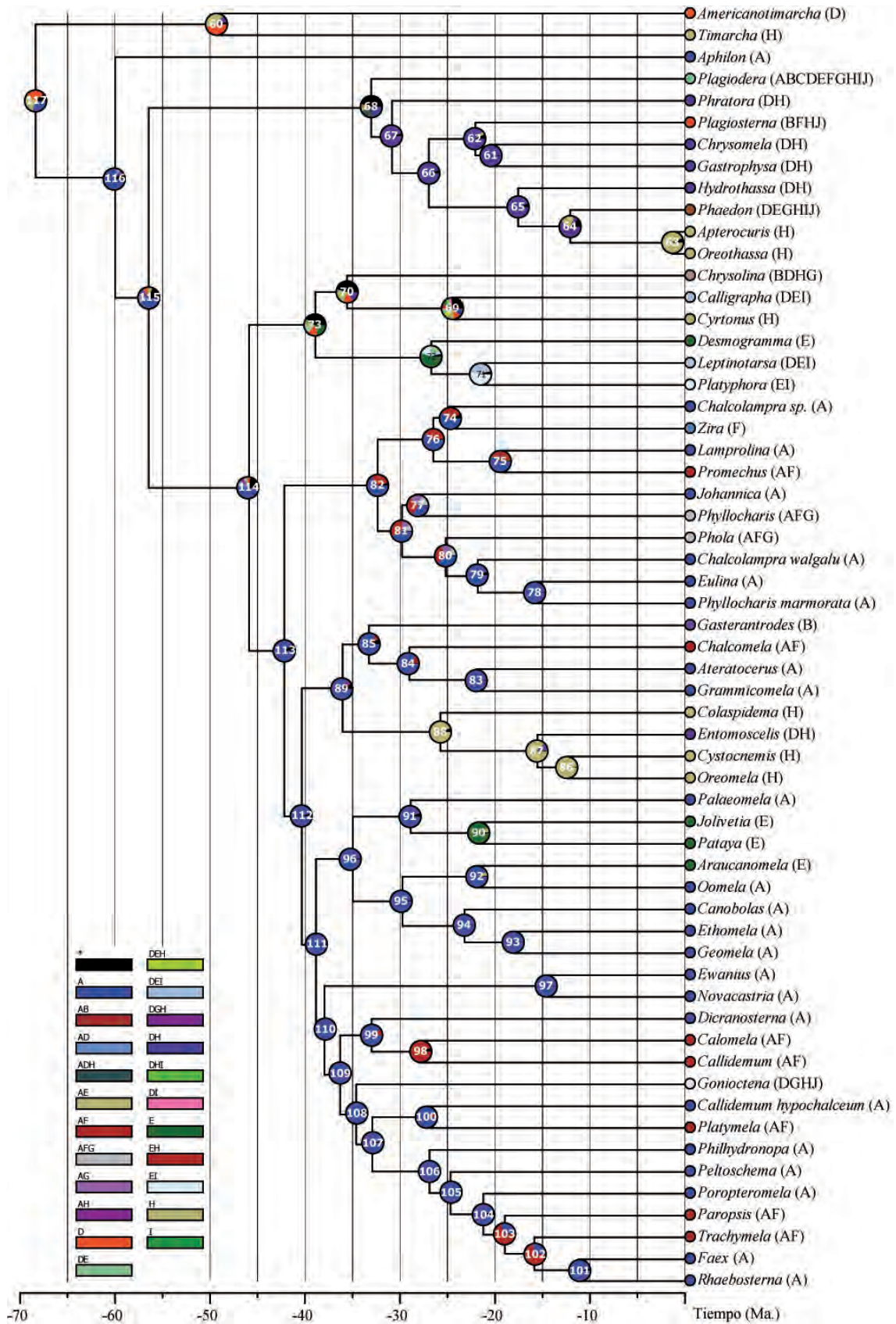


**Figura 4.1-21.** (a) Representación gráfica de las edades medias e intervalos de confianza al 95% obtenidos para los grupos corona de los géneros de Chrysomelinae no monotípicos y con más de una especie presente en la matriz 245. (b) Histograma de frecuencias para las edades medias de los grupos corona.



#### 4.1.4.5.- Análisis biogeográfico

El árbol filogenético con los resultados obtenidos en el análisis de inferencia bayesiana de áreas ancestrales se muestra en la figura 4.1-22. Para la raíz (nodo 117) se recuperaron varias distribuciones ancestrales que indicaron un origen centrado en las regiones Neártica y Paleártica (Laurasia en aquel entonces). Este mismo origen biogeográfico es el que se recuperó también para los géneros integrantes de las tribus Timarchini y Chrysomelini (*sensu* Reid, 2002) (nodos 60 y 68, respectivamente). La distribución ancestral obtenida para la tribu Doryphorini (*sensu* Kippenberg, 2010) recayó en las regiones Neotropical y Neártica (nodo 73), con mayor probabilidad en la primera de ellas. Por otra parte, el área original del ancestro común más reciente entre las tribus Goniocetenini y Phyllocharitini (*sensu* Reid, 2002, partim; nodo 113) resultó estar vinculada a la región australiana, que en aquel entonces formaba parte de la provincia Weddeliana (*sensu* Case, 1989). En el caso de los Chrysomelini (*sensu* Reid, 2002), el origen laurásico adquiere aún más relevancia a partir del nodo 67, es decir, sin considerar al género cosmopolita *Plagioder*a. En cuanto a los géneros de la tribu Doryphorini (*sensu* Kippenberg, 2010), el origen neotropical resultó ser muy probable para el clado conformado por los géneros *Desmogramma*, *Leptinotarsa* y *Platyphora* (nodo 72), mientras que para los géneros *Calligrapha*, *Chrysolina* y *Cyrtonus* se recuperó principalmente como holártico (nodo 70). Todos los subclados de la tribu Phyllocharitini (*sensu* Reid, 2002) recuperados con soporte en nuestro análisis filogenético mostraron un origen centrado en la región Australiana, detectándose cambios sustanciales de distribución geográfica hacia otras masas continentales en clados como el conformado por los géneros *Colaspidema*, *Cystocnemis*, *Entomoscelis* y *Oreomela* (nodo 88, región Paleártica), o como el integrado por *Jolivetia* y *Pataya* (nodo 90, región Neotropical). También se detectaron relaciones con la región Oceánica en los ancestros comunes más recientes de los géneros *Chalcolampra*, *Eulina*, *Johannica*, *Phyllocharis* y *Phola* (nodo 81). Los miembros de la tribu Goniocetenini (*sensu* Reid, 2002) mostraron igualmente una distribución ancestral más probable ubicada en Australia (nodo 110), destacando una conexión con la región Oceánica en el ancestro común más reciente de los géneros *Callidemum* y *Calomela* (nodo 98), así como de los géneros *Faex*, *Paropsis*, *Rhaebosterna* y *Trachymela* (nodo 103).

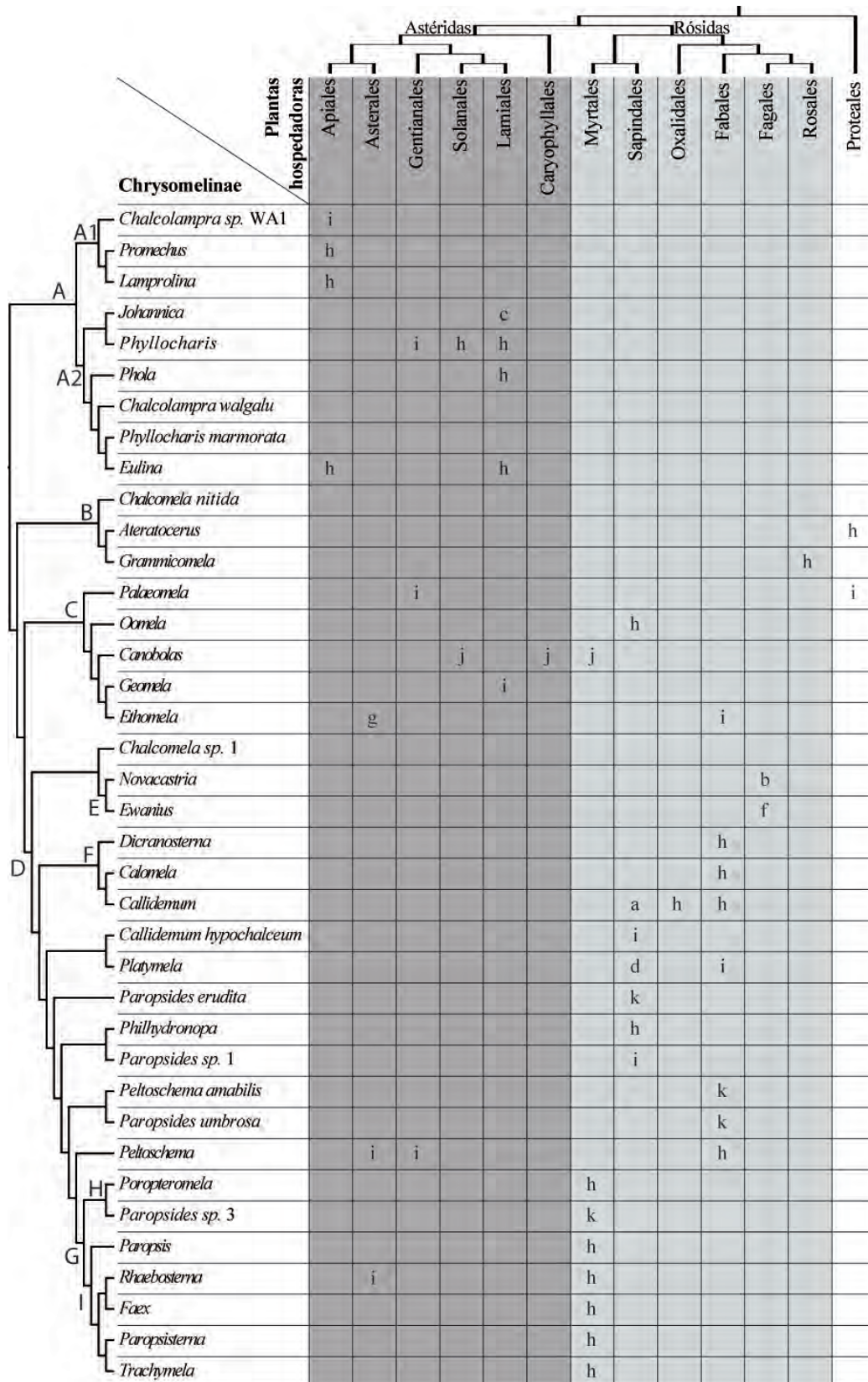


**Figura 4.1-22.** Topología bayesiana datada derivada de la “matriz-245” mostrando las distribuciones ancestrales de cada nodo obtenidas en el análisis biogeográfico BBM ejecutado en RASP. Las porciones de colores que subdividen los círculos asignados a cada nodo representan la probabilidad de cada una de las distribuciones ancestrales alternativas. Las letras mayúsculas en la clave de colores y las que acompañan a los nombres de los taxones en los nodos terminales se refieren a las distribuciones descritas en la figura 4.1-2. El asterisco asociado en la leyenda al color negro es indicativo de otras distribuciones.

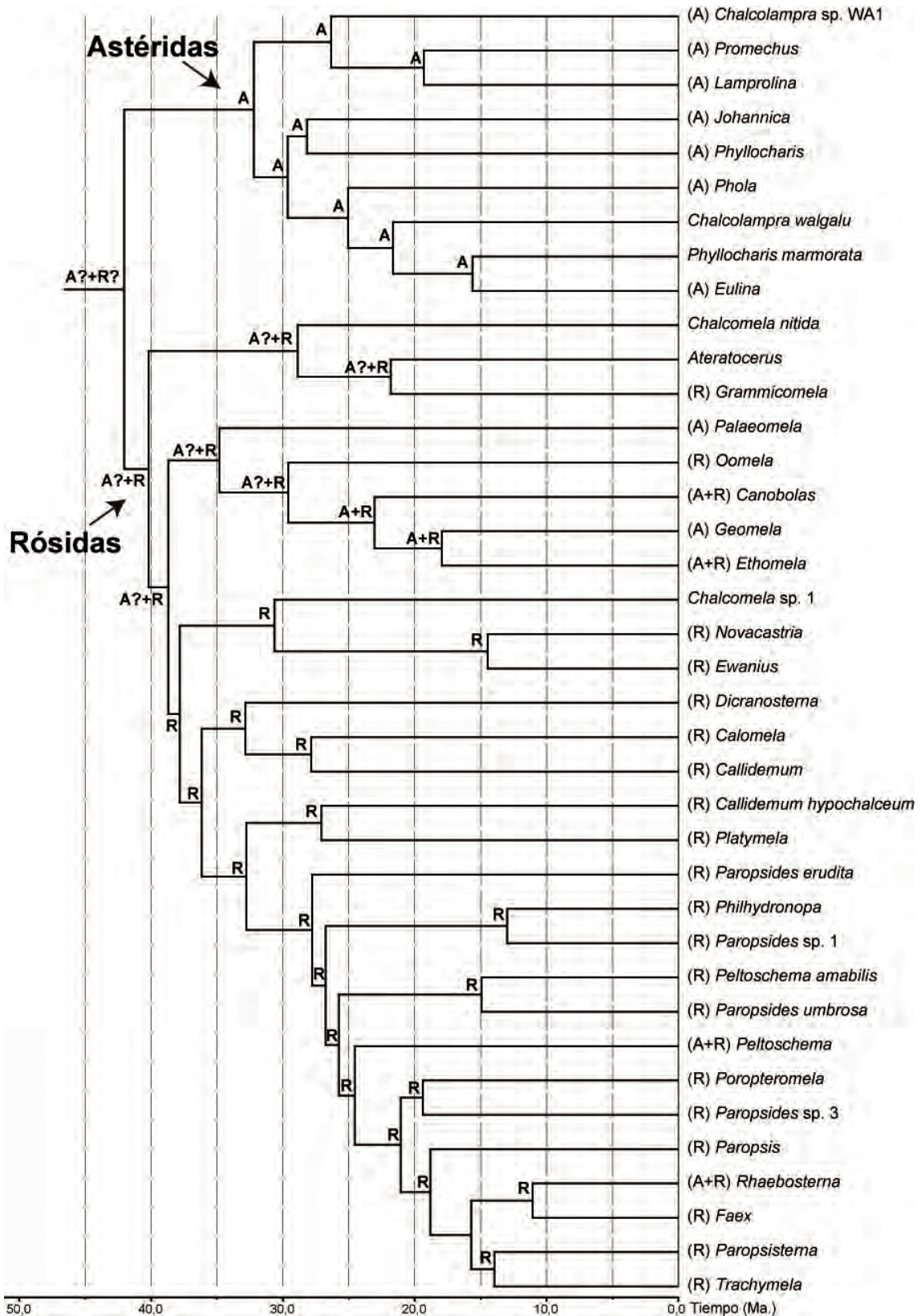
#### 4.1.4.6.- Asociaciones con plantas hospedadoras

Los registros tróficos recopilados para los géneros de crisomelinos australianos aquí estudiados se resumen en la figura 4.1-23. Se obtuvieron citas de hospedadores para todos los géneros, si bien para algunos terminales (*Chalcolampra walgalu*, *Chalcomela nitida*, *Chalcomela sp. 1* y *Phyllocharis marmorata*) no se pudo disponer de la información. Todos los hospedadores pertenecen al grupo de las eudicotiledóneas, diferenciándose dos grupos principales, astéridas y rósidas, aunque también se han detectado citas sobre plantas del orden Proteales (casos de *Ateratocerus* y *Palaeomela*). Los órdenes botánicos que soportan una mayor proporción de asociaciones alimenticias son Fabales (8), Myrtales (8) y Sapindales (7). En general, todos los géneros de crisomelinos analizados tienen un espectro trófico restringido aun solo orden de plantas, aunque existen casos como *Callidemum*, *Canobolas*, *Ethomela*, *Eulina*, *Peltoschema*, *Phyllocharis*, *Platymela* y *Rhaebosterna* donde este rango es más amplio.

La inferencia de los estados ancestrales de las asociaciones alimenticias entre los linajes de crisomelinos australianos y sus plantas hospedadoras se muestra en la figura 4.1-24. El ancestro común más reciente (a.c.m.r) de los géneros *Chalcolampra*, *Eulina*, *Johannica*, *Lamprolina*, *Phola*, *Phyllocharis* y *Promechus* se alimentaba probablemente sobre especies de astéridas, mientras que el a.c.m.r. de los géneros restantes lo hacía sobre rósidas y posiblemente también sobre astéridas. La alimentación sobre rósidas parece clara en el caso del a.c.m.r. de los géneros de gonioceteninos.



**Figura 4.1-23.** Resumen de los registros de hospedadores disponibles para los géneros australianos de Chrysomelinae estudiados. La filogenia de las plantas procede de Angiosperm Phylogeny Group (2009). Los registros tróficos proceden de: (a) Gressitt (1963), (b) Selman (1983), (c) Monteith (1991), (d) Jolivet y Hawkeswood (1995), (e) Hawkeswood y Takizawa (2002), (f) Reid (2002), (g) Daccordi (2003), (h) Reid (2006), (i) Jurado-Rivera et al. (2009), (j) Reid, Jurado-Rivera y Beatson (2009), (k) Observación personal en campo.



**Figura 4.1-24.** Cronograma mostrando la Inferencia de los estados ancestrales bajo el criterio de parsimonia de las asociaciones alimenticias entre los linajes de crisomelinos y sus plantas hospedadoras.

#### 4.1.5.- Discusión

##### 4.1.5.1.- Sistemática de Chrysomelinae

Nuestros resultados constituyen un avance sustancial en la comprensión de esta importante fracción de la biodiversidad que representan los crisomelinos australianos, y sientan las bases para futuras investigaciones sistemáticas. El elevado número de especies no descritas colectadas durante la elaboración de este trabajo, y las inconsistencias de la taxonomía actual desveladas por nuestros análisis destacan el desconocimiento que actualmente se tiene de estos coleópteros. A pesar de este patente desconocimiento, la señal filogenética de los marcadores moleculares aquí utilizados ha permitido la obtención de una hipótesis filogenética para los Chrysomelinae con unos niveles elevados de soporte y resolución, posibilitando la inferencia de los grandes linajes evolutivos que integran la subfamilia y el establecimiento de sus relaciones sistemáticas (Figura 4.1-18). Los árboles obtenidos y los resultados de las pruebas estadísticas AU a nivel supragenérico (Tabla 4.1-12) nos permiten establecer un sistema de clasificación para la subfamilia Chrysomelinae basado en dos tribus, Timarchini y Chrysomelini, correspondientes a los clados "A" y "B" de la Figura 4.1-18, respectivamente. A su vez, en la tribu Chrysomelini se pueden distinguir varios clados monofiléticos que atribuimos a las subtribus Chrysomelina ("Clado C"), Doryphorina ("Clado D"), Phyllocharitina ("Clado G"), Entomoscelina ("Clado H"), y Goniocetenina ("Clado L"), este último sin soporte.

El género endémico de Nueva Zelanda *Aphilon* se recuperó en nuestros análisis en una posición basal muy bien soportada en la filogenia de los Chrysomelinae muestreados, y cuya edad de separación se remonta al periodo entre el Paleoceno y el Eoceno temprano, hace unos 59,8 Ma (IC-95% = 67,9 – 51,4). Históricamente, la posición sistemática de este género ha sido objeto de discrepancia. Daccordi (1994) lo situó entre los Chrysomelini, concretamente en la subtribu Chrysomelina, mientras que Reid (2002) lo consideró como integrante de la tribu Phyllocharitini. La decisión de Reid se basó en la similitud morfológica entre los géneros *Aphilon* y *Geomela*, si bien el propio autor consideró que el parecido podía deberse a una convergencia morfológica relacionada con el reducido tamaño de sus respectivas especies (C.A.M Reid, comunicación personal). En nuestros análisis, los resultados del test AU rechazaron la posible monofilia de *Aphilon* con cualquiera de los principales linajes de nuestra filogenia, a excepción de una asociación con la subtribu Chrysomelina (Tabla 4.1-12), lo que estaría en sintonía con la hipótesis sistemática de

Daccordi (1994). Sin embargo, la posición filogenética divergente altamente soportada de *Aphilon* también sugiere la posibilidad de que constituya un linaje evolutivo primitivo dentro de la subfamilia Chrysomelinae, y para el cual se podría erigir una nueva tribu. Esta propuesta de segregación taxonómica se ve reforzada además por la alimentación sobre hepáticas (Marchantiophyta; Kuschel, 1990; CAM Reid, comunicación personal), tan distinta de la dieta exclusiva sobre angiospermas característica del resto de crisomelinos.

La posición sistemática de la tribu Timarchini (Figura 4.1-18 - "clado A) como grupo hermano del resto de crisomelinos es clara y está bien soportada en nuestros resultados, lo cual es coincidente con todas la hipótesis de organización supragenérica establecidas hasta la fecha para el grupo (Tabla 1-1, página 4), exceptuando a la propuesta de Weise (1916) donde en este grupo se incluyeron géneros como *Entomoscelis*, *Lamprolina* y *Oreomela* cuya monofilia fue rechazada por el test AU (Tabla 4.1-12).

En las concepciones taxonómicas más recientes de Chrysomelinae, los géneros integrantes de la subtribu Chrysomelina han sido un grupo estable y claramente diferenciado, ya sea con rango de tribu (Reid, 2002; Kippenberg, 2010) o de subtribu (Seeno y Wilcox, 1982; Daccordi, 1994; Cox, 1994; Steinhausen, 1998). Nuestra hipótesis molecular coincide con los resultados de Gómez-Zurita *et al.* (2007a), reforzando tal agrupación y situando su origen entre el Eoceno tardío y el Oligoceno, hace 32,9 Ma (IC-95% = 41,9 – 24,9) (Figura 4.1-18 - "clado C"). El único género de esta tribu presente en Australia es el género cosmopolita *Plagiodes* (Reid, 2002), que cuenta en el continente con tres especies nativas (Reid, 2006), ninguna de las cuales ha podido ser incluida en nuestro muestro.

Otro de los grandes linajes reconocible en nuestros árboles se corresponde con la subtribu Doryphorina (Chrysolina *sensu* Daccordi, 1994; tribu Doryphorini *sensu* Kippenberg, 2010; "clado D"). Se trata de un clado bien soportado y estructurado, cuyo origen también dataría entre el Eoceno y el Oligoceno (38,8 Ma, IC-95% = 46,6 – 31,4), y en el cual se puede distinguir un linaje bien soportado estadísticamente e integrado por los géneros *Desmogramma*, *Leptinotarsa* y *Platyphora* ("clado F"). La adscripción de los miembros de este clado junto a los gonioceteninos por parte de Reid (2002) no se sostiene en nuestros resultados (Tabla 4.1-12). La parafilia soportada por los resultados del test AU de las 11 especies estudiadas de *Chrysolina* por inclusión de *Crosita rugulosa* (Tabla 4.1-14) es congruente con la propuesta taxonómica de

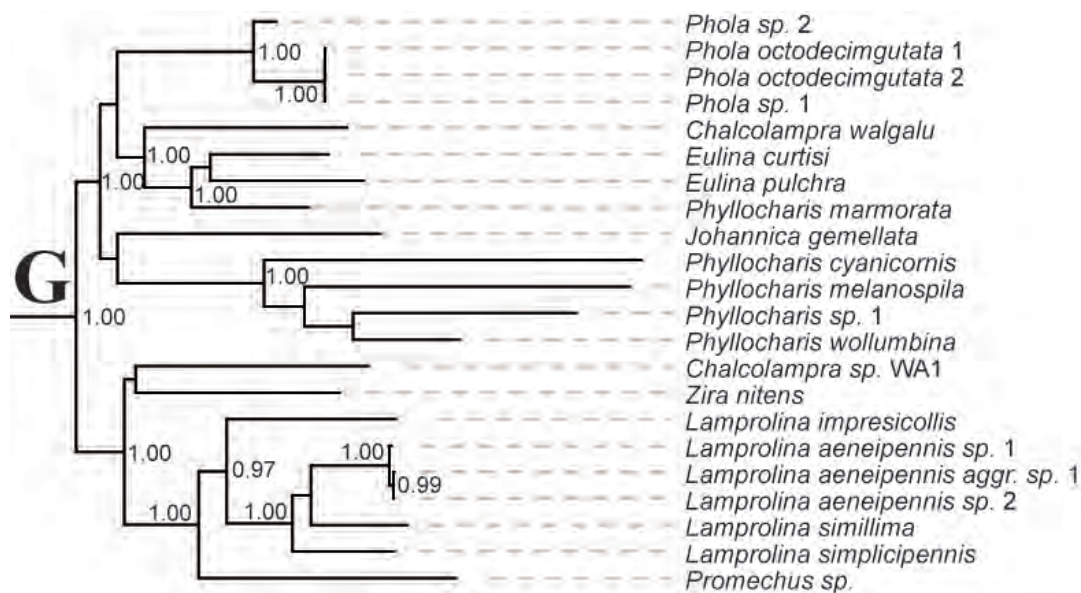
Daccordi (1994). El único carácter discriminatorio entre dichos géneros es la presencia del ápice del tercer tarsómero fuertemente hendido en el caso de las especies de *Crosita* (Bienkowski, 2004, 2007), algo que a la luz de nuestra filogenia puede ser interpretado sencillamente como una autoapomorfía de uno de los linajes que contiene el género *Chrysolina*.

Los miembros de los clados G, H, I, J y K, considerados por Reid (2002) como integrantes de la tribu Phyllocharitini (exceptuando *Araucanomela* y *Grammicomela*), se recuperaron en nuestros análisis moleculares como una gradación parafilética no soportada de linajes, si bien los resultados del AU test no permiten rechazar la posible monofilia recíproca de los mismos (Tabla 4.1-12). A pesar de todo ello, la señal filogenética de los marcadores moleculares estudiados sí que permite la delimitación de grandes agrupaciones de géneros a los que otorgamos categoría de subtribu y el reconocimiento de sus respectivos patrones cladogenéticos.

En relación con la subtribu Phyllocharitina (“clado G”), nuestros resultados son congruentes con las asociaciones morfológicas postuladas por Reid (2006), donde reconoce el “grupo de géneros de *Phyllocharis*”. Este grupo relaciona, como en nuestros análisis moleculares, a los géneros *Chalcolampra*, *Eulina*, *Johannica*, *Lamprolina*, *Phola*, *Phyllocharis*, *Promechus* y *Zira* (Figura 4.1-25). El género *Phola* fue sinonimizado con *Chalcolampra* por Daccordi (1994), y posteriormente restablecido por Reid (2006) bajo la observación de que su reconocimiento podría provocar la parafilia de *Chalcolampra* o de *Phyllocharis*. Nuestros resultados mostraron a las dos especies de *Phola* incluidas en el muestreo como un grupo cohesionado y bien diferenciado, cuya ubicación no tiene relación con la parafilia de *Chalcolampra* ni la de *Phyllocharis*, de los cuales divergió hace más de 25 Ma. La parafilia recuperada en nuestros análisis para las respectivas especies de estos dos últimos géneros se ve reforzada por los resultados del test AU únicamente en el caso de *Chalcolampra* (Tabla 4.1-14), lo que está en sintonía con la imposibilidad de reconocer una apomorfía para el conjunto de las especies actualmente incluidas en el género (Reid, 2006). En nuestros resultados la especie *C. walgalu* se recuperó muy próxima a las especies de *Eulina*, *Johannica*, *Phola* y *Phyllocharis*, con las que integró un clado soportado. Por otro lado, la especie *Chalcolampra* sp. WA1 está estrechamente relacionada con el clado de *Lamprolina*, *Promechus* y *Zira*. La sugerencia de Reid (2006) de que *Chalcolampra* y *Phyllocharis* quizás deberían ponerse en sinonimia no se ve soportada en nuestros análisis. Todos estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de una revisión taxonómica de los límites del género *Chalcolampra*. El



género *Phyllocharis*, está representado en nuestra muestra por cinco especies. Cuatro de ellas, entre las que se encuentra la especie tipo *P. cyanicornis*, conformaron un clado monofilético soportado. Por otro lado, la especie *P. marmorata* mostró una posición filogenética soportada lejana del resto de especies congénéricas y se recuperó muy próxima y soportada junto a las dos especies de *Eulina* analizadas. Sin embargo, los resultados obtenidos en el test AU no permitieron descartar la posible monofilia de las especies de *Phyllocharis* (Tabla 4.1-14). Por otro lado cabe señalar que la especie *P. wollumbina*, que fue inicialmente descrita por Daccordi (2003a) como *Oomela wollumbina* y posteriormente transferida al género *Phyllocharis* por Reid (2006), se recuperó en nuestros análisis en el clado de *P. cyanicornis*. En relación a *Johannica*, Reid (2006) señaló que su reconocimiento podría implicar la parafilia de *Eulina*. Nuestros resultados no soportan esta hipótesis puesto que *Eulina* se recuperó en un clado bien diferenciado del de *Johannica* con una edad media de separación entre ambos estimada en 29,7 Ma (IC95% = 36,7 – 23,4). Otra hipótesis de Reid (2006) es que el género *Lamprolina* pudiera ser parafilético por incluir a *Promechus*. Nuestros resultados muestran ambos géneros como grupos hermanos con una divergencia media de 19,3 Ma (IC95% = 25,6 – 13,6), aunque no podemos descartar la parafilia de *Lamprolina* dado que nuestro muestreo incluye únicamente a cuatro de las 14 especies de este género. Jolivet y Verma (2008) situaron al género *Zira* entre los Dicranosternini Weise, hipótesis que nuestros resultados contradicen, ya que aparece claramente anidado dentro del “grupo de géneros de *Phyllocharis*” referido por Reid (2006).



**Figura 4.1-25.** Subclado extraído del árbol bayesiano basado en la “matriz-245” ilustrando en detalle las relaciones filogenéticas del “clado F” (ver texto principal).

El "clado H" podría asociarse con la subtribu Entomoscelina, ya que contiene a los géneros *Colaspidema*, *Cystocnemis*, *Entomoscelis* y *Oreomela*, previamente asimilados a esa agrupación supragenérica. El origen de este clado se remontaría al periodo entre el Oligoceno y el Mioceno temprano, hace unos 25,6 Ma (IC-95% = 34,3 – 17,5). Nuestros resultados son consistentes con el consenso entre la mayoría de autores para clasificarlos en una posición cercana a los "phyllocharitinos" (e.g., Kippenberg en Löbl y Smetana, 2010), y se oponen a la propuesta de incluir *Colaspidema* como integrante de la subtribu Chrysomelina (Daccordi, 1994). Esto último ya se había criticado según el estudio bioquímico de las secreciones defensivas producidas por los Chrysomelinae (Pasteels *et al.*, 2000). En una posición muy próxima al "clado H" se ubica el "clado I", que incluye a los géneros *Ateratocerus*, *Grammicomela* y a la especie *Chalcomela nitida*, considerados previamente como integrantes de la subtribu Chrysomelina por Daccordi (1994). Nuestros resultados rechazan esta decisión taxonómica y la proximidad de estos géneros a la subtribu Chrysomelina ("clado C"), y tampoco soportan la relación con el "grupo de géneros de *Phyllocharis*", propuesta a partir de la observación de una similitud morfológica entre *Ateratocerus* y estos géneros (Reid, 2006). La posición sistemática obtenida para *Grammicomela* es quizás la más controvertida, pues a diferencia de los otros integrantes de este clado, ha sido tratada como Goniocetenini (Reid, 2002) y más específicamente como una morfología especial del goniocetenino *Callidemum* (Reid, 2006). Nuestras inferencias filogenéticas descartan claramente dicha posibilidad. Por otro lado, nuestros datos sí confirman la sinonimia establecida por Reid (2006) de *Stethomela rara* Lea, 1916, presente en nuestro muestreo, como una variedad de élitros oscuros de *G. quadrilineata* Lea, 1916, pues nuestras cuatro especies de *Grammicomela* conforman un grupo monofilético bien soportado. El género *Chalcomela* resulta polifilético en nuestros análisis, con *C. nitida* en una posición soportada como hermana del par *Ateratocerus*-*Grammicomela* (p.ej., en el análisis bayesiano basado en la "matriz-273") y *Chalcomela* sp. 1 como hermana, aunque sin soporte, del par *Ewanius*-*Novacastria*. Sin embargo, el resultado del test AU demostró que no existen evidencias para rechazar la monofilia recíproca de ambos taxones (Tabla 4.1-14). En consonancia, el examen morfológico detallado de ambas especies de *Chalcomela* demostró que comparten caracteres diagnósticos definitorios del género como son palpos, pronoto, hipómero, ventritos torácicos, élitros, patas incluyendo uñas, ventritos abdominales y genitalia de ambos sexos (CAM Reid, comunicación personal). En cuanto a la posición sistemática de *Chalcomela*, el árbol óptimo obtenido en el análisis de máxima verosimilitud en el que se forzó su monofilia las ubicó en la subtribu Entomoscelina (árbol no mostrado). Esta posición es coherente

además con la existencia de caracteres morfológicos larvarios compartidos por *Chalcomela* y la subtribu Entomoscelina, como son la presencia de pseudópodos al final del abdomen y la ausencia de glándulas evaginables (CAM Reid, comunicación personal).

Los "clados J y K" tienen un origen claramente gondwánico (Figura 4.1-22) y contienen principalmente especies de pocos milímetros que han perdido su capacidad voladora. El "clado J" incluye al género endémico de Australia *Palaeomela* junto a los géneros *Jolivetia* y *Pataya*, que lo son de Sudamérica. Los géneros *Jolivetia* y *Pataya* habían sido clasificados en la subtribu Chrysomelina por Daccordi (1994), y por su parte, Daccordi y de Little (2003) habían sugerido la estrecha relación entre *Palaeomela* y otros géneros como *Ethomela* y *Brachyhelops*. Ambas hipótesis son rechazadas por nuestros análisis (la "matriz-273" incluye a *Brachyhelops*; Figura 4.1-14). El "clado K" contiene a los géneros *Araucanomela*, *Canobolas*, *Ethomela*, *Geomela* y *Oomela*, el primero endémico de Chile y el resto de Australia. El género monotípico *Araucanomela* se ha vinculado al grupo de los gonioceteninos junto con los géneros también monoespecíficos *Ewanius* y *Novacastria*, con los que comparte una alimentación sobre plantas del género *Nothofagus* (Daccordi, 1994; Reid, 2002; Daccordi y de Little, 2003). Nuestros resultados contradicen dicha ubicación y demuestran una relación soportada con el género *Oomela*. En efecto, el género vicariante *Araucanomela* posee rasgos morfológicos compartidos con los otros miembros de este clado, como son la presencia de *spiculum* en el esternito abdominal VIII, la ausencia de tegmen, o sus palpos maxilares alargados (CAM Reid, comunicación personal). La divergencia de *Araucanomela* con respecto a los gonioceteninos manifestada en nuestros árboles se ve además reforzada por los datos citológicos publicados por Petitpierre y Elgueta (2006, 2012), que demuestran la presencia en este género de un número cromosómico  $2n = 28$  ( $Xy \rho$ ) no compartido con ningún miembro de Goniocetenini (*sensu* Reid, 2002, partim.) y que sin embargo es coincidente con el cariotipo identificado como típico para los seis géneros de Phyllocharitini (*sensu* Reid, 2002, partim.) estudiados desde un punto de vista citogenético, uno de los cuáles (*Jolivetia*) se ha incluido en nuestro estudio. La posición filogenética del género *Canobolas* coincide con la propuesta por los autores en la descripción del género, donde se establece una proximidad morfológica con *Ethomela* y *Geomela* (Reid *et al.*, 2009). El género *Geomela* había sido considerado como miembro de Chrysomelina, junto a *Aphilon* y *Phaedon* (Daccordi, 1994, 1996), pero transferido recientemente al grupo de géneros que Reid (2002) denominó Phyllocharitini (aunque no explícitamente: Reid, 2006 página 69), lo que es coherente

con nuestros resultados moleculares. Por último, como se indicó anteriormente, *Ethomela* no está relacionado con *Brachyhelops*, pero sin embargo la relación con *Gasterantrodes* apuntada también por Daccordi (1994) no puede ser descartada a tenor de los resultados del test AU para evaluar la monofilia recíproca entre *Gasterantrodes* y el "clado K" (Tabla 4.1-12).

El "clado L" se corresponde con la subtribu Gonioctenina, y en el mismo es posible identificar agrupaciones soportadas de géneros relacionados. Un primer grupo, el "clado M", comprende a dos géneros monotípicos estrechamente relacionados, *Ewanius* y *Novacastria*, ambos hipotetizados como de estrecho parentesco desde un punto de vista morfológico (Reid, 2002; Daccordi y de Little, 2003). En nuestra filogenia se recuperaron formando parte de un linaje de divergencia temprana entre los miembros de la subtribu, lo que está en sintonía con la sugerencia de Reid (2002). Daccordi y de Little (2003) coinciden en el carácter primitivo de *Ewanius* y de *Novacastria*, y abogan por una posición sistemática diferente a la de los Paropsina (*sensu* Daccordi, 1994) y a la del complejo de géneros próximos a *Calomela*. Aunque sin soporte, nuestra hipótesis molecular reproduce una situación que podría ser compatible con la propuesta taxonómica de Daccordi y de Little (2003).

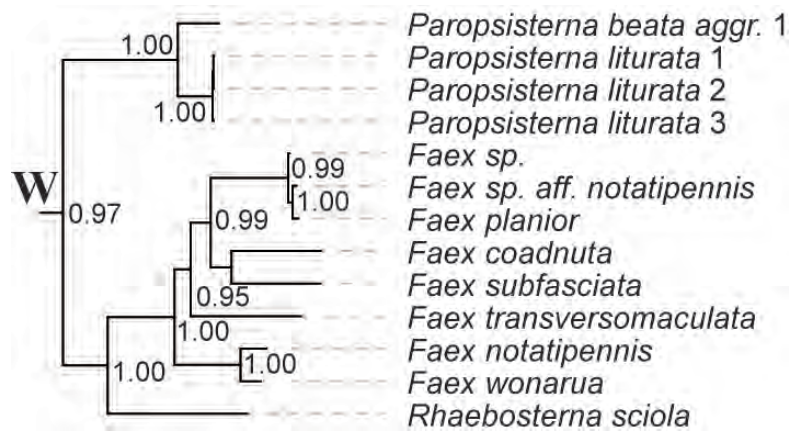
El "clado N" está formado por las especies de los géneros *Callidemum* (exceptuando a *C. hypochalceum*), *Calomela* y *Dicranosterna*. Daccordi (1994) relacionó a los géneros *Callidemum* y *Calomela* con los miembros de la subtribu Chrysomelina, lo cual es rechazado por el resultado del test AU (Tabla 4.1-12). Este mismo test también rechazó la monofilia de *Callidemum*, tanto incluyendo como excluyendo a la especie *C. hypochalceum* de los análisis (Tabla 4.1-14). En relación a *Callidemum*, no se han conseguido reconocer apomorfías morfológicas que lo definan y, por tanto, lo más probable es que sea parafilético (Reid, 2006), como sugieren nuestros análisis. Así, la actual definición de *Callidemum* por Reid (2006), quien propuso la nueva combinación a este género de *Augomela hypochalcea*, generotipo de *Augomela* Baly, 1856, podría ser errónea. De hecho, unas particularidades ecológicas de *C. hypochalceum* que la distinguirían de otros *Callidemum* es que se trata de la única especie de este género que se alimenta de Sapindaceae (*Dodonaea*) y que habita las regiones semi-áridas del sur de Australia, ya que los restantes miembros del género están confinados a los sistemas de *rainforest* y tienen un espectro trófico diferente (Reid, 2006). *C. hypochalceum* se recuperó en una posición monofilética soportada con las especies de *Platymela*, las cuales también se alimentan exclusivamente sobre sapindáceas (Reid, 2006), y sus larvas son muy similares a la

de *C. hypochalceum* (CAM Reid, comunicación personal). Incluso a falta de poder estudiar otras especies de *Augomela*, al haber trabajado con la especie típica, se puede asegurar que los resultados moleculares contradicen la sinonimia de *Augomela* con *Callidemum*, indicando que *Augomela* es un género válido que debería ser restablecido. Otra evidencia que contradice la monofilia de *Callidemum sensu* Reid (2006) tiene que ver con la proximidad filogenética en nuestros resultados de la especie *C. limbatum* con respecto a las especies de *Calomela*, y más concretamente con la especie del linaje basal de este último género, *Calomela fugitiva*. *C. limbatum* es probablemente por tanto una especie de *Calomela*, lo cual sería coherente también desde un punto de vista morfológico puesto que la larva de *C. limbatum* es muy similar a la de las especies de *Calomela* (CAM Reid, comunicación personal). El género *Dicranosterna* fue incluido junto con *Sterromela* en la tribu Dicranosternini por Weise (1916) y en la subtribu Dicranosternina por Seeno y Wilcox (1982). Nuestros resultados del test AU demuestran que la monofilia recíproca de ambos géneros puede ser rechazada (Tabla 4.1-12).

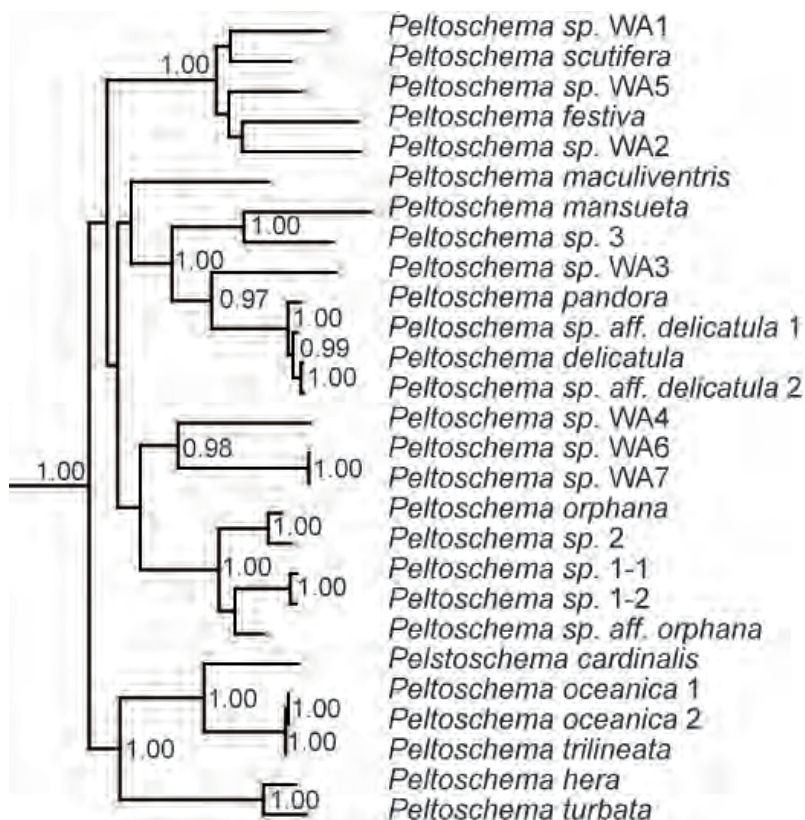
El “clado P” está integrado por las especies de los géneros *Faex*, *Paropsides*, *Paropsis*, *Paropsisterna*, *Peltoschema*, *Philhydronopa*, *Poropteromela*, *Rhaebosterna* y *Trachymela*, todos ellos considerados gonioceteninos en las propuestas taxonómicas más recientes. Se trata de un grupo muy diversificado donde cuatro de sus géneros (*Paropsis*, *Paropsisterna*, *Peltoschema* y *Trachymela*) poseen cada uno más de 70 especies, todas ellas especializadas en fabáceas o mirtáceas (Reid, 2006), y cuya edad media hemos estimado en 27,8 Ma. Dentro de este gran grupo, el “clado S” reúne a los representantes de los géneros *Faex*, *Paropsis*, *Paropsisterna*, *Peltoschema* (excepto *P. amabilis*), *Poropteromela*, *Rhaebosterna* y *Trachymela*, junto a las especies *Paropsides* sp. 3 y *P. sp.* 4. En el mismo se pueden establecer dos linajes soportados. Uno de ellos lo conforman los géneros *Faex*, *Rhaebosterna*, *Trachymela* y dos grupos de especies de *Paropsisterna* que satisfacen la definición genérica de Motschulsky (1860) (“clado V”). El otro linaje está integrado por *Paropsis* y por especies de *Paropsisterna* otrora asignadas a los géneros *Chrysophtharta* y *Xanthogramma* (“clado U”).

En relación al “clado W”, el género *Faex* fue redefinido por Reid (2006) para excluir del mismo al grupo de especies de *Peltoschema* próximas a *P. orphana*. La relación entre dichos taxones fue establecida en Matthews y Reid (2002) en base a la presencia de palas sedosas en los tarsos posteriores de los machos, un carácter inusual en los paropsinos que probablemente constituya una plesiomorfía (Reid,

2006). En nuestra hipótesis molecular el grupo de especies de *Faex* representa una entidad monofilética muy bien resuelta y soportada (Figura 4.1-26), que es independiente del linaje también monofilético y soportado de *Peltoschema* donde se ubica *P. orphana* (Figura 4.1-27). *Rhaebosterna* ha sido clásicamente considerado como un género estrechamente relacionado con *Faex*, hasta el punto de ser sinonimizados (Daccordi, 1994). Nuestros resultados corroboran la existencia de dicha relación. La divergencia genética (distancia p) interespecífica para *Faex* basada en secuencias *cox1* se sitúa en el rango 0,02 – 0,16, el cual solapa con el rango de divergencia entre las especies de *Faex* y *Rhaebosterna*, que es 0,14 - 0,20, indicando que existen especies de *Faex* más divergentes para *cox1* entre sí de lo que lo están en relación a *Rhaebosterna* (e.g. distancia p *F. planior* - *F. subfasciata* = 0,15; *F. planior*- *R. sciola* = 0,14). Aunque *Rhaebosterna* se considera un género válido (Matthews y Reid, 2002; Reid, 2006), nuestros datos moleculares manifiestan que la separación entre este y *Faex* es de carácter lábil. De hecho, *Faex* y *Rhaebosterna* representan el caso de separación genérica más reciente en nuestra muestra, con una edad media de 11,05 Ma.



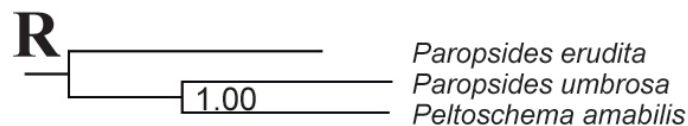
**Figura 4.1-26.** Subclado extraído del árbol bayesiano basado en la "matriz-245" ilustrando en detalle las relaciones filogenéticas del "clado W" (ver texto principal).



**Figura 4.1-27.** Subclado extraído del árbol bayesiano basado en la "matriz-245" ilustrando en detalle las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Peltoschema*.

El género *Paropsides* también se recuperó como integrante del "clado S". Se trata de un género polifilético cuya potencial monofilia es rechazada por el test AU (Tabla 4.1-14), y para el que se pueden diferenciar hasta tres linajes, estando cada uno de ellos especializado en la alimentación sobre una familia botánica diferente. Uno de los linajes agrupa a las especies *P. erudita* y *P. umbrosa* con *Peltoschema amabilis* ("clado R"; Figura 4.1-28), todas ellas con una estrecha relación trófica con la familia botánica Fabaceae. *Paropsides umbrosa* y *Peltoschema amabilis* están estrechamente vinculadas con valores de soporte elevados, lo cual es congruente con su alto grado de similitud morfológica. De hecho, ambas especies se atribuyen a géneros diferentes debido únicamente a la presencia de sedas en los bordes anteriores del pronoto en *Paropsides umbrosa* y a su ausencia en *Peltoschema amabilis*, y sin embargo son muy similares en cuanto respecta a antenas, mentón, palpos, proesterno, mesoventritos, metanepisterno, patas incluyendo las palas sedosas en los tarsos posteriores de los machos y uñas profundamente divididas, patrón de coloración elitral y genitalia de los machos (CAM Reid, comunicación personal). En este punto conviene anotar que *Peltoschema amabilis* es la única especie analizada del género *Peltoschema* que se ubica fuera del clado monofilético y soportado obtenido para las restantes especies (Figura 4.1-27), lo que sumado a su estrecho vínculo con

*Paropsides umbrosa* sugiere la necesidad de una revisión taxonómica para el género. El segundo de los linajes en los que se recuperaron especies de *Paropsides* está especializado en plantas de la familia Sapindaceae, y reúne a las especies *Paropsides* sp. 1 y sp. 2 con *Philhydronopa aeneipennis*. Se trata de un clado muy bien soportado y estructurado (“clado Q”; Figura X: hecha: Detalle\_clado\_Q\_bayes\_245.pdf), y cuya relación ya se reconoció en la propia descripción original de *Philhydronopa*, donde aparecen separados por ligeras diferencias morfológicas relacionadas con el prosterno y los mesoventritos (Weise, 1901). Actualmente se considera que existen caracteres morfológicos consistentes relacionados con la cápsula cefálica y los tarsos de los machos para considerarlos como géneros diferenciados (Reid, 2006). El tercer clado que incluye especies de *Paropsides* es el que agrupa a *Paropsides* sp. 3 y sp. 4 con *Poropteromela epipleuralis*, todos ellos especializados en Myrtaceae de rainforest (“clado S”, Figura 4.1-29). La relación entre estas dos especies de *Paropsides* está muy bien definida mientras que su asociación con *Poropteromela epipleuralis* se recupera en todos los análisis aunque sin valores significativos de soporte. Por otro lado, *Paropsides* y *Poropteromela* muestran similitudes morfológicas relacionadas con la cabeza y sus apéndices, los ventritos torácicos y los tarsos, además de sus larvas (Reid, 2006). La polifilia de *Paropsides* en nuestros análisis ya fue postulada por Reid (2006), y resulta destacable en este caso la importancia de la ecología como característica predictiva de relaciones sistemáticas. Reid (2006) resaltó también la pertenencia de *Paropsides* al grupo de géneros relacionados con *Paropsis*, todos ellos similares en cuanto a estructura y apéndices cefálicos, prosterno, élitros, tarsos y estadios larvarios, agrupación que también queda demostrada en nuestros resultados. Reid (2006) subraya además la inexistencia de sinapomorfías definitorias claras para el género *Paropsides*, definido tan solo por la presencia de sedas en los bordes anteriores del pronoto, un carácter plesiomórfico según el autor.



**Figura 4.1-28.** Subclado extraído del árbol bayesiano basado en la “matriz-273” ilustrando en detalle las relaciones filogenéticas del “clado R” (ver texto principal).

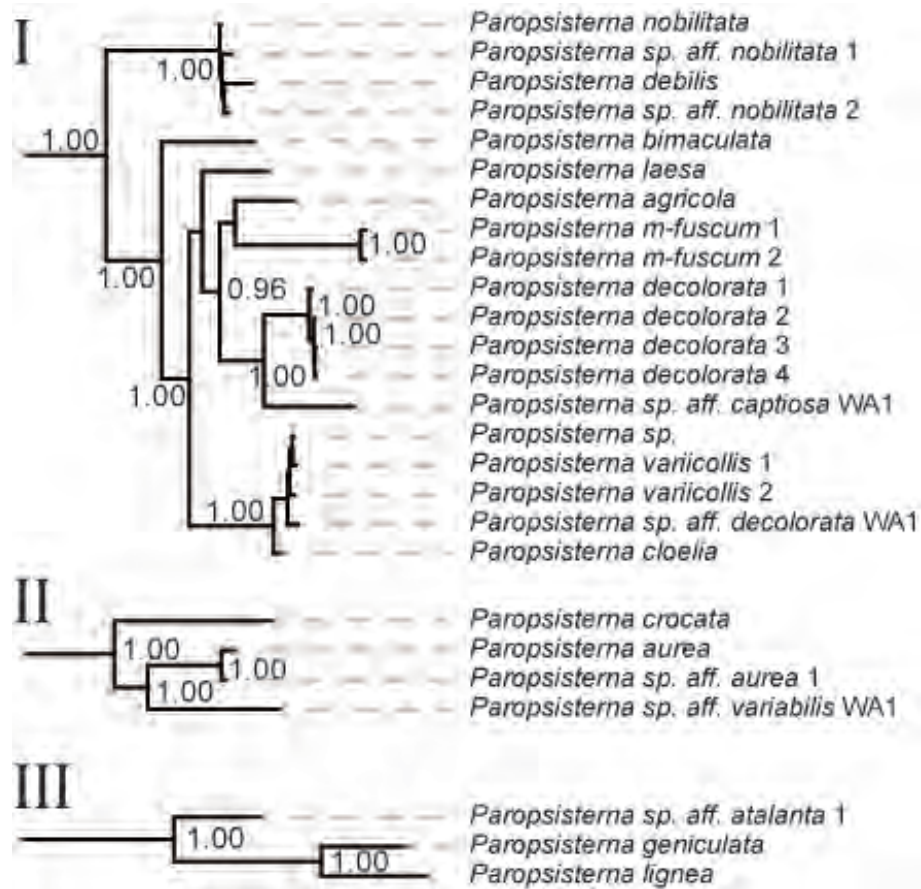




**Figura 4.1-29.** Subclado extraído del árbol bayesiano basado en la "matriz-245" ilustrando en detalle las relaciones filogenéticas entre *Poropteromela epipleuralis* y las especies *Paropsides sp. 1* y *P. sp. 2*.

*Paropsisterna* es sin lugar a dudas el género que más problemas plantea en nuestros resultados ("clado T"). Se trata de un grupo muy numeroso (aproximadamente 110 especies) que recientemente ha sido revisado por Reid (2006) para sinonimizar con él a los géneros *Chrysophtharta* Weise, *Niliosoma* Motschulsky, *Sterromela* Weise y *Xanthogramma* Weise. En nuestro muestreo se han incluido las especies tipo de todos ellos salvo la de *Niliosoma*: *Paropsisterna sexpustulata* (*Paropsisterna*), *P. nobilitata* (*Chrysophtharta*), *P. subcostata* (*Sterromela*) y *P. semifumata* (*Xanthogramma*). El test AU rechazó la monofilia de *Paropsisterna*, si bien los árboles filogenéticos obtenidos permiten identificar subclados soportados de especies. Dichos subclados se corresponden claramente con los grupos de especies anteriormente clasificados bajo las designaciones genéricas de *Chrysophtharta* y *Paropsisterna*. Tres de las agrupaciones de especies de *Paropsisterna* con carácter monofilético y soportado se corresponden con la definición original de *Chrysophtharta* establecida por Weise (1901) (Figura 4.1-30), dos de los cuales (Figura 4.1-30 - I y II) mostraron una relación soportada con las especies del género *Paropsis* ("clado U"). Por otro lado, en nuestros árboles es posible distinguir también dos subclados resueltos y soportados de especies de *Paropsisterna* que encajan en la definición original del género establecida por Motschulsky (1860) (Figura 4.1-31), y que se recuperaron en una posición soportada junto a las especies de los géneros *Faex*, *Trachymela* y *Rhaebosterna* ("clado V"). En los casos de *Sterromela* y *Xanthogramma* no nos fue posible establecer agrupaciones específicas puesto que ambos cuentan con una sola especie en el muestreo (*Xanthogramma* es monotípico), y además la falta de soporte impidió la recuperación de la posición sistemática de *Paropsisterna* (*Sterromela*) *subcostata*. Por su parte, la especie *Paropsisterna* (*Xanthogramma*) *semifumata* se recuperó, junto a *Paropsisterna* sp. aff. *intertincta* WA2, en una posición monofilética y soportada con las especies de *Paropsis* ("clado X"; Figura 4.1-31), y provocando en este último una situación de parafilia no soportada por el test AU (Tabla 4.1-14). La especie *P. semifumata* fue originariamente descrita en el género *Paropsis* por Blackburn (1901), para posteriormente pasar a ser la única especie del género *Xanthogramma* (Weise, 1923). Reid (2006) sinonimizó *Xanthogramma* con *Paropsisterna*, señalando en el mismo manuscrito que junto a otras, la especie *P.*

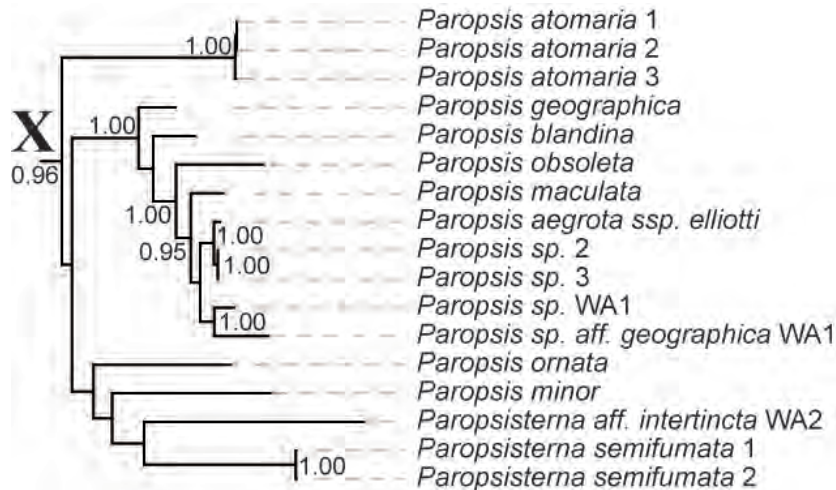
*semifumata* presenta unos atributos morfológicos que impiden una asignación genérica clara y no conforman ningún grupo diferenciado dentro de *Paropsisterna*. En dicho grupo de especies se cita también a la especie *P. intertincta*, la cual es morfológicamente muy similar al ejemplar determinado en nuestra muestra como *P. sp. aff. intertincta* WA2 (CAM Reid, comunicación personal). Estas observaciones morfológicas, en combinación con los resultados obtenidos en nuestro estudio filogenético molecular, sugieren que las especies *P. semifumata* y *P. sp. aff. intertincta* WA2 probablemente pertenezcan al género *Paropsis*.



**Figura 4.1-30.** Subclados extraídos del árbol bayesiano basado en la "matriz-273" ilustrando las tres agrupaciones soportadas de géneros de *Paropsisterna* que satisfacen el criterio de original establecido por Weise (1901) para el género *Chrysophtharta*.



**Figura 4.1-31.** Subclados extraídos del árbol bayesiano basado en la “matriz-273” ilustrando las dos agrupaciones soportadas de géneros de *Paropsistema* que satisfacen la definición original del género establecida por Motschulsky (1860).



**Figura 4.1-32** Subclado extraído del árbol bayesiano basado en la “matriz-245” ilustrando en detalle las relaciones filogenéticas del “clado X” (ver texto principal).

#### 4.1.5.2.- Biogeografía histórica de los Chrysomelinae

Nuestro análisis biogeográfico sitúa el origen de la subfamilia Chrysomelinae a finales del Cretácico en Laurasia. En nuestra muestra, los linajes de diferenciación temprana Timarchini y Chrysomelina están hoy día ampliamente diversificados en la región Holártica, donde cuentan además con gran número de endemismos. En contraposición, linajes de crisomelinos filogenéticamente más derivados entre los que se incluyen los miembros de las subtribus Phyllocharitina, Entomoscelina y Gonioctenina, así como los linajes representados por los clados “I”, “J” y “K” de la figura 4.1-18) parecen haber evolucionado a partir de ancestros establecidos a mediados del Eoceno en las masas continentales del Hemisferio Sur (Figura 4.1-22; nodo 113), cuando Australia, Antártica y Suramérica aún conformaban un solo continente (provincia Weddeliana *sensu* Case, 1989). Los resultados del análisis BBM sugieren por tanto una hipótesis biogeográfica para la subfamilia Chrysomelinae con un origen a finales del Cretácico centrado en Laurasia, y una posterior expansión de determinados linajes hacia las masas continentales del Hemisferio Sur. Esta

interpretación contradice la hipótesis de Daccordi (1994, 1996) quien sugirió un origen mucho más antiguo, entre finales del Jurásico e inicios del Cretácico, y donde vicarianza ancestral para la subfamilia habría sido por la apertura del mar de Tethys, quedando en Laurasia los precursores de Timarchini y en Gondwana el resto de linajes. La sugerencia biogeográfica de Daccordi (1994, 1996) se basa principalmente en su percepción de que los grupos más primitivos entre los crisomelinos son Timarchini y sus Entomoscelina, mientras que Chrysomelina, Doryphorina y Gonioctenina serían linajes más derivados. Ya se ha comentado que este orden cladogenético no es compatible con nuestra hipótesis filogenética molecular. Además, el origen de la subfamilia entre finales del Jurásico e inicios del Cretácico sugerido por Daccordi (1994, 1996) puede ser igualmente cuestionado, pues existen evidencias moleculares perfectamente compatibles con el registro fósil de Chrysomelidae que demuestran que en dicho periodo aún no se había definido ni la familia (e.g., Gómez-Zurita *et al.*, 2007a; Hunt *et al.*, 2007).

La principal objeción a la hipótesis del origen de la subfamilia Chrysomelinae en el Hemisferio Norte viene dada por la recuperación del género endémico de Nueva Zelanda *Aphilon* en una posición filogenética basal y bien soportada entre la subfamilia, cuyo origen se remontaría a hace 59,8 Ma (IC-95% = 67,9 - 51,4). Acomodar la situación de este taxón a nuestra hipótesis supondría asumir un evento dispersivo de larga distancia acompañado de extinción diferencial de todos sus potenciales linajes derivados en los territorios de tránsito. En todo caso, la posición filogenética de *Aphilon* es difícil de explicar incluso asumiendo un origen de la subfamilia centrado en Gondwana. Esto es así porque la divergencia de *Aphilon* es notablemente posterior al aislamiento de Nueva Zelanda hace 80 Ma, lo que implicaría un evento de dispersión a una isla lejana (1500 Km hace 65 Ma; Wallis y Trewick, 2009) la cual incluso es probable que hubiese desaparecido temporalmente bajo el Pacífico hace 25 Ma (Trewick *et al.*, 2007; Landis *et al.*, 2008). Además, también quedaría por explicar el problema de la distribución holártica del linaje primitivo de los Timarchini, corología que también comparten una gran parte de los miembros de Chrysomelina y Doryphorina, para ninguno de los cuales existen representantes actuales en Australia (exceptuando el género cosmopolita *Plagiodes*).

El problema más destacado en relación a la interpretación biogeográfica de la historia de los Chrysomelinae reside por tanto en la existencia de dos linajes basales (Timarchini y *Aphilon*) con distribuciones restringidas y distantes. En este contexto, el modelo biogeográfico de Heads (2009) puede contribuir una explicación satisfactoria

para los momentos iniciales de la historia evolutiva de la subfamilia. En dicho modelo se prescinde de la idea de que los linajes basales representan necesariamente la distribución ancestral (algo que no tienen en cuenta los análisis de tipo dispersión-vicarianza como por ejemplo BBM), y se opta por un esquema en el cual se parte de un ancestro de amplia distribución en cuya población van teniendo lugar procesos de diferenciación y de extinción en distintas épocas y regiones. Se resta por tanto importancia al efecto fundador protagonizado por individuos que se dispersan colonizando y radiando en nuevas regiones a favor de un modelo centrado en eventos de vicarianza. En nuestro caso, esto sería equivalente a asumir la existencia de un ancestro común a toda la subfamilia ampliamente distribuido entre hace unos 75 y 68 Ma. A partir de esta población ancestral de crisomelinos primitivos se habrían generado los diferentes linajes en centros de diferenciación cuya cronología viene indicada por la edad de los nodos en la filogenia datada. Así, hace 68 Ma (IC-95% = 74,6 – 61,7) se habría producido la diferenciación inicial del grupo Timarchini en Laurasia, seguida de la diferenciación del linaje de *Aphilon* hace 59,8 Ma (IC-95% = 67,9 - 51,4) probablemente en la región geográfica de lo que terminaría por convertirse en Nueva Zelanda. Los siguientes linajes en diferenciarse habrían sido Chrysomelina y Doryphorina posiblemente en la región Holártica, hace 56,31 Ma (IC-95% = 64,54 – 48,15) y 47,75 Ma (IC-95% = 53,29 – 38,76), respectivamente. Los miembros del nodo 113 (Figura 4.1-22) por su parte parecen mostrar un evento de diferenciación centrado en la provincia Weddeliana hace 48 Ma (IC-95% = 53,29 - 38,76).

Tanto la hipótesis del origen holártico como la derivada del modelo de Heads (2009) presentan el inconveniente de que en el momento en que se originó la subfamilia Chrysomelinae ya existían importantes barreras oceánicas entre los principales continentes. Sin embargo, se dispone de evidencias a favor de conexiones terrestres a finales del Cretácico entre las masas continentales de ambos Hemisferios, tal y como se describe en el modelo paleobiogeográfico de Ezcurra y Agnolín (2012). Según este modelo, en el momento de la formación de los principales linajes de Chrysomelinae (Paleoceno-Eoceno: 65,5 – 36,6 Ma) existían conexiones terrestres entre Laurasia y África, entre África y Sudamérica, y entre Sudamérica y la provincia Weddelinana. La conexión entre Laurasia y África se estableció hace 63 Ma, cuando África colisionó con Eurasia tras haberse separado de Gondwana (Hay *et al.*, 1999). La conexión entre África y Sudamérica estaba mediada por una densa cadena de islas que enlazaba ambos continentes (elevaciones submarinas de Rio Grande y Walvis; Tarling, 1980; Oliveira *et al.*, 2010). En el caso de Sudamérica y Antártida se sabe que

permanecieron conectadas hasta la apertura del Pasaje de Drake hace unos 30 Ma (McLoughlin, 2001).

De nuestro análisis biogeográfico también se desprende que la colonización de la provincia Weddeliana probablemente comenzó hace unos 48 Ma (IC-95% = 53,29 - 38,76) a partir de un linaje ancestral hermano del que diera lugar a Doryphorina. El primer nodo que aparece en el análisis BBM como exclusivamente australiano (= weddelinano) se relaciona con el ancestro común más reciente de los clados que hoy día se encuentran especialmente extendidos y diversificados en Australia (nodo 113; 42,04 Ma, IC-95% = 49,16 - 35,54). En aquel momento la provincia Weddeliana tenía un clima templado y húmedo, y la Antártida estaba cubierta por una vegetación rica en angiospermas dominada por especies del género *Nothofagus* (Dutra, 2004). Estas condiciones favorecieron durante un largo periodo el intercambio biótico entre Australia y Sudamérica, conformando lo que se ha denominado la ruta dispersiva trans-Antártica (Sanmartín y Ronquist, 2004), la cual fue probablemente habitada por crisomelinos. Varios fósiles antárticos tanto de animales (aves ratites, Tambussi *et al.*, 1994; marsupiales, Woodburne y Case, 1996) como de plantas (*Nothofagus*, Dettmann *et al.*, 1990) soportan la existencia de dicho corredor durante finales del Cretácico y el Paleógeno. Un reflejo de ello en nuestros datos lo constituye la estrecha relación recuperada entre el género *Palaeomela* (endémico de Australia) y los géneros hermanos *Jolivetia* y *Pataya* (endémicos del sur de Sudamérica), cuya divergencia hace 28,73 Ma (IC-95% = 35,87 - 21,57) es próxima a la edades estimadas de separación entre Australia y Antártida (32 Ma; Crisp *et al.*, 2004) y entre Sudamérica y Antártida (30 Ma; McLoughlin, 2001).

Poco después de su separación de Antártida, Australia comenzó a moverse rápidamente hacia Asia, colisionando con la placa Pacífica hace 23 Ma y provocando el inicio del levantamiento tectónico de Nueva Guinea en forma de pequeñas islas hace 20 Ma (Lohman *et al.*, 2011). Este episodio geológico concuerda con las edades obtenidas en nuestro cronograma para determinados géneros cuya distribución además de Australia incluye Nueva Guinea y/o la región Oriental. El "clado definido por el nodo 82 en la figura 4.1-22 representa uno de los linajes que mejor ilustran dicha situación. Se trata de un grupo que surge en Australia en un momento cercano al aislamiento tectónico del continente (32,22 Ma, IC-95% = 39,47 - 25,77), y en cual se distinguen dos linajes principales soportados (nodos 76 y 81, respectivamente). El primero incluye a los géneros estrechamente emparentados *Lamprolina*, endémico del norte y este de Australia, y *Promechus*, que es típico de Nueva Guinea aunque

también habita el noreste de Australia. La divergencia entre ambos data de hace 19,3 Ma (IC-95% = 25,60 - 13,63 Ma), solapando con el levantamiento tectónico de Nueva Guinea tras contactar con Australia. Estos datos son congruentes con los resultados del análisis biogeográfico bayesiano, donde se relaciona al ancestro común de *Lamprolina* y *Promechus* con los territorios de Australia y Nueva Guinea (nodo 75). Es posible que la colonización de Nueva Guinea por parte de dicho ancestro diese lugar al linaje de *Promechus*, si bien es cierto que se necesitaría un muestreo de especies más denso para poder extraer conclusiones biogeográficas más concisas. También en el clado definido por el nodo 76 se incluyen los géneros *Chalcolampra* (polifilético en nuestro estudio) y *Zira*, cuya divergencia recíproca se ha estimado en 24,67 Ma (IC-95% = 32,42 - 17,47). La distribución actual de *Chalcolampra* es amplia, extendiéndose desde el Sudeste Asiático hasta Nueva Zelanda (Reid, 2006), mientras que *Zira* es un género monotípico exclusivo de Nueva Caledonia (Reid y Smith, 2004). Los resultados del análisis BBM señalaron como área de distribución más probable para el ancestro común más reciente de ambos géneros el territorio Australia + Nueva Guinea + región Oriental, lo cual es compatible con su tiempo de divergencia. La presencia de *Chalcolampra* en Nueva Zelanda únicamente puede ser explicada mediante dispersión oceánica trans-Pacífica (Sanmartín y Ronquist, 2004), puesto que Zealandia se separó del resto de Gondwana hace 80 Ma siendo incluso probable que hubiese estado cubierta por el océano hace unos 25 Ma (Trewick *et al.*, 2007). Su distribución en Nueva Guinea y el Sudeste Asiático es espacial y temporalmente compatible con el levantamiento tectónico de Nueva Guinea y una dispersión posterior a través del archipiélago Indo-Australiano (Lohman *et al.*, 2011). En cuanto respecta a *Zira*, nuestros resultados ponen de manifiesto un evento de dispersión oceánica post-eocénica a Nueva Caledonia en concordancia con la hipótesis de Pole (1994), y contradicen la sugerencia de Jolivet y Verma (2008) de que *Zira* sea un “fósil viviente” presente en Nueva Caledonia desde el inicio de la fragmentación de Gondwana. Tal evento de dispersión podría haber ocurrido en cualquier momento desde su divergencia con respecto a *Chalcolampra* hace unos 25 Ma, puesto que se sabe que Nueva Caledonia no ha vuelto a estar total (Pelletier, 2006; Schellart, 2007; Collot *et al.*, 2008) o parcialmente sumergida (Jolivet y Verma, 2008) desde hace aproximadamente 35 Ma. Por su parte, el nodo 81 también contiene géneros cuya historia evolutiva comienza en Australia para después extenderse a otras regiones vecinas tras la colisión de la placa Australiana con la Pacífica. Un buen ejemplo de ello es *Phyllocharis*, un género con representantes en el Sudeste Asiático y en el norte y este de Australia. Hemos calculado que el origen de *Phyllocharis* podría haber tenido lugar paralelamente al aislamiento tectónico de Australia (hace 28,18 Ma, IC-95% =

35,36 - 22,04), y que la radiación de sus especies muestreadas podría ser coetánea con el contacto de Australia con Asia (20,21 Ma, IC-95%= 26,59 - 14,57). *Phola* es otro género con una distribución comparable a la de *Phyllocharis*, y cuyo origen hace 25,05 Ma (IC-95% = 32,3 - 18,12) sugiere una historia biogeográfica similar. Existen también en este mismo clado géneros endémicos de Australia como son *Eulina* y *Johannica*. Se trata de linajes que parecen haber evolucionado exclusivamente en Australia tras su aislamiento, aunque también es posible que su potencial expansión a otras regiones haya quedado enmascarada por procesos de extinción.

El clado definido por el nodo 95 está constituido en su mayor parte por géneros endémicos de Australia, y cuya radiación hace 29,6 Ma (IC-95% = 36,38 - 23,28) se remonta a la separación gondwánica de dicho continente. Se trata de un conjunto de géneros de talla reducida (longitud < 7mm) con escasa capacidad de dispersión (alas ausentes en *Canobolas*, *Ethomela* y *Geomela*; Reid *et al.* 2009, comunicación personal), lo que podría explicar su ausencia en territorios no australianos. La única excepción a la distribución exclusivamente australiana está representada por el endemismo monoespecífico de Chile *Araucanomela*, que se recupera en nuestros análisis como estrechamente emparentado con *Oomela*, y del cual divergió hace 21,88 Ma (IC-95% = 28,83 - 15,3). Esta edad no es compatible con las fechas de separación entre Australia, Antártida y Suramérica, lo que sugiere un evento dispersivo posterior. La Corriente Circumpolar Antártica y la Deriva de los Vientos del Oeste están considerados como las mayores fuerzas que dirigen los eventos dispersivos en el Hemisferio Sur tras el aislamiento de la Antártida en el Oligoceno (Sanmartín *et al.*, 2007), lo que tal vez podría explicar la presencia de *Araucanomela* en Sudamérica.

El clado definido por el nodo 84 representa un linaje particular que incluye dos géneros monotípicos endémicos de Australia (*Ateratocerus* y *Grammicomela*) y un género que además de en Australia también está presente en Nueva Guinea (*Chalcomela*). El análisis BBM indicó que el ancestro común más reciente de los tres géneros (28,88 Ma, IC-95% = 36,7 - 21,45) podría ser de origen australiano, lo que parece indicar una colonización posterior de Nueva Guinea por parte del linaje de *Chalcomela*. El endemismo africano *Gasterantrodes* se recupera sin soporte como hermano de este mismo clado (nodo 85), con una divergencia de alrededor de 33,12 Ma (IC-95% = 41 - 25,41). Es posible que el ancestro de *Gasterantrodes* se dispersase a África desde la provincia Weddeliana.



El grupo que sin duda más distancia se ha alejado con respecto a su origen en la provincia Weddeliana es el definido por el nodo 88 (*Colaspidema*, *Cystocnemis*, *Entomoscelis* y *Oreomela*). Los miembros incluidos en este linaje se distribuyen actualmente por la región Holártica, y carecen de representantes en la región Australiana. Su divergencia data de hace 35,9 Ma (IC-95% = 43,52 - 28,67), lo que implicaría un episodio de separación temprana en un momento que probablemente fue anterior al aislamiento de Australia. Se necesitaría un muestreo más completo de los miembros de este linaje abarcando las regiones Paleotropical y Oriental para poder conocer su historia biogeográfica.

El patrón biogeográfico obtenido para los Gonioctenina pone de manifiesto un origen gondwánico a finales del Eoceno y principios del Oligoceno (hace 37,82 Ma, IC-95% = 44,3 – 31,93; nodo 110), en un momento previo a la fragmentación de la provincia Weddeliana. Aunque se trata de un grupo eminentemente australiano, nuestros resultados revelan que a lo largo de su evolución ha habido linajes que han colonizado territorios adyacentes. Uno de estos casos se corresponde con el grupo monofilético integrado por los géneros *Callidemum* y *Calomela* (excluyendo a *Callidemum hypochalceum*, que probablemente no pertenece al género *Callidemum* según nuestros resultados), que cuenta con especies en Nueva Guinea. El mismo patrón de distribución lo exhiben los géneros *Platymela*, *Paropsis* y *Trachymela*. Para todos estos géneros nuestro muestreo únicamente incluye especies australianas, por lo que no es posible desvelar la posible relación cronológica entre la filogenia y las diferentes colonizaciones. Otro género de Gonioctenina con una distribución particular es *Ewanius*, el cual es monotípico y endémico de la isla de Tasmania, donde vive estrechamente vinculado con los bosques de *Nothofagus*. El género hermano de *Ewanius* es *Novacastria*, también monotípico y endémico, pero en este caso de los bosques relictos de *Nothofagus* del noreste de New South Wales, Australia (Reid, 2006). La separación entre Australia y Tasmania es relativamente reciente (9.000 – 6.500 años; McLoughlin, 2001), lo que descarta cualquier hipótesis de separación de linajes asociada con la vicarianza de ambas islas. *Ewanius* se alimenta de *Nothofagus cunninghamii* y *N. gunnii* (Reid, 2002; trofismo sobre *N. gunnii* cuestionado por Daccordi y de Little, 2003), y *Novacastria* está especializado en *N. moorei* (Selman y Lowman, 1983; Reid, 2002; Daccordi y de Little, 2003). *N. cunninghamii* se encuentra únicamente en Tasmania y en determinados valles húmedos de Victoria, mientras que *N. moorei* está relegado a ciertos puntos del este de Australia. Se trata de dos géneros hermanos de *Nothofagus* cuya divergencia ha sido estudiada implementando distintas estrategias de calibración molecular y se sitúa en el rango 23,4 - 2,7 Ma (Sauquet et

*al.*, 2012), el cual es un intervalo amplio pero altamente compatible con la edad media de separación e intervalo de confianza obtenidos en nuestros análisis para los linajes *Ewanius* y *Novacastria* (14,46 Ma, IC-95% = 23,33 - 7,5). Hasta qué punto la elección de hospedadores divergentes también explica la diferenciación entre las especies de coleópteros es difícil de establecer con la información disponible. Considerando las distribuciones de los escarabajos y de sus especies hospedadoras, es posible que la especialización trófica fuese el resultado del aislamiento alopatrico de un crisomelino ancestral con alimentación generalista sobre *Nothofagus*, dando lugar a los dos linajes diferentes de escarabajos cada uno de ellos evolucionando en hábitats donde sólo uno de los linajes de *Nothofagus* estaba presente. Otro posible escenario evolutivo sería aquel en el que tanto las plantas como los escarabajos evolucionan siguiendo unos requerimientos ecológicos similares que explicarían su actual distribución alopatrica. Alternativamente también es posible que los linajes de escarabajos secundariamente hubiesen perseguido esos requerimientos ambientales tras las distribuciones de las plantas a las que ellos ya se habían adaptado.

#### 4.1.5.3.- Evolución de las asociaciones ecológicas de los *Chrysomelinae* australianos

En la historia evolutiva de los géneros de crisomelinos australianos, el momento en que parecen acumularse más linajes que terminarían por constituir entidades que generalmente tratamos como géneros se sitúa en el lapso temporal comprendido entre el origen del grupo hace unos 42 Ma y aproximadamente hace 25 Ma, momento este último en el que se habrían definido ya los principales géneros de crisomelinos australianos existentes en la actualidad. Geológicamente, este periodo de tiempo se corresponde con la última etapa de Australia como parte integrante de la provincia Weddeliana y con los subsiguientes procesos de escisión y aislamiento tectónico del continente (Sanmartín y Ronquist, 2004). En aquel periodo el clima en el continente era muy húmedo y no estacional, y la vegetación predominante era de tipo *rainforest* (Crisp *et al.*, 2004). La consolidación de la diversidad genérica australiana podría coincidir, por tanto, con el cambio climático que determinó la transición en Australia hacia un clima más frío y estacional dominado por una flora de tipo esclerófilo (Crisp *et al.*, 2004; Martin, 2006). A partir de ese momento las especies vegetales típicas de ambientes húmedos no estacionales (*e.g.*, *Nothofagus*) apenas se han diversificado (Crisp *et al.*, 2004). Esta situación se refleja en los linajes de crisomelinos estrechamente vinculados a las formaciones húmedas, que en los últimos 20 Ma no parecen haber aumentado en número de especies o, alternativamente, han

experimentado tasas de extinción elevadas. Entre los mismos se incluyen *Ateratocerus* (1 sp.), *Chalcolampra* (20 spp.), *Chalcomela* (18 spp.), *Eulina* (6 spp.), *Grammicomela* (1 sp.), *Johannica* (3 spp.), *Phola* (6 spp.) y *Phyllocharis* (24 spp.). Contrariamente, existe un grupo de géneros con un elevado número de especies adaptadas a los ambientes semi-áridos y cuyo origen se situaría a mediados del Mioceno, hace unos 15 Ma (Tabla 4.1-16), coincidiendo con el episodio de cambio climático hacia las condiciones ambientales más secas y frías que propiciaron la contracción de los *rainforests* y la expansión de la flora esclerófila dominada por *Eucalyptus* (Martin, 2006). En este caso hablamos de los géneros *Paropsis* (70 spp.), *Paropsisterna* (110 spp.), *Peltoschema* (100 spp.) y *Trachymela* (120 spp.), que juntos acumulan más de la mitad de las 750 especies de crisomelinos australianos (Reid, 2006). Utilizando la terminología de Stebbins (1974), podemos establecer que para los crisomelinos australianos los sistemas forestales húmedos representan actualmente museos de biodiversidad, mientras que los ambientes esclerófilos constituyen cunas evolutivas.

El contraste entre las filogenias de los crisomelinos australianos y sus plantas hospedadoras refleja la existencia de cierta conservación taxonómica en las asociaciones tróficas (Figuras 4.1-23 y 4.1-24): las especies de la subtribu Phyllocharitina (Figura 4.1-23 - "clado A") presentan una alimentación exclusiva sobre especies de astéridas, mientras que las de la subtribu Goniocetenina exhiben una asociación trófica especializada en el grupo de las rósidas Figura 4.1-23 - "clado D". La diferenciación filogenética de la subtribu Phyllocharitina (Figura 4.1-23 - "clado A") ocurrió hace aproximadamente 42,04 Ma (IC-95% = 49,16 – 35,54), un momento notablemente posterior a la divergencia entre astéridas y rósidas hace entre 107 y 117 Ma (Wikström *et al.*, 2003). Nuestros datos sugieren la existencia de un escenario evolutivo en el cual la alimentación sobre astéridas o sobre rósidas sería el carácter ancestral (Figura 4.1-24), y en el que forzosamente han ocurrido episodios de cambio de hospedador en los últimos 42 Ma. La posibilidad de que la alimentación ancestral comprendiese ambos linajes botánicos parece en principio improbable atendiendo al elevado nivel de especialización trófica que actualmente exhiben las especies de crisomelinos. En cualquier caso, el análisis de inferencia de los linajes hospedadores ancestrales indica que el ancestro común más reciente del clado hermano de Phyllocharitina se alimentaba ya de especies de rósidas hace unos 40,18 Ma (IC-95% = 47,01 – 34,01). En este periodo la vegetación dominante en Australia era de tipo *rainforest* (Crisp *et al.*, 2004; Hill, 2004), aunque existen evidencias que soportan la coexistencia con las primeras formaciones vegetales esclerófilas (Martin, 2006). El carácter esclerófilo de la vegetación australiana parece haber evolucionado en

ambientes húmedos como una respuesta ecológica frente a condiciones de escasez de nutrientes (Hill, 1998), para después adquirir una función xeromórfica como respuesta adaptativa a la aridificación del continente (Martin, 2006). Los crisomelinos primitivos con una alimentación adaptada a la vegetación esclerófila incipiente en los sistemas de *rainforest* habrían seguido a sus linajes hospedadores en la colonización del nuevo entorno semi-árido tras la contracción de los *rainforests*. Esta hipótesis está en sintonía con las evidencias filogenéticas que sostienen que la biota característica de las formaciones esclerófilas australianas tiene su origen en linajes ancestrales relacionados con los sistemas de *rainforest* (revisado en Byrne *et al.*, 2011). Entre los pocos crisomelinos australianos que actualmente se alimentan de rósidas propias de *rainforests* se cuentan las especies de *Ewanius* y *Novacastria*, cuya especialización en *Nothofagus* parece representar un caso de permanencia en este tipo de ecosistema, reforzando nuestra hipótesis del ancestro adaptado a rósidas de ambientes húmedos. Esto es congruente con la divergencia filogenética temprana (no soportada) de *Ewanius* y *Novacastria* entre los Gonioctenina. Existe un grupo monofilético en la subtribu Gonioctenina especializado en Myrtaceae (rósidas), donde se incluyen los géneros *Faex*, *Paropsis*, *Paropsisterna*, *Poropteromela*, *Rhaebosterna* y *Trachymela*, además de las especies *Paropsides* sp. 3 y *P. sp. 4* Figura 4.1-23 - “clado G”. Entre ellos, los únicos taxones característicos de *rainforest* son *Poropteromela* y las dos especies de *Paropsides*, los cuales se recuperan en nuestra filogenia en una posición hermana del resto que está en sintonía con su alimentación sobre Myrtaceae basales propias de *rainforest* (“clado H”). La divergencia entre este grupo y el resto de géneros que se alimentan de mirtáceas data de hace 19,39 Ma (IC-95% = 24,33-18,88), un momento marcado por la transición hacia el bioma esclerófilo y la contracción de los *rainforests* (Crisp *et al.*, 2004; Hill, 2004), y en el cual el registro fósil evidencia una expansión de *Eucalyptus* en el este de Australia (Hill *et al.*, 1999). En el caso de que *Poropteromela* y las dos especies de *Paropsides* retuviesen un comportamiento ecológico ancestral, podríamos hablar de un modelo en el que crisomelinos primitivos adaptados a la alimentación sobre Myrtaceae en los *rainforests* radian en el nuevo ambiente emergente junto con sus hospedadores.

Nuestros resultados ponen de manifiesto además la existencia de un desfase temporal entre el origen de determinados linajes de crisomelinos y el de sus plantas hospedadoras, soportando la existencia de episodios de cambio de hospedador a lo largo de la evolución del grupo. Los miembros del “clado A2” para los cuales se dispone información exhiben una relación alimenticia con plantas del orden Lamiales, concretamente sobre las familias Bignoniaceae (hospedador de *Johannica*),

Lamiaceae (hospedador de *Phyllocharis*), Oleaceae (hospedador de *Eulina*) y Verbenaceae (hospedador de *Phola*). Aunque se trata de familias botánicas estrechamente relacionadas, nuestros resultados permiten descartar la existencia de procesos co-cladogenéticos entre las mismas y los géneros de coleópteros que sustentan, puesto que sus tiempos de divergencia son considerablemente más antiguos que los obtenidos para los escarabajos (Oleaceae: aproximadamente 90 Ma; Bignoniaceae: aprox. 67 Ma; Lamiaceae y Verbenaceae: aprox. 63 Ma; Bremer *et al.*, 2004). Lo mismo cabe señalar para todo el conjunto del “clado A”, cuyo ancestro común más reciente (32,22 Ma, IC-95% = 39,47 - 25,77) es relativamente moderno en comparación con el ancestro de las astéridas de las cuales se alimentan (aprox. 120 Ma; Bremer *et al.*, 2004). Casos análogos serían el género monotípico *Ateratocerus* (Figura 4.1-23 - “clado B; origen hace 21,83 Ma, IC-95% = 30,01-14,26) que se alimenta sobre el género de Proteaceae *Stenocarpus* (Reid, 2006; origen hace 65 Ma *sensu* Barker *et al.*, 2007), el de los Gonioctenina (origen hace 37,82 Ma, IC-95% = 45,35 – 32,77) asociados a Fabales, Myrtales y Sapindales (origen anterior a hace 83 Ma *sensu* Wang *et al.*, 2009) Figura 4.1-23 - “clado D”), o el de los Gonioctenina adaptados a la alimentación sobre mirtáceas de ambientes esclerófilos (origen hace 18,81 Ma, IC-95% = 22,86 - 15,25), cuya separación filogenética ocurrió mucho antes de la divergencia de escarabajos (>70 Ma, Systma *et al.*, 2004) (Figura 4.1-23 - “clado I”). Aunque en todos estos ejemplos el origen de los coleópteros es posterior al de sus plantas hospedadoras, también es posible encontrar la situación inversa. Sería el caso de los géneros *Callidemum* (excluyendo *C. hypochalceum*), *Calomela* y *Dicranosterna*, cuyo origen hace 32,84 Ma (IC-95% = 38,88-27,09) es anterior al inicio de la instauración del bioma esclerófilo en Australia en el que empezaron a radiar linajes botánicos entre los cuales se incluyen sus especies hospedadoras del género *Acacia* (Crisp *et al.*, 2004) (Figura 4.1-23 - “clado F”). Tales cambios de hospedador se podrían interpretar bajo el concepto de ajuste ecológico formulado por Janzen (1985), según el cual la observación de una interacción funcional herbívoro-planta no necesariamente implica coevolución entre ambos linajes, sino que en algún momento de la historia evolutiva de los herbívoros sus ancestros ya poseían la capacidad de explotar el nuevo hospedador posiblemente antes de haber interactuado nunca tróficamente con él (Barrett y Heil, 2012). La información disponible no nos permite desentrañar los mecanismos que subyacen a los cambios de hospedador detectados a lo largo de la historia evolutiva de los crisomelinos australianos, aunque en otros grupos de insectos se ha demostrado que son favorecidos por la reducción de la presión de los depredadores en el nuevo hospedador (Murphy, 2004) o por la reducción de la competencia con otros herbívoros (Futuyma y Moreno, 1988), incluso

a pesar de que el nuevo hospedador sea nutricionalmente menos eficiente (Barrett y Heil, 2012).



## 4.2.- Sistemática molecular y evolución del género *Calomela* Hope (Coleoptera: Chrysomelidae, Chrysomelinae)

### 4.2.1.- Introducción

*Calomela* Hope, 1840 es un género de coleópteros crisomelinos ampliamente distribuido en Australia y que también está presente en Nueva Guinea (Reid, 2006). Las especies australianas habitan fundamentalmente en la vertiente oriental de la cordillera Great Dividing Range en los estados de New South Wales y Victoria, aunque también se conocen determinadas especies cuya distribución es más septentrional u occidental (Selman, 1979). Tal y como se define actualmente el género, los adultos de las especies de *Calomela* tienen una longitud comprendida entre los 4 y los 11 milímetros siendo en general escarabajos de porte estrecho y aplanado, aunque algunas especies propias de bosques lluviosos son anchas y convexas (Reid, 2006). Una gran proporción de especies se caracterizan por la presencia de una banda longitudinal de color verde brillante en cada uno de sus élitros, mientras que otras especies carecen de la misma, mostrando élitros completamente amarillentos, marrones, azules o verdes, pudiendo incluso exhibir una apariencia metalizada (Figura 4.2-1).

La biología de estos insectos se halla estrechamente vinculada con sus plantas hospedadoras. Tanto larvas como adultos se alimentan exclusivamente de acacias (Reid, 2006), llegando algunas especies a constituir un severo problema de defoliación forestal en áreas extensas (Selman, 1979; Hunt *et al.*, 1996). La especificidad trófica no es frecuente ya que, atendiendo a los registros disponibles, la mayoría de las especies de *Calomela* con hospedador conocido se vinculan a más de una especie de *Acacia*; de manera análoga, una misma planta puede servir de alimento a más de una especie de *Calomela* (Reid, 1989, 1992). Una vez alcanzado el final de su desarrollo, las larvas descienden del hospedador y pupan justo debajo de la superficie del suelo (Selman, 1979). Las especies de *Calomela* parecen tener un ciclo de vida de tipo bivoltino, *i.e.* con dos generaciones por año (Hunt *et al.*, 1996).

La sistemática de *Calomela* es inestable (Reid, 2002). Las hipótesis existentes se basan exclusivamente en caracteres morfológicos como la presencia de un profundo surco hipomeral en el protorax, el tamaño y la forma de la banda longitudinal de los élitros, morfología de las uñas, forma del sexto segmento abdominal verdadero,



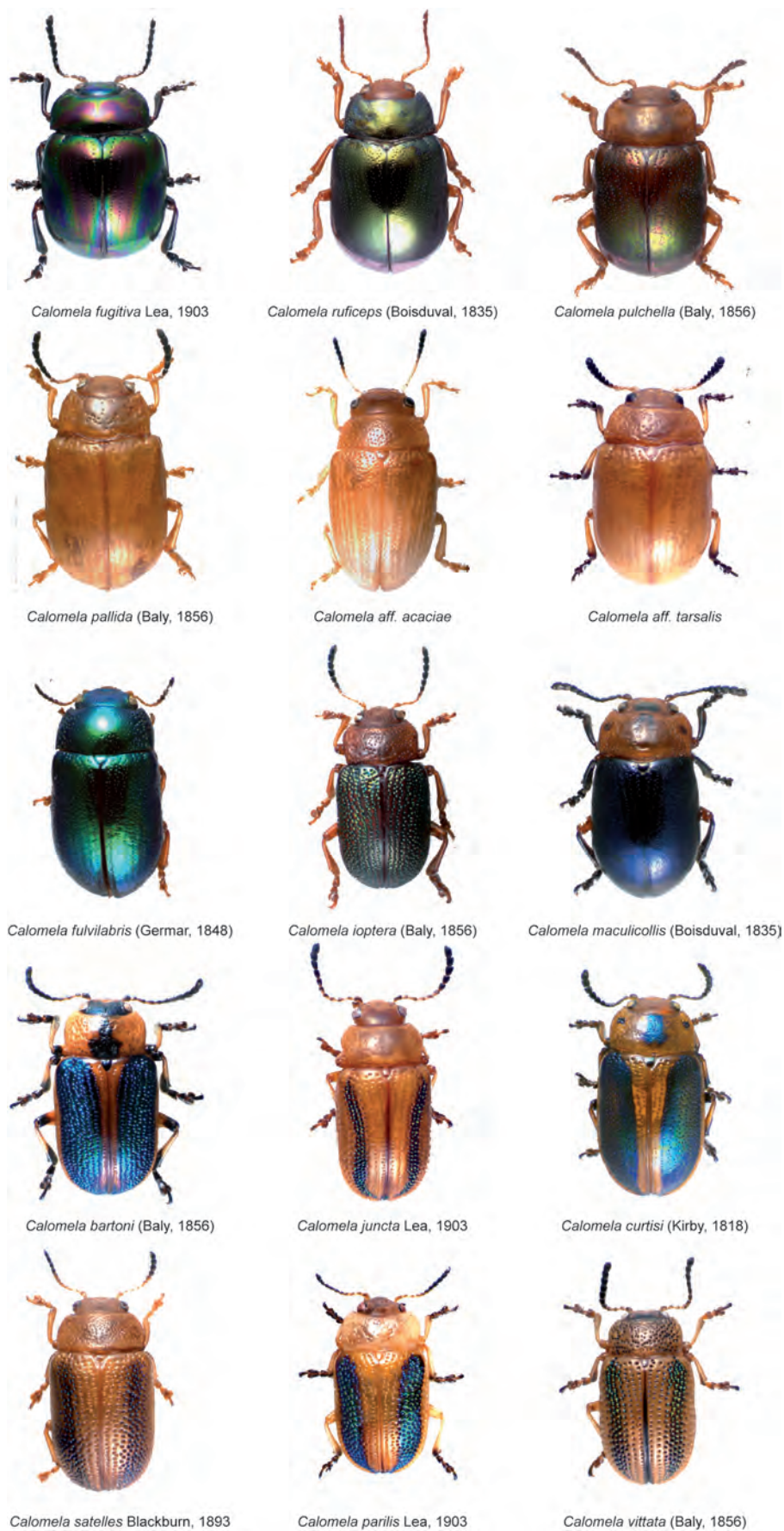


Figura 4.2-1. Diversidad de habitus en el género *Calomela* (Fotografías: J. A. Jurado-Rivera).

y la forma del lóbulo medio del edeago del macho o la espermateca de la hembra (Selman, 1977, 1979; Daccordi, 2004; Reid, 2006). La primera revisión importante fue llevada a cabo por Selman (1979), donde el autor incluyó 23 especies en el género y reconoció otros ocho géneros estrechamente relacionados con *Calomela* ("grupo de *Calomela*" en adelante): *Augomela* Baly, *Carystea* Baly, *Lamecola* Selman, *Macelola* Selman, *Parastarycea* Selman, *Platymela* Baly, *Sarycea* Selman y *Stethomela* Baly. De estos, tan sólo *Carystea* y *Sarycea* comparten con *Calomela* la presencia del surco hipomeral, y la separación entre estos tres géneros se basó exclusivamente en la morfología de las uñas: bífidas en *Calomela*, apendiculadas en *Carystea* y simples en *Sarycea* (Selman, 1979). Daccordi (1994) reorganizó la propuesta de Selman reduciendo drásticamente el número de géneros en el grupo de *Calomela* y estableciendo cuatro subgéneros basados en la morfología de las uñas. En la última revisión del género (Reid, 2006), las aproximadamente 45 especies del grupo de *Calomela* que poseen un profundo surco hipomeral fueron formalmente agrupadas como *Calomela*, y las decisiones previas basadas exclusivamente en morfología de las uñas fueron rechazadas ya que el autor consideró este carácter como homoplásico en este grupo.

#### 4.2.2.- Objetivos

En este capítulo se pretende estudiar la sistemática del género *Calomela* con un énfasis en la utilización de caracteres moleculares proporcionados por cuatro marcadores genéticos, y centrándolo en las relaciones tanto interespecíficas como intraespecíficas. En particular se indagará sobre las siguientes cuestiones: (i) inferir la primera hipótesis filogenética molecular para el género *Calomela*, (ii) incorporar una dimensión temporal a la historia evolutiva de *Calomela* y determinar los patrones de diversificación y su relación con los eventos paleoclimáticos acaecidos en el continente australiano, (iii) investigar las relaciones intraespecíficas y los posibles procesos de aislamiento genético y/o dispersión acontecidos a las poblaciones de *Calomela*, (iv) evaluar la utilidad de los cuatro marcadores moleculares para la identificación molecular de las especies de *Calomela*, (v) analizar el valor sistemático de los caracteres morfológicos clásicamente empleados para tomar decisiones taxonómicas, y (vi) estudiar la evolución de la asociación entre las especies de *Calomela* y sus plantas hospedadoras.

### 4.2.3.- Materiales y métodos

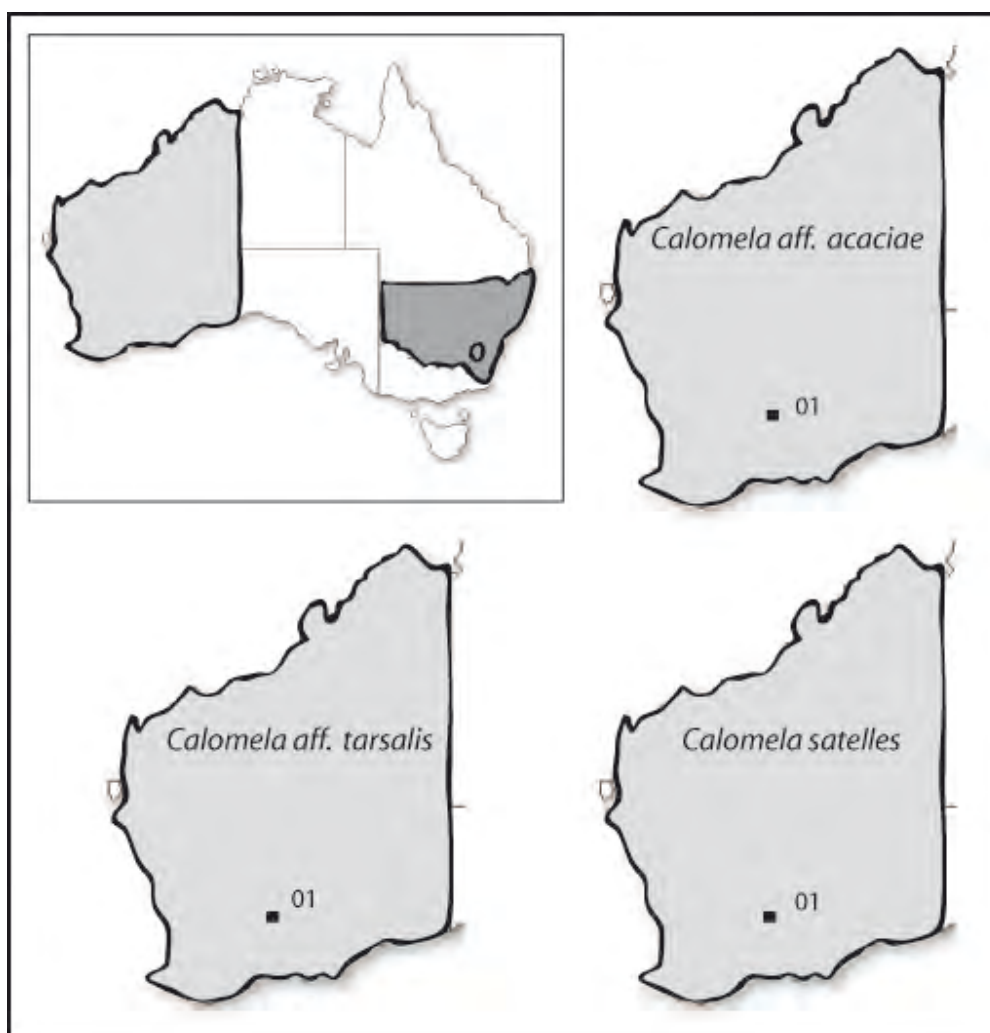
#### 4.2.3.1.- Muestreo taxonómico

En este estudio se han analizado 83 especímenes clasificados en 15 especies australianas de *Calomela* (Tabla 4.2-1; Figura 4.2-2). El muestreo incluye dos especies que satisfacen la descripción de Selman (1977) del género *Starycea* (*Calomela fulvilabris* y *C. aff. acaciae*). Como grupo externo se ha incorporado un ejemplar de la especie *Callidemum parryi*, un taxón estrechamente relacionado con *Calomela* (Reid, 2006; Jurado-Rivera *et al.*, 2009; capítulo I de esta tesis). Todos los individuos fueron colectados mediante la técnica de vareo de vegetación con paraguas japonés y depositados en viales con etanol absoluto para ser preservados luego a -20°C hasta el momento de su procesado en el laboratorio, tratando así de garantizar el mayor grado posible de conservación del ADN de los insectos.

Especie	Localidad	n° individuos	n° de identificación
<i>Calomela bartoni</i>	Bulls Head, ACT, Australia	4	1, 3, 4, 6
<i>Calomela cf. acaciae</i>	Coolgardie, WA, Australia.	1	1
<i>Calomela cf. tarsalis</i>	Coolgardie, WA, Australia.	1	1
<i>Calomela curtisi</i>	Dharnwal Nature Reserve, NSW, Australia.	1	8
<i>Calomela curtisi</i>	Mount Towak, NSW, Australia.	1	4
<i>Calomela curtisi</i>	Oxley Wild Rivers National Park, NSW, Australia.	4	5, 6, 7, 13
<i>Calomela curtisi</i>	Vineyard, NSW, Australia	4	1, 2, 9, 12
<i>Calomela fugitiva</i>	Armidale, NSW, Australia.	1	13
<i>Calomela fugitiva</i>	Cascade, NSW, Australia.	1	7
<i>Calomela fugitiva</i>	Killungoondie, NSW, Australia.	2	15, 16
<i>Calomela fugitiva</i>	Mount Warning National Park, NSW, Australia.	1	1
<i>Calomela fugitiva</i>	New England National Park, NSW, Australia.	4	8, 9, 10, 20
<i>Calomela fugitiva</i>	Norman Jolly Forest Reserve, NSW, Australia.	3	2, 5, 11
<i>Calomela fugitiva</i>	Wingham Brush Nature Reserve, NSW, Australia.	1	18
<i>Calomela fugitiva</i>	Woko National Park, NSW, Australia.	1	4
<i>Calomela fulvilabris</i>	Jerrys Plains, NSW, Australia.	1	1
<i>Calomela fulvilabris</i>	Leeton, NSW, Australia.	2	2, 3
<i>Calomela ioptera</i>	Illawarra State Recreation Area, NSW, Australia.	1	1
<i>Calomela ioptera</i>	Oxley Wild Rivers National Park, NSW, Australia.	3	2, 3, 5
<i>Calomela juncta</i>	Black Mountain, ACT, Australia.	1	2
<i>Calomela juncta</i>	Blue Mountains National Park, NSW, Australia.	1	4
<i>Calomela juncta</i>	Mount Canobolas, NSW, Australia.	1	5
<i>Calomela juncta</i>	Royal National Park, NSW, Australia.	1	1
<i>Calomela maculicollis</i>	Bulls Head, ACT, Australia	1	1
<i>Calomela pallida</i>	Armidale, NSW, Australia.	3	1, 2, 5
<i>Calomela pallida</i>	Oxley Wild Rivers National Park, NSW, Australia.	2	3, 4
<i>Calomela parilis</i>	Vineyard, NSW, Australia.	1	3
<i>Calomela parilis</i>	Warkworth, NSW, Australia.	1	1

<i>Calomela pulchella</i>	Cumberland State Forest, NSW, Australia.	1	3
<i>Calomela pulchella</i>	Girard State Forest, NSW, Australia.	1	2
<i>Calomela pulchella</i>	Guy Fawkes River National Park, NSW, Australia.	4	15, 16, 17, 18
<i>Calomela pulchella</i>	Sandy Hill, NSW, Australia.	1	11
<i>Calomela pulchella</i>	Vineyard, NSW, Australia.	2	8, 10
<i>Calomela pulchella</i>	Windsor, NSW, Australia.	3	1, 6, 7
<i>Calomela ruficeps</i>	Barrington Tops National Park, NSW, Australia.	3	7, 8, 9
<i>Calomela ruficeps</i>	Cumberland State Forest, NSW, Australia.	3	14, 15, 16
<i>Calomela ruficeps</i>	Illawarra State Recreation Area, NSW, Australia.	4	11, 12, 13, 20
<i>Calomela ruficeps</i>	Long Point, NSW, Australia.	3	17, 18, 19
<i>Calomela ruficeps</i>	Norman Jolly Forest Reserve, NSW, Australia.	1	2
<i>Calomela ruficeps</i>	Sandy Hill, NSW, Australia.	1	10
<i>Calomela ruficeps</i>	Stanwell Park, NSW, Australia.	5	1, 3, 4, 5, 6
<i>Calomela satelles</i>	Kalgoorlie, WA, Australia.	1	1
<i>Calomela vittata</i>	Bulls Head, ACT, Australia	1	2
<i>Callidemum parryi</i>	Norman Jolly Forest Reserve, NSW, Australia.	1	1

**Tabla 4.2-1.** Listado taxonómico de los ejemplares de *Calomela* estudiados y sus respectivas localidades de origen.



**Figura 4.2-2.** Mapas de distribución en Australia de los ejemplares de *Calomela* estudiados (continúa en la siguiente página).



Figura 4.2-2. continuación.

#### 4.2.3.2.- Preparación del material y extracción de ADN

Los especímenes se diseccionaron individualmente para ser sometidos después a un protocolo de extracción de ADN tal y como se describe en los apartados 3.2.1 y 3.2.2 (páginas 17-19).

4.2.3.3.- *Marcadores genéticos: amplificación, secuenciación y edición de secuencias*

Para el estudio se seleccionaron cuatro marcadores moleculares de los genomas tanto nuclear como mitocondrial: (i) una región parcial del gen nuclear para el ARN ribosomal 28S (LSU; Sonnenberg *et al.*, 2007; cebadores LSU D1,D2 fw1 5'-AGC GGA GGA AAA GAA ACT A-3' y LSU D1,D2 rev2 5'-ACG ATC GAT TTG CAC GTC AG-3'), (ii) la secuencia completa del segundo espaciador transcrito interno del ARN ribosomal nuclear (ITS-2; White *et al.*, 1990; cebadores ITS3 5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3' e ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), (iii) un fragmento del gen nuclear codificante CAD (*Rudimentary*; Wild y Maddison, 2008; cebadores: CD667F 5'-GGA TGG AAG GAA GTD GAR TAY GAR GT-3' y CD851R 5'-GGA TCG AAG CCA TTH ACA TTY TCR TCH ACC AT-3'), y (iv) una secuencia parcial del gen mitocondrial codificante para la citocromo oxidasa I (*cox1*; Simon *et al.*, 1994; cebadores: C1-J-2183 5'-CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG-3' y TL2-N-3014 5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A-3').

Las reacciones de PCR se realizaron, evaluaron y purificaron siguiendo los protocolos descritos en los apartados 3.2.4, 3.2.5 y 3.2.6 (páginas 24-26).

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en ambos sentidos con el método de Sanger *et al.* (1977). Para ello se realizaron reacciones con un volumen total de 10 µl utilizando *ABI PRISM™ BigDye™ terminator Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems), y siguiendo los pasos detallados en el apartado 3.2.7 (página 26).

Los cromatogramas obtenidos se visualizaron y editaron con el programa CHROMAS 2 (Chromas v.2.22; Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia <<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>>). Ambos sentidos fueron utilizados para la obtención de una secuencia consenso empleando el programa CONTIG ASSEMBLY PROGRAM (Huang, 1992) implementado en el programa BIOEDIT v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Como último paso de la edición, se eliminaron las secuencias de los cebadores.

#### 4.2.3.4.- Composición nucleotídica y divergencia entre secuencias

La información relativa a la diversidad y divergencia de las secuencias, así como el análisis de saturación mutacional en sus respectivos alineamientos, se obtuvieron siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.3.3 (página 31).

#### 4.2.3.5.- Inferencia de la estructura secundaria de las secuencias ITS2

Cada una de las secuencias ITS2 fue sometida a un análisis de estructura secundaria basado en modelos ocultos de Márkov mediante la herramienta “Annotate” (ITS2 Database: <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>; Koetschan *et al.*, 2010). Para ello se emplearon modelos específicos para Metazoa y se mantuvieron los valores establecidos por defecto para los demás parámetros ( $E\text{-value} < 0,001$ ; tamaño mínimo del fragmento ITS2 = 150 nt). Una ventaja adicional de esta herramienta en línea es que hibrida *in silico* entre sí los extremos 5,8S y LSU que flanquean las secuencias de ITS2 obtenidas mediante PCR. La incorrecta hibridación de estas regiones está considerada como un indicador muy fiable a la hora de identificar pseudogenes de ITS2 (Harpke y Peterson, 2008). Como paso previo a la obtención de las estructuras secundarias de ITS2, las secuencias de ADN fueron transcritas a ARN, mediante el reemplazamiento con uracilo (U) de las posiciones ocupadas por timina (T). La secuencia ITS2 de *Calomela bartoni* se usó para predecir su estructura secundaria mediante el programa RNAfold disponible en el servidor de estructuras secundarias de ARN Vienna (Hofacker, 2003), empleando para ello los parámetros fijados por defecto. La estructura de ARN resultante fue exportada en la notación conocida como de “puntos y paréntesis”, para posteriormente ser empleada como modelo para obtener las estructuras secundarias de las demás secuencias ITS2. Esto último se llevó a cabo utilizando la herramienta “custom homology modelling” alojada en la web de ITS2 Database, y siguiendo el protocolo establecido por Wiemers *et al.* (2009), es decir, nivel de transferencia de hélice al 70%, matriz de identidad, coste de apertura de inserción-delección = 15 y coste de extensión de inserción-delección = 2. Cada una de las estructuras obtenidas fue sometida a un refinamiento individual detallado mediante el programa RNAfold.

#### 4.2.3.6.- Inferencia de la estructura secundaria de las secuencias LSU

Las secuencias de ADN pertenecientes a la región D1-D3 del marcador LSU fueron transcritas a ARN como paso previo a la obtención de su estructura secundaria. Para dicho plegamiento se emplearon los cuatro modelos estructurales de hexápodos y uno de vertebrados, disponibles en la “European ribosomal RNA Database” (<http://www.psb.ugent.be/rRNA/>; Wuyts *et al.*, 2004): las de los dípteros *Aedes albopictus* (número de acceso de secuencia: L22060), *Anopheles albimanus* (L78065), *Chironomus tentans* (X99212), y *Drosophila melanogaster* (M21017), y la del anfibio anuro *Xenopus laevis* (X59734). Estas estructuras se descargaron en el formato DCSE y posteriormente fueron anotadas en formato de “puntos y paréntesis” con el programa “extractfromdcse” incluido en el paquete informático PHASE (Hudelot *et al.*, 2003), para poderlas visualizar gráficamente con el programa 4SALE 1.5 (Seibel *et al.*, 2008). Las estructuras secundarias de la región LSU D2-D3 de escarabajos crisomélidos de la familia Galerucinae (Gillespie *et al.*, 2004) y de la avispa *Encarsia hispida* (AY599384; Gillespie *et al.*, 2005) también fueron descargadas localmente y utilizadas como modelos estructurales. Las secuencias LSU de *Calomela* fueron alineadas junto con las secuencias modelo usando el programa MAFFT 5 y utilizando la estrategia L-INS-i (Kato *et al.*, 2005). En el alineamiento resultante se delimitó la región D1-D3 de los modelos, y se identificaron regiones altamente conservadas entre todos los taxones que posibilitaran una identificación inequívoca de las diferentes hélices en las secuencias de *Calomela*. Una vez que la estructura secundaria general de la región LSU D1-D3 fue modelada para todas las secuencias de *Calomela*, se procedió a un refinamiento individualizado de las diferentes regiones de cada una de las secuencias con el programa RNAfold.

#### 4.2.3.7.- Alineamiento de secuencias

Las secuencias ITS2 y LSU con sus respectivas estructuras secundarias fueron alineadas simultáneamente con 4SALE 1.5. Este programa codifica la información de las secuencias y su estructura secundaria a modo de secuencias artificiales de proteína, de forma que cada uno de los cuatro nucleótidos puede estar presente en tres estados diferentes: no apareado, nucleótido de apertura y par de bases de cierre (Seibel *et al.*, 2006). Para la obtención del alineamiento final, el algoritmo de 4SALE utiliza matrices de puntuación específicas de cada marcador molecular. En el caso del marcador LSU, el alineamiento se realizó exclusivamente con las 69 secuencias



pertencientes a las 14 especies de *Calomela* secuenciadas para dicho marcador, ya que tras repetidos intentos de PCR no fue posible amplificar el ejemplar del grupo externo *Callidemum parryi*, posiblemente a causa de la inespecificidad de los cebadores en este taxón.

Por otro lado, los genes codificantes para proteína (*cox1* y *CAD*) fueron alineados usando el programa de alineamiento múltiple MAFFT 5 utilizando la estrategia L-INS-i, para posteriormente ser revisados con el fin de certificar la ausencia de inserciones, deleciones o codones de parada.

#### 4.2.3.8.- *Análisis de las repeticiones simples de secuencias*

Las repeticiones simples de secuencias (SSRs, *Simple Sequence Repeats*) son fragmentos de ADN constituidos por repeticiones en tándem de secuencias cortas, y que representan una elevada proporción del genoma en organismos eucariotas (Powell *et al.*, 1996). Su origen está relacionado con fenómenos de apareamiento incorrecto entre las cadenas de ADN durante la fase de replicación (*slippage*; Levinson y Gutman, 1987). Para que este proceso tenga lugar, la enzima ADN polimerasa debe detenerse en una zona de repetición nucleotídica, debe disociarse del ADN, separarse el extremo terminal de la hebra de nueva síntesis y posteriormente hibridar en una región repetitiva próxima pero diferente a la original, para finalizar con un proceso normal de polimerización (Viguera *et al.*, 2001). Las diferencias en longitud y el tipo concreto de repetición asociado a las SSRs son una herramienta potencialmente muy informativa en sistemática molecular (*e.g.*, Kanthaswamy *et al.*, 2001; Ochieng *et al.*, 2007; Trizzino *et al.*, 2009; Casu *et al.*, 2011). En el caso concreto de los genes espaciadores ribosomales, se han estudiado las SSRs de numerosos grupos de artrópodos con fines filogenéticos (*e.g.*, Vogler y DeSalle, 1994; Fenton *et al.*, 1997; Gómez-Zurita *et al.*, 2000; Gamerschlag *et al.*, 2008; Trizzino *et al.*, 2009).

Con el objetivo de analizar las SSRs en las secuencias ITS2 y LSU de *Calomela* se empleó la versión en línea del programa CID (Freitas *et al.*, 2008; <http://www.shrimp.ufscar.br/cid/index.php>). Siguiendo a Trizzino *et al.* (2009), las repeticiones de tipo homopolimérico no se consideraron en nuestro estudio.

La información relativa a la composición y posición de las SSRs detectadas en la matriz ITS2 se codificó manualmente en una matriz binaria de caracteres del tipo

“0=ausencia/1=presencia” en formato Nexus para su posterior análisis filogenético bajo el criterio de parsimonia en el programa PAUP\* 4.0 (Swofford, 2002). No se procedió de igual modo con la matriz de secuencias LSU, ya que a pesar de poseer un elevado número de posiciones con SSRs, estas mostraron escasa variabilidad.

#### 4.2.3.9.- *Análisis de mutaciones compensatorias*

Los cambios de base compensatorios (CBCs, *Compensatory Base Changes*) de las estructuras secundarias de ARN ocurren cuando una de las dos bases de una posición apareada muta y la otra lo hace a continuación en respuesta, y de forma que el apareamiento siga siendo estable. Un hemi-CBC es un tipo particular de CBC en el que tan sólo una de las bases apareadas muta al tiempo que la estructura permanece inalterada.

La presencia de CBCs en las secuencias ITS2 se interpreta como un fiel indicador de incompatibilidad sexual entre taxones (Coleman, 2000, 2003; Coleman y Vacquier, 2002), por lo que han sido empleados para diferenciar entre especies estrechamente emparentadas (*e.g.*, Müller *et al.*, 2007) e incluso entre especies morfológicamente crípticas (Ruhl *et al.*, 2010). Un único CBC en alguna de las regiones altamente conservadas de los dominios C y D<sub>1</sub> revela una correlación positiva con la incompatibilidad reproductiva entre los dos organismos sometidos a comparación (Coleman, 2000, 2009). Por el contrario, la detección de CBCs en alguno de los otros dominios o de hemi-CBCs en cualquier región de las estructuras no se correlaciona necesariamente con incompatibilidad sexual. Al no existir una relación directa entre las secuencias ITS2 y el proceso de formación de gametos, la correlación entre la presencia de CBCs y la imposibilidad de cruzamiento se ha explicado aludiendo a la existencia de una tasa evolutiva muy similar o incluso más rápida de los genes que controlan las interacciones gaméticas, comparada con la tasa de cambios de base compensatorios en las regiones conservadas de los dominios C y D<sub>1</sub> en ITS2 (Coleman, 2000, 2009).

Para detectar e identificar los CBCs y hemi-CBCs, las secuencias de *Calomela* asociadas a sus estructuras secundarias se analizaron con el programa CBCAnalyzer (Wolf *et al.*, 2005) y con la opción *CBC Matrix* implementada en el programa 4SALE 1.5. Para evaluar la relación existente entre el número de CBCs y el grado de divergencia evolutiva en las especies de *Calomela*, se calcularon las distancias

patrísticas a partir de los árboles obtenidos en los análisis filogenéticos, es decir, la suma de las longitudes de las ramas que conectan a dos linajes en un árbol filogenético, y que representa por tanto una medida del cambio filogenético acumulado entre los mismos a lo largo de su historia evolutiva. La matriz de distancias patrísticas se obtuvo utilizando el programa PATRISTIC 1.0 (Fourment y Gibbs, 2006).

#### 4.2.3.10.- Selección de modelos evolutivos y de la estrategia de partición de datos

Se estimó el modelo evolutivo que mejor se ajustaba a la variación observada en cada marcador molecular individual y a diferentes esquemas de subdivisión de los mismos mediante el criterio de información de Akaike (AIC; Akaike, 1974) y utilizando jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). En el caso de los genes codificantes para proteína (*i.e.*, *cox1* y *CAD*) se establecieron tres esquemas de partición de secuencias en función de sus posiciones de codón: (i) primeras / segundas / terceras posiciones de codón, (ii) primeras y segundas posiciones / terceras posiciones, y (iii) gen sin subdividir. Respecto a los genes ribosomales (*i.e.*, *ITS2* y *LSU*), los subconjuntos de datos fueron establecidos en función de su estructura secundaria. Las secuencias de *ITS2* quedaron divididas del siguiente modo: (i) bucles compartidos por todos los taxones / tallos compartidos por todos los taxones / bucles y tallos no compartidos por todos los taxones, y (ii) gen sin subdividir. En relación con las secuencias *LSU*, al tratarse de un fragmento del gen, algunas regiones de las secuencias quedaron sin emparejar en las estructuras secundarias. Esto, junto con la elevada homología estructural detectada en todas las especies estudiadas para dicho marcador, propiciaron el siguiente esquema de partición: (i) bucles / tallos / regiones no apareadas, y (ii) secuencias sin subdividir.

Las estrategias de partición fueron analizadas del modo que se describe en el apartado 3.3.4.2 (página 33).

Tras determinar la mejor estrategia de partición para cada gen, se llevó a cabo un análisis combinando los alineamientos de los distintos marcadores con el programa Phyutility (Smith y Dunn, 2008) y dividiendo el alineamiento resultante en las siguientes particiones: (i) partición por marcador, (ii) por marcador, cada uno de ellos con su mejor estrategia de partición individual, (iii) marcadores nucleares / marcadores mitocondriales, (iv) ADN codificante para proteína / ADN no codificante, (v) primeras posiciones de codón / segundas posiciones / terceras posiciones / bucles ribosomales

/ tallos ribosomales / bucles y tallos ITS2 no compartidos por todos los taxones / posiciones no apareadas LSU, (vi) primeras posiciones de codón / segundas posiciones / terceras posiciones / tallos ITS2 compartidos por todos los taxones / bucles ITS2 compartidos por todos los taxones / tallos y bucles ITS2 no compartidos por todos los taxones / tallos LSU / bucles LSU / posiciones no apareadas LSU, (vii) igual que la partición “v” pero agrupando primeras y segundas posiciones de codón, y (viii) igual que “vi” pero agrupando primeras y segundas posiciones de codón. Los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaron a cada una de estas particiones del conjunto combinado de marcadores fueron escogidos empleando jModelTest 0.1.1. GARLI-PART v.0.97 (Zwickl, 2006) se utilizó para calcular los valores de log-likelihood correspondientes a cada estrategia para luego calcular sus respectivos valores de AIC, AICc y BIC.

#### 4.2.3.11.- *Congruencia entre marcadores moleculares*

La congruencia filogenética entre los cuatro marcadores moleculares se evaluó siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 3.3.4.1 (página 32).

#### 4.2.3.12.- *Análisis filogenéticos*

La inferencia filogenética a partir de los esquemas de partición seleccionados fue llevada a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.4.3 (página 35). Las búsquedas bayesianas consistieron en un total de  $10^7$  generaciones por análisis en los casos de los genes individuales, y  $3,5 \cdot 10^7$  generaciones para la matriz combinada de marcadores. Los árboles obtenidos con distintos métodos de inferencia filogenética a partir del mismo conjunto de datos fueron sometidos a un análisis comparativo para estimar el grado de similitud relativa entre las diferentes topologías resultantes, siguiendo para ello la metodología descrita en el apartado 3.3.4.4 (página 36).

Para evaluar la monofilia de determinados taxones, se diseñaron hipótesis filogenéticas alternativas basadas en la translocación forzada de ramas a partir del árbol original, para luego ser comparadas mediante las pruebas estadísticas Shimodaira-Hasegawa (SH; Shimodaira y Hasegawa, 1999) y Expected Likelihood

Weights (ELW; Strimmer y Rambaut, 2002) implementadas en el programa TreePuzzle v.5.2 (Schmidt *et al.*, 2002).

#### 4.2.3.13.- *Reloj molecular*

Al no disponerse de registro fósil ni de eventos geológicos contrastados para calibrar la filogenia molecular de *Calomela*, se utilizó la edad del nodo correspondiente al ancestro común más reciente entre el grupo externo *Callidemum parryi* y el clado de *Calomela*. Dicha edad, calculada en el capítulo anterior, se ajustó a una distribución normal con un valor medio de 27,86 Ma y una desviación estándar de 2,73 Ma (intervalo de confianza al 95% = 33,55 - 22,56 Ma). Al utilizar la distribución normal con su desviación estándar asociada, se acomodan en el análisis las desviaciones con respecto al valor medio asociadas al error estocástico de muestreo de cambios nucleotídicos (Ho y Phillips, 2009). Los análisis de datación molecular fueron llevados a cabo siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.3.4.5 (página 37), y especificando un límite de  $4 \cdot 10^7$  generaciones para cada una de las dos cadenas MCMC independientes.

#### 4.2.3.14.- *Tasas de diversificación*

Las tasas y patrones de diversificación se analizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.4.6 (página 37). Para la realización del test MCCR con el módulo gammatest del paquete de R PHYTOOLS se simularon 500 árboles con 45 terminales (el equivalente al número de especies de *Calomela*; Reid, 2006), y a continuación se podaron ramas al azar hasta generar árboles con quince especies (las mismas que en el muestreo real). Por otro lado, con el fin estudiar el ajuste de los datos a varios modelos de especiación, la historia evolutiva de *Calomela* se dividió en dos tramos contiguos diferenciables a partir de la gráfica LTT (ver sección de resultados). Los modelos de diversificación más apropiados para cada una de estas etapas se estimaron siguiendo el protocolo especificado en el apartado 3.3.4.6 (página 37). Las tasas de diversificación decrecientes en el tiempo pueden deberse a una disminución progresiva de la tasa de especiación o a un incremento en la tasa de extinción (Rabosky y Lovette, 2008a, 2008b). Para evaluar estos escenarios, se analizó el ajuste de la filogenia de *Calomela* a los tres modelos descritos por Rabosky y Lovette (2008b) e implementados en el paquete de R LASER (Rabosky, 2006b). El

modelo SPVAR permite que las tasas de especiación varíen en el tiempo mientras que las de extinción permanecen constantes, mientras que el modelo EXVAR mantiene fijas las de especiación y permite cambios en las de extinción. El modelo BOTHVAR permite la variación de ambas tasas en el tiempo.

#### 4.2.3.15.- Señal filogenética de los marcadores moleculares

La información filogenética de cada uno de los cuatro marcadores moleculares para cada instante de la historia evolutiva de las especies de *Calomela* se analizó siguiendo el procedimiento descrito en apartado 3.3.4.7 (página 39). En el primero de los análisis se calculó la señal filogenética de los cuatro marcadores por separado, mientras que en el segundo se hizo lo propio para la información filogenética contenida en cada una de las diez particiones que constituyen el esquema óptimo de partición de los datos.

#### 4.2.3.16.- Análisis poblacionales

Las especies de *Calomela* con individuos procedentes de tres o más localidades de muestreo se sometieron a un análisis poblacional basado en sus secuencias *cox1*, por ser éste el marcador con mayor variabilidad intraespecífica y el disponible para más individuos (75) de entre los cuatro estudiados. Además, siendo un gen mitocondrial no se ve afectado por recombinación génica y cada individuo posee un único haplotipo.

Se calculó el número de haplotipos, la diversidad nucleotídica y haplotípica, y el índice de fijación  $F_{ST}$  usando DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009). También se evaluaron las posibles desviaciones con respecto al espectro de distribución de frecuencias mutacionales bajo un modelo neutro de evolución (test de neutralidad). Para ello se realizó el test  $R_2$  de Ramos-Onsins y Rozas (2002) realizando 10000 réplicas y asumiendo ausencia de recombinación. Dicho test compara el número de mutaciones exclusivas de un solo haplotipo (*singletons*) con el promedio de diferencias nucleotídicas en los datos alineados, ofreciendo un método para la detección de procesos de expansión poblacional. Se ha demostrado que para tamaños de muestra reducidos (como los nuestros), el comportamiento del test  $R_2$  es superior al del resto de pruebas de neutralidad (Ramos-Onsins y Rozas, 2002).

La existencia de aislamiento genético por distancia geográfica se evaluó mediante un test de Mantel con el programa IBD: Isolation By Distance (Bohonak, 2002) realizando 10000 permutaciones al azar. Esta prueba estadística verifica si una determinada matriz de distancias genéticas está correlacionada con otra matriz de distancias geográficas y la significación estadística de esta correlación generando una distribución nula mediante el intercambio aleatorio de filas y de columnas en una de las matrices mientras que la otra se mantiene constante. Las matrices de distancia genética interpoblacionales en *Calomela* se calcularon utilizando distancias promedio no corregidas (*p-distance*) entre los individuos de cada par de poblaciones mediante la opción “*compare between groups means*” implementada en el programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). Las matrices de distancia geográfica se obtuvieron a partir de las coordenadas UTM tomadas en las localidades de muestreo y expresadas en kilómetros.

El programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) se utilizó para estimar las genealogías *cox1* de las especies con dos o más individuos secuenciados, así como para la representación gráfica de sus redes haplotípicas.

#### 4.2.3.17.- Utilidad de los marcadores moleculares en la identificación de especies

La capacidad diagnóstica de especies se evaluó para cada uno de los cuatro marcadores moleculares estudiados mediante dos tipos de aproximaciones basadas en criterios de tipo filogenético y fenético, respectivamente. En relación a las primeras, se estudió la capacidad de los marcadores para agrupar a las especies morfológicas como clados monofiléticos diferenciados y divergentes entre sí en los árboles filogenéticos. Por otro lado, se llevó a cabo una estrategia de tipo fenético comparable a la utilizada en el ámbito del *DNA barcoding*, no con el objeto de suplantarla ni de competir con ella, sino con la finalidad de complementarla y sentar las bases de un sistema de identificación molecular específico para el género *Calomela* más completo y diverso. Para ello se ejecutaron tres aproximaciones diferentes:

(1) Se calculó la razón entre la divergencia interespecífica mínima no corregida ( $d_{\min\_inter}$ ) y la distancia intraespecífica máxima ( $d_{\max\_intra}$ ) para cada marcador molecular utilizando PAUP\* 4.0. Para el cálculo de las últimas, únicamente se consideraron aquellas especies con dos o más individuos secuenciados. Una razón positiva

$d_{\min\_inter}/d_{\max\_intra}$  se interpretó como existencia de lo que en el ámbito del *barcoding* se conoce como *barcoding gap*, y cuya dimensión equivale al valor del cociente.

(2) Se analizó la agrupación de secuencias en *clusters* en un árbol *Neighbor-Joining* para cada uno de los marcadores moleculares. Se ejecutaron 100 réplicas de tipo *bootstrap* en MEGA 3.1. Para el análisis no se consideró ningún modelo de evolución nucleotídica, empleándose las distancias no corregidas a fin de comparar los datos exclusivamente bajo un criterio de similitud y sin ningún tipo de supuesto sobre la evolución de las secuencias. Los estados de carácter indeterminados y los huecos de alineamiento se eliminaron en el proceso de comparación de secuencias.

(3) Se obtuvo una idea gráfica de las similitudes relativas de todas las secuencias incluidas en nuestro trabajo, mediante un análisis de escalamiento multidimensional (EMD) con el programa PASW Statistics 18 (IBM Company, 2009) siguiendo a Hebert *et al.* (2003). El análisis EMD proporciona un mapa en el espacio euclídeo que facilita la evaluación visual de la similitud relativa entre una serie de objetos sometidos a comparación. La técnica aborda el problema de representar un conjunto de muestras multidimensionales (en el caso de secuencias de ADN alineadas, existen tantas dimensiones como posiciones nucleotídicas tiene el alineamiento) en un espacio de menor dimensión (p.ej., dos). Aplicado a secuencias de ADN, EMD tiene la ventaja de que representa secuencias genéticamente intermedias entre otras también en una posición intermedia, en lugar de forzarlas a agruparse como sucede en los métodos jerárquicos (Hebert *et al.*, 2003). Para el análisis EMD se construyó una matriz de distancias para las secuencias de cada marcador molecular tratando a cada posición en el alineamiento como un carácter separado y a las bases ambiguas como datos indefinidos. La información de las secuencias se recodificó utilizando las siguientes variables establecidas arbitrariamente: A=1, C=2, G=3, T=4, gap=5, N=?.

#### 4.2.3.18.- *Caracteres morfológicos*

Se analizaron 19 caracteres morfológicos categóricos y uno de tipo continuo, incluyendo entre ellos los utilizados comúnmente en la literatura taxonómica de *Calomela*. Los estados de carácter se codificaron para las 15 especies de *Calomela* incluidas en este estudio, además de para el grupo externo *Callidemum parryi*. Se evaluó si la distribución de estados de carácter mostraba una estructura jerárquica,



comparando su distribución en el árbol de especies con una distribución nula obtenida intercambiando aleatoriamente los estados de carácter entre terminales. Para no sobreestimar el grado de significación de la estructura filogenética, se incluyó en el árbol un único representante por especie de *Calomela*. La optimización de los caracteres y los análisis de permutación de los datos se realizaron con el programa Mesquite 2.75 (Maddison y Maddison, 2011). Se asumió significación estadística si el número de pasos para un carácter dado sobre la filogenia molecular de *Calomela* se situaba por debajo del 5% del número de pasos de carácter obtenidos tras realizar 10000 aleatorizaciones ( $P < 0,05$ ). El ajuste de cada uno de los caracteres a la filogenia molecular se cuantificó mediante la obtención de los índices de consistencia (IC) y de retención (IR) con el programa MacClade 4.08a (Maddison y Maddison, 2005). Mesquite 2.75 se utilizó además para llevar a cabo la inferencia de los estados ancestrales de los caracteres bajo el criterio de parsimonia. La utilidad de los caracteres para la organización sistemática de las especies del género *Calomela* se evaluó en función de su consistencia con el resto de los datos y su capacidad para discriminar linajes monofiléticos.

#### 4.2.3.19.- Asociaciones con plantas hospedadoras

Se realizó un estudio preliminar sobre la evolución de las relaciones tróficas entre las especies de *Calomela* y de las de su hospedador *Acacia*. Para ello, se efectuó primero una búsqueda bibliográfica de registros tróficos a la que se agregaron las asociaciones tróficas inéditas proporcionadas para este estudio por el Dr. C.A.M. Reid (Australian Museum, Sydney). Los nombres de las especies hospedadoras de *Acacia* se contrastaron con la base de datos *International Legume Database and Information Services* (ILDIS; <http://www.ildis.org>) y se actualizaron cuando fue necesario. Por otra parte, también se recopiló la información publicada relativa a sus respectivos hábitats y distribuciones, utilizando para ello las bases de datos *Flora of New South Wales* (FNSW), *FloraBase: the Western Australia Flora* (FBWAF) y Maslin (2001).

A fin de analizar la existencia de patrones resultantes de coevolución entre los linajes de *Calomela* y sus plantas hospedadoras se procedió a la comparación gráfica entre los árboles filogenéticos de ambos grupos de organismos utilizando el programa TreeMap 3 (Charleston y Robertson, 2002). Como paso previo se infirió el árbol evolutivo de las especies de *Acacia* basándose en las filogenias publicadas por

Murphy *et al.* (2010) y Miller *et al.* (2011), junto con la información taxonómica disponible en Maslin (2001). Para ello se descartaron las especies de *Acacia* cuya posición sistemática no se logró identificar.

La existencia de estos patrones se examinó adicionalmente mediante un análisis filogenético bajo el criterio de parsimonia en el programa PAUP\* 4.0 y a partir de una matriz binaria representando la anterior tabla de asociaciones tróficas (0 = ausencia de relación trófica; 1 = presencia de relación trófica). A esta matriz se le añadió como grupo externo una secuencia artificial donde todas las posiciones se encontraban en estado "0". Todos los caracteres recibieron igual peso, y cada análisis consistió en una búsqueda de tipo heurístico compuesta por 10000 réplicas con adición de terminales al azar y usando la estrategia TBR de exploración del espacio de árboles. Tras finalizar cada uno de los análisis se elaboró un árbol consenso estricto a partir de todas las soluciones topológicas óptimas obtenidas durante la búsqueda.

#### 4.2.3.20.- Corología de las especies de *Calomela*

Se investigaron las asociaciones de las especies de *Calomela* estudiadas con los diferentes biomas australianos: árido, ombroclima húmedo, monzónico y esclerófilo templado (Crisp y Cook, 2004, 2013). Al no existir bibliografía al respecto, se solicitó la información al especialista en crisomelinos australianos C.A.M Reid (Tabla 4.2-2). La corología actual se utilizó para inferir los estados ancestrales de las asociaciones con los diferentes biomas bajo el criterio de parsimonia con el programa Mesquite 2.75.

Especie	Bioma
<i>C. aff. acaciae</i>	A
<i>C. aff. tarsalis</i>	M
<i>C. bartoni</i>	E
<i>C. curtisi</i>	E
<i>C. fugitiva</i>	O
<i>C. fulvilabris</i>	A/M
<i>C. ioptera</i>	E
<i>C. juncta</i>	E
<i>C. maculicollis</i>	E
<i>C. pallida</i>	E/M
<i>C. parilis</i>	E
<i>C. pulchella</i>	O/E
<i>C. ruficeps</i>	O/E
<i>C. satelles</i>	A/E
<i>C. vittata</i>	E

**Tabla 4.2.2.** Distribución por biomas (*sensu* Crisp *et al.* 2004) de las 15 especies de *Calomela* estudiadas. Fuente: C.A.M Reid, Australian Museum, Sydney. A: árido, E: esclerófilo templado, M: monzónico, O: Ombroclima húmedo.

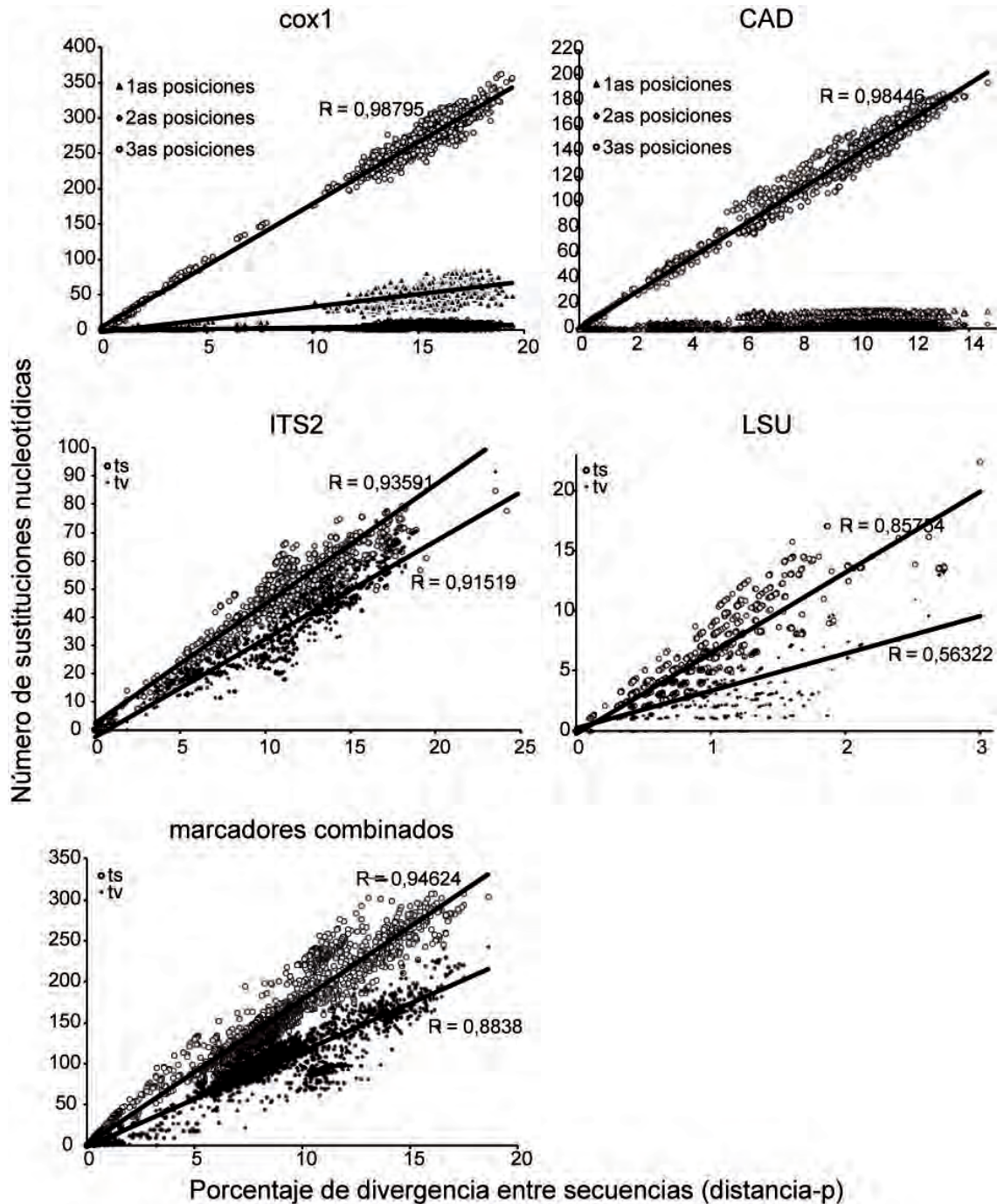
#### 4.2.4.- Resultados

##### 4.2.4.1.- Diversidad y divergencia de las secuencias

La tabla 4.2-3 resume los análisis estadísticos relacionados con la diversidad y divergencia de las secuencias de cada uno de los cuatro marcadores moleculares estudiados. El alineamiento con mayor proporción de posiciones informativas fue el de *cox1* (34%), seguido de cerca por ITS2 (25,7%) y CAD (23,6%), y lejos de los reducidos valores detectados para LSU (2,9%). En relación con el marcador ITS2, sus secuencias completas oscilaron entre 451 y 559 nt de longitud, un tamaño que es muy similar al descrito para otros géneros de la misma subfamilia de escarabajos crisomélidos (Gómez-Zurita *et al.*, 2000). La longitud final de su alineamiento fue de 752 nt, debiéndose estas diferencias en longitud a la elevada proporción de SSRs de entre 1 y 6 pb, además de a la existencia de regiones de inserción-delección propias de los diferentes linajes evolutivos distribuidos a lo largo del alineamiento en las posiciones 109-157, 194-249, 277-431, y 496-727. Todas las pruebas Chi-Cuadrado para la homogeneidad de las frecuencias nucleotídicas generaron resultados no significativos, sugiriendo que se mantienen conservadas sin diferencias significativas en todas y en cada una de las secuencias de los alineamientos. El sesgo en cuanto a la composición nucleotídica fue alto en los dos marcadores mitocondriales, reflejando el exceso en bases A+T típico del ADN mitocondrial de animales (Brown, 1985). Los análisis de saturación mutacional demostraron ausencia de la misma en todos los casos (Figura 4.2-3), incluyendo las terceras posiciones de codón de los marcadores codificantes donde la tasa de cambio es considerablemente más elevada (Kimura, 1981): *cox1*,  $Y = 17,452X$ ,  $R^2 = 0,99$ ; CAD.  $Y = 13,75X$ ,  $R^2 = 0,98$ .

	cox1	CAD	ITS2	LSU
Secuencias obtenidas	75	67	66	69
Nº de especies secuenciadas	16	15	16	14
Longitud del alineamiento (nt.)	718	480	752	982
Posiciones variables	261	138	233	39
Posiciones informativas	246	113	193	29
Composición nucleotídica (T:C:A:G)	0,38:0,16:0,30:0,16	0,25:0,22:0,3:0,23	0,29:0,21:0,25:0,25	0,22:0,25:0,22:0,31
Prueba Chi-Cuadrado <sup>a</sup>	$\chi^2=136,69$ ; $P>0,99$ ;	$\chi^2=29,107$ ; $P=1,00$ ;	$\chi^2=46,74$ ; $P=1,00$ ;	$\chi^2=16,91$ ; $P=1,00$ ;
Sesgo (C) ( <i>sensu</i> Irwin, 1994)	0,24	0,07	0,05	0,08
<i>p-distance</i> media global (d. est.)	0,136 (0,008)	0,082 (0,006)	0,104 (0,008)	0,007 (0,002)

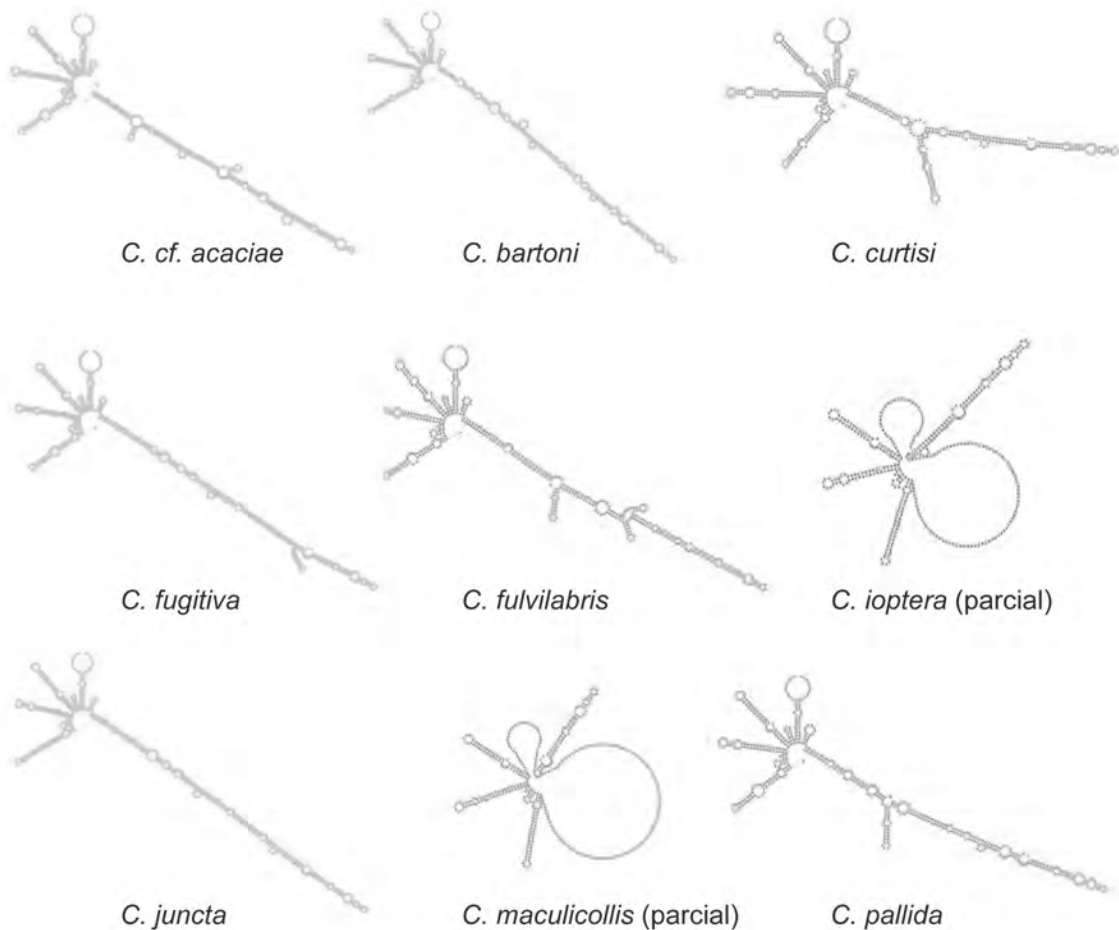
**Tabla 4.2-3.** Resumen de los análisis estadísticos relacionados con diversidad y divergencia de las secuencias para cada uno de los cuatro marcadores moleculares estudiados. a = Prueba de la Chi-Cuadrado para la homogeneidad de las frecuencias nucleotídicas ejecutada en PAUP\* 4.0



**Figura 4.2.3.** Gráficas de saturación de sustituciones nucleotídicas no corregidas para cada uno de los cuatro marcadores analizados y para la matriz combinada de las mismas. En el caso de los genes codificantes para proteína se muestran las curvas de saturación individualizadas por posiciones de codón. En el resto de marcadores y en el alineamiento combinado se distinguió entre transiciones y transversiones.

## 4.2.4.2.- Estructura secundaria de las secuencias ITS2

La figura 4.2-4 muestra las estructuras secundarias ITS2 obtenidas para las diferentes especies de *Calomela*. Todas las secuencias ITS2 de *Calomela* mostraron idénticas regiones flanqueantes y perfectamente complementarias de 5,8S y LSU (Figura 4.2-5). Al igual que ocurre en otras especies de Coleoptera (e.g., *Timarcha*, Chrysomelinae: Gómez-Zurita *et al.*, 2000; *Meligethes*, Nitidulidae: Trizzino *et al.*, 2009) y en otros grupos taxonómicos más divergentes tales como hongos y vertebrados (Joseph *et al.*, 1999), la estructura secundaria general encontrada para *Calomela* mostró una larga hélice (Dominio D<sub>1</sub>) entre las posiciones 262 y 706 del alineamiento de las secuencias ITS2, además de una hélice corta adicional (D<sub>2</sub>) muy próxima a su extremo 3' (Figura 4.2-6).



**Figura 4.2-4.** Plegamientos secundarios ITS2 de las 15 especies de *Calomela* estudiadas. Las estructuras de las especies *C. ioptera* y *C. maculicollis* son parciales al no haberse obtenido sus secuencias ITS2 completas (Continúa en la página siguiente).

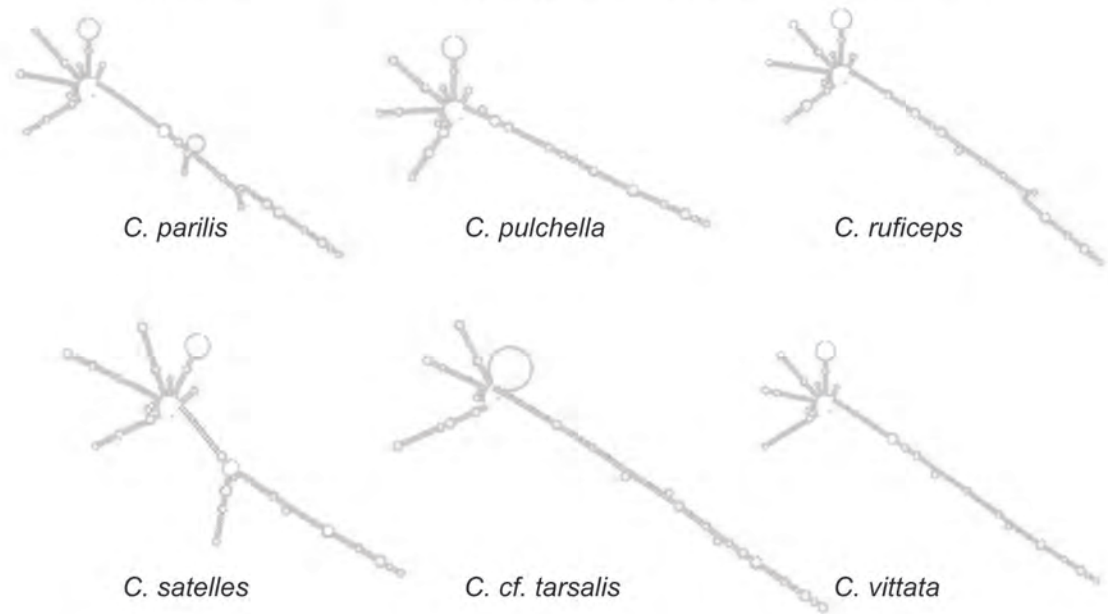


Figura 4.2-4. (continuación)

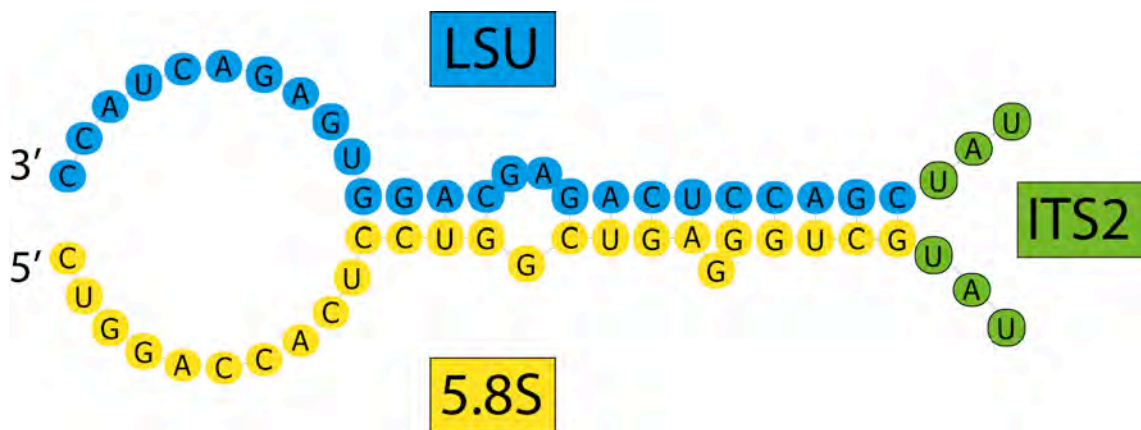
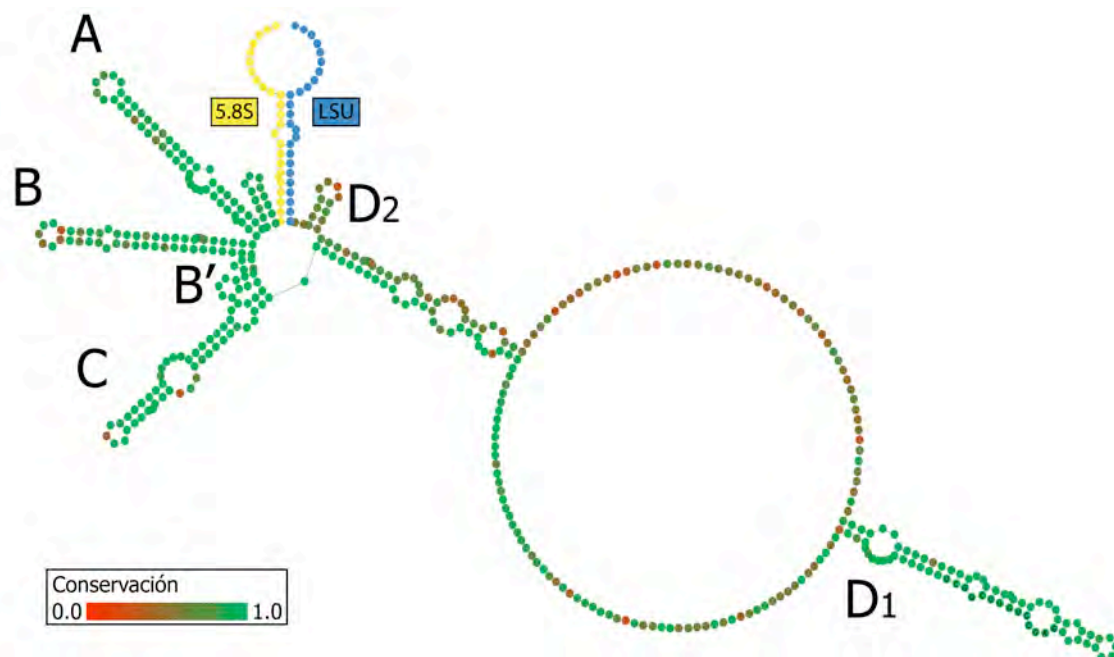


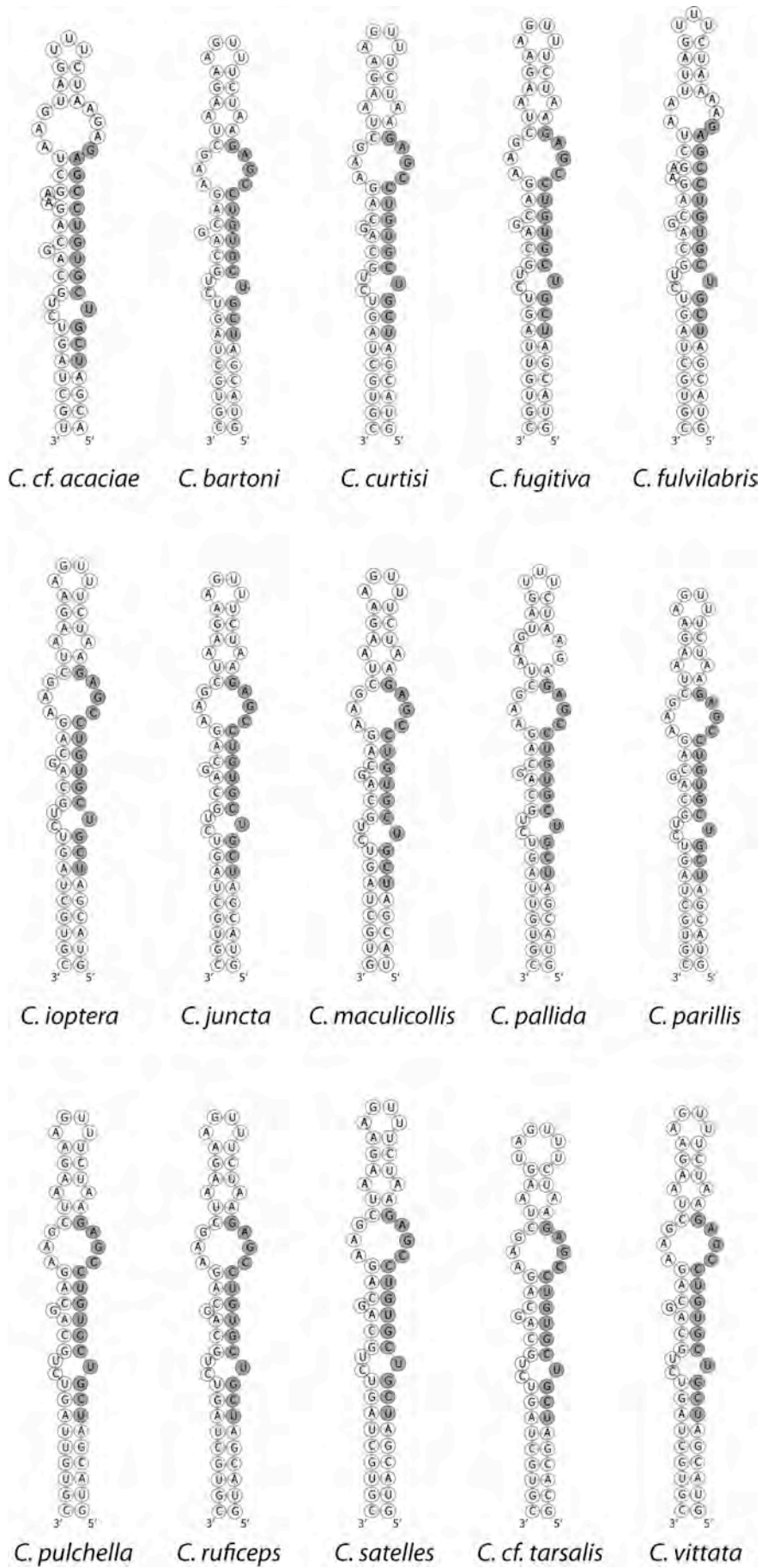
Figura 4.2-5. Patrón de hibridación típico entre el extremo 3' del gen 5.8S y el extremo 5' del gen LSU obtenido en todos los ejemplares de *Calomela*.



**Figura 4.2-6.** Estructura secundaria ITS2 consenso de las 15 especies de *Calomela* estudiadas. Los dominios se han nombrado siguiendo a Gómez-Zurita *et al.* (2000).

La porción 5' próxima al ápice de la horquilla del dominio D<sub>1</sub> incluye un fragmento de secuencia muy conservado y que parece ser característico de cada grupo taxonómico (Coleman, 2007), como por ejemplo se ha demostrado en vertebrados (Joseph *et al.*, 1999) o entre diferentes géneros de coleópteros crisomélidos (Gómez-Zurita *et al.*, 2000). Las secuencias de *Calomela* mostraron en dicha región un fragmento conservado de 14 nt (5'-UCGUCGUGUCCGAG-3') y aparentemente idéntico al que poseen el resto de especies de coleópteros (Figura 4.2-7) (Gómez-Zurita *et al.*, 2000; Coleman, 2007; Trizzino *et al.*, 2009). Para confirmar la presencia de dicho fragmento en otros géneros de Chrysomelinae, se descargaron de GenBank todas las secuencias ITS2 disponibles para este grupo taxonómico y se alinearon con MAFFT 5 utilizando la estrategia L-INS-i para obtener una secuencia consenso de cada género. La figura 4.2-8 demuestra la presencia y homogeneidad de este fragmento de 14 nt en los géneros *Calligrapha*, *Chrysolina*, *Cyrtonus*, *Oreina* y *Timarcha*, además de en las secuencias obtenidas en este estudio para *Callidemum* y *Calomela*.



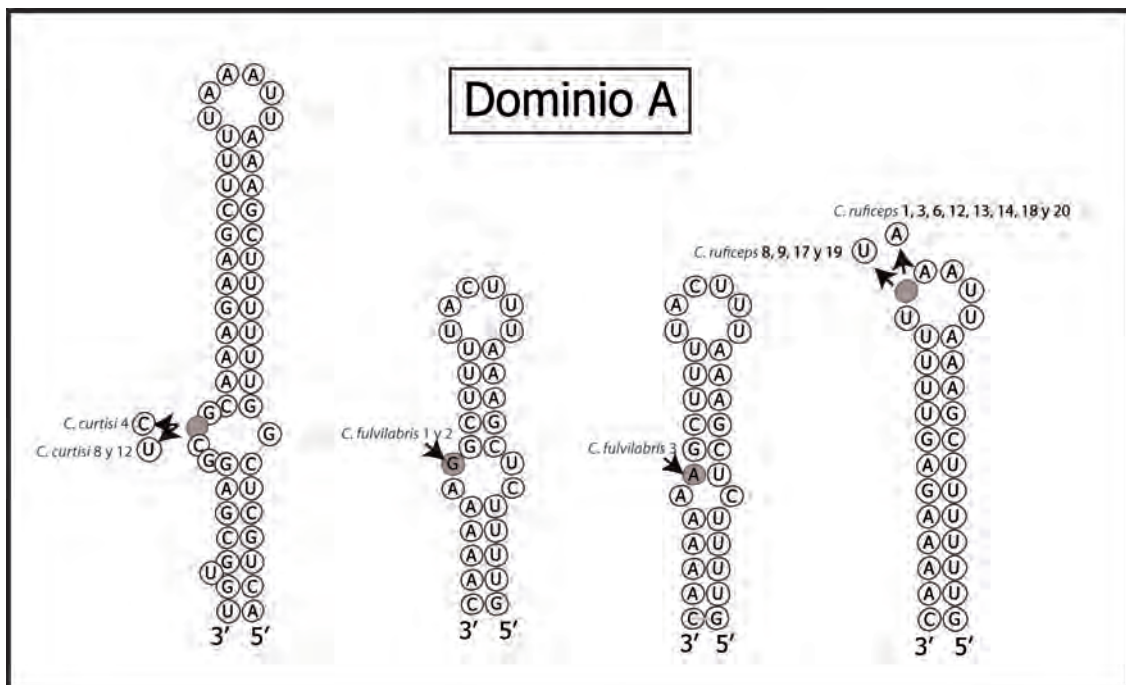


4.2-7. Estructuras secundarias ITS2 de los ápices del dominio D1 para las 15 especies de *Calomela* estudiadas mostrando la presencia del motivo 5'-UCGUGGUGUCCGAG-3' conservado en Coleoptera.

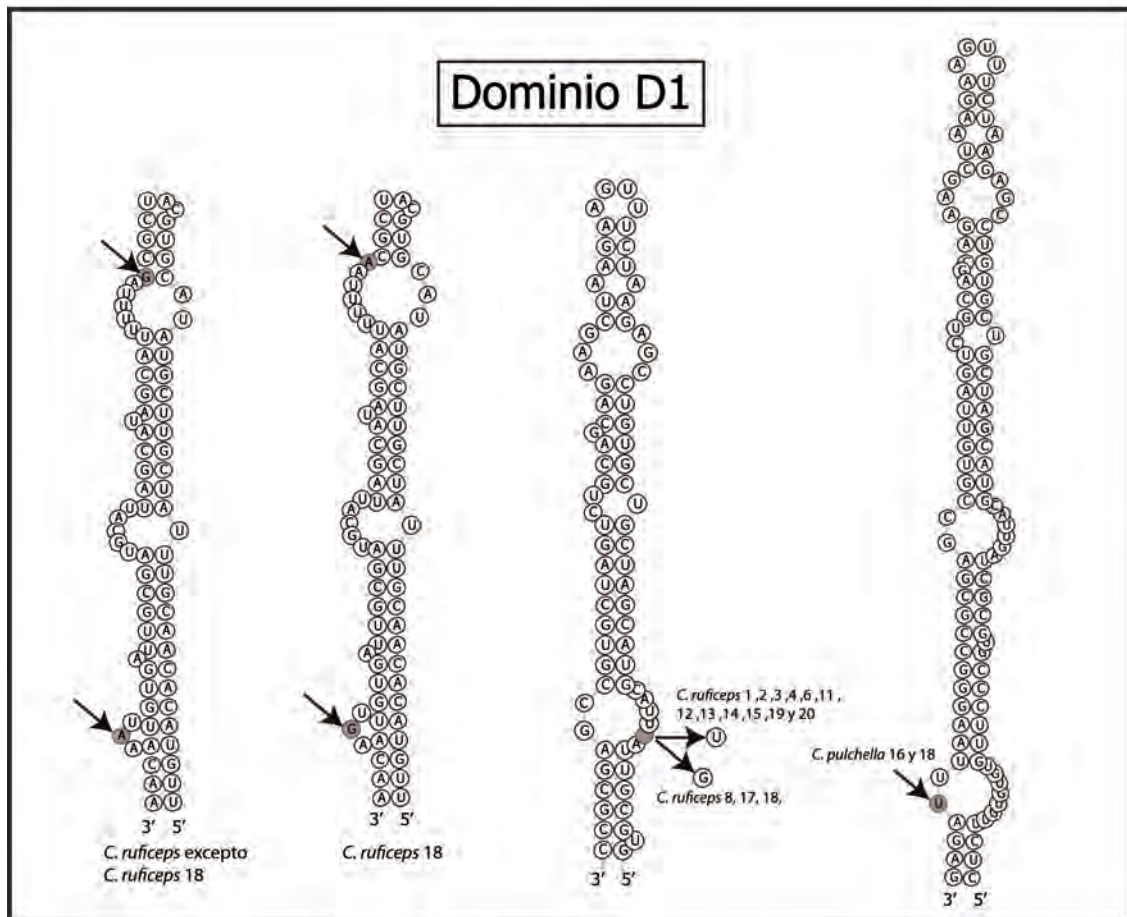
<i>Callidemum</i>	ACGTAC--- <b>GATCGTCGTGTCCGAGA</b> -----ATCTTTGA
<i>Calligrapha</i>	ACACAC--- <b>GATCGTCGTGTCCGAGA</b> ---AAATCTCTTT
<i>Calomela</i>	ACGTAC--- <b>GATCGTCGTGTCCGAGA</b> GAGAAATCTTTGA
<i>Chrysolina</i>	ACGCAC--- <b>GATCGTCGTGTCCGAGA</b> -----ATCTTTGT
<i>Cyrtonus</i>	ACGCACCAC <b>GATCGTCGTGTCCGAGA</b> -----ATCTTTGC
<i>Oreina</i>	ACGCAC--- <b>GATCGTCGTGTCCGAGA</b> -----ATCTTTGT
<i>Timarcha</i>	ACGTAC--- <b>GATCGTCGTGTCCGAGA</b> -----ATCTTTTT

**Figura 4.2-8.** Alineamiento de las secuencias consenso pertenecientes a la porción distal del dominio D<sub>1</sub> de *Calomela* junto a otros seis géneros de Chrysomelinae mostrando la conservación del fragmento de 14 pb (en negrita) típico de coleópteros.

Las estructuras secundarias de la distintas hélices (A, B, B', C, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>) se mantuvieron en general muy conservadas dentro de cada especie de *Calomela*, aunque se dieron algunas excepciones. Por ejemplo, se detectaron diferencias en el dominio A entre individuos de las especies *C. curtisi* (posición 81 del alineamiento), *C. fulvilabris* (pos. 73) y *C. ruficeps* (pos. 66), y en el dominio D<sub>1</sub> para *C. pulchella* (pos. 531) y *C. ruficeps* (pos. 430, 627 y 700) (Figura 4.2-9).



**Figura 4.2-9.** Representación gráfica de los polimorfismos intraespecíficos detectados en los dominios A y D1 de las estructuras secundarias ITS2 de *Calomela* (continúa en la página siguiente).



**Figura 4.2-9.** (continuación).

En la matriz de ITS2 se detectaron 44 regiones con SSRs (Tabla 4.2-4), de las cuales el 11,4% resultaron ser repeticiones compartidas por todas las especies de *Calomela*, el 38,6% fueron exclusivas de una sola especie y el 50% restante de un conjunto de especies. Las SSRs identificadas estuvieron integradas por repeticiones de 2-6 nucleótidos, siendo las de tipo dinucleotídico las más frecuentes y restringiéndose las hexanucleotídicas a un único caso en la especie *C. maculicollis*, donde se observó la SSR (GUCGUU)<sub>2</sub> en la posición 185 del alineamiento (Figuras 4.2-10 a 4.2-13). Las regiones con mayor acumulación de repeticiones fueron los dominios B y B', donde se identificaron respectivamente 17 y 14 posiciones con SSRs, la mayoría exclusivas de especie. Aunque en menor abundancia, los dominios A (ocho repeticiones) y D (siete repeticiones) también exhibieron SSRs, si bien en ambos casos, la mayoría fueron compartidas por varias o por todas las especies de *Calomela*. Respecto al corto dominio C no se detectó ninguna SSR, como sucede en otros grupos de coleópteros a niveles taxonómicos similares (e.g., Trizzino *et al.*, 2009).

Dominio	Posición	SSR	Especies e/o individuos
A	52	(UC) <sub>2</sub>	Fg, Fl
A	57	(AAUU) <sub>2</sub>	B, C, I, M, nA, nT, Pu, R 1, R 3, R, 6, R 12, R 13, R 14, R 18, R 20
A	58	(AAUU) <sub>2</sub>	Pal, R 8, R 9, R 17, R 19
A	59	(AUU) <sub>3</sub>	Cd
A	61	(UA) <sub>2</sub>	Par, V
A	72	(GA) <sub>2</sub>	Pu, R, Pal, Fg, nA, Cd
A	72	(GAA) <sub>2</sub>	M, C, S, Par, V
A	88	(GU) <sub>2</sub>	Todas las especies
B	104	(GU) <sub>2</sub>	Todas las especies
B	108	(CGU) <sub>4</sub>	C, S
B	108	(CG) <sub>2</sub>	M
B	118	(GU) <sub>2</sub>	C
B	121	(UC) <sub>2</sub>	B, Fl, I, J, M, nA, nT, Pal, Par, V
B	121	(GU) <sub>2</sub>	S
B	125	(UC) <sub>2</sub>	C, S
B	127	(UC) <sub>2</sub>	Fg
B	137	(GA) <sub>2</sub>	Fg
B	138	(AG) <sub>2</sub>	C, Fl, M, nT, Par, V
B	138	(AG) <sub>3</sub>	S
B	145	(AGC) <sub>2</sub>	M
B	146	(GCG) <sub>2</sub>	C, S
B	159	(CG) <sub>2</sub>	B, C, Fl, I, J, M, Par, Pu, R, S, V, Cd
B' y C	180	(AGC) <sub>2</sub> (CGUUU) <sub>2</sub> *	nA
B' y C	185	(CGUUU) <sub>2</sub>	Fl, Cd
B' y C	185	(CGUUU) <sub>2</sub> (UCG) <sub>2</sub> *	B, C, Fg, V, J, nT, Pal, Par, Pu, R, S
B' y C	185	(CGUUU) <sub>2</sub> (UCG) <sub>2</sub> (GUCGUU) <sub>2</sub> *	M
B' y C	195	(CGU) <sub>2</sub>	I
B' y C	208	(UG) <sub>2</sub> (GUC) <sub>2</sub> *	B, J, V
B' y C	208	(UC) <sub>2</sub> (UCG) <sub>2</sub>	nT
B' y C	208	(UCG) <sub>2</sub>	I
B' y C	220	(UC) <sub>2</sub> (CGAA) <sub>2</sub> *	Fl
B' y C	227	(ACGA) <sub>2</sub>	B, I, J, V, C, M, Par, S
B' y C	227	(ACGA) <sub>2</sub> (AC) <sub>2</sub>	nA
B' y C	228	(CGAA) <sub>2</sub>	nA, B, C, Fg, Fl, I, M, J, Par, R, S, V, Cd
B' y C	229	(GAAC) <sub>2</sub>	nA, B, C, Fg, Fl, I, M, Pal, Pu, R, S, V, Cd
B' y C	232	(ACG) <sub>2</sub> (GACG) <sub>2</sub> *	nT
B' y C	241	(AG) <sub>2</sub>	Cd
B' y C	241	(AAAUG) <sub>2</sub>	S
B' y C	242	(GAA) <sub>2</sub>	Fg
D	441	(UCG) <sub>2</sub> (GU) <sub>2</sub> *	Todas las especies
D	452	(GA) <sub>2</sub>	Todas las especies
D	452	(GA) <sub>3</sub>	Pal, nA
D	465	(UGA) <sub>2</sub>	Pal, nA, nT
D	466	(GAA) <sub>2</sub>	B, C, Fg, I, J, M, Par, Pu, R, S, V, Cd
D	477	(GAC) <sub>2</sub>	Todas las especies
D	490	(UG) <sub>2</sub>	Fg, Pu, Pal

**Tabla 4.2-4.** Listado y posición de las repeticiones simples de secuencia (SSRs) detectadas en el alineamiento ITS2 de *Calomela*. \* = SSR solapante con la repetición anterior. Abreviaturas: B = *C. bartoni*, C = *C. curtisi*, Cd = *Callidemum parryi*, Fg = *C. fugitiva*, Fl = *C. fulvilabris*, I = *C. ioptera*, J = *C. juncta*, M = *C. maculicollis*, nA = *C. aff. acaciae*, nT = *C. aff. tarsalis*, Pal = *C. pallida*, Par = *C. parilis*, Pu = *C. pulchella*, R = *C. ruficeps*, S = *C. satelles*, V = *C. vittata*.



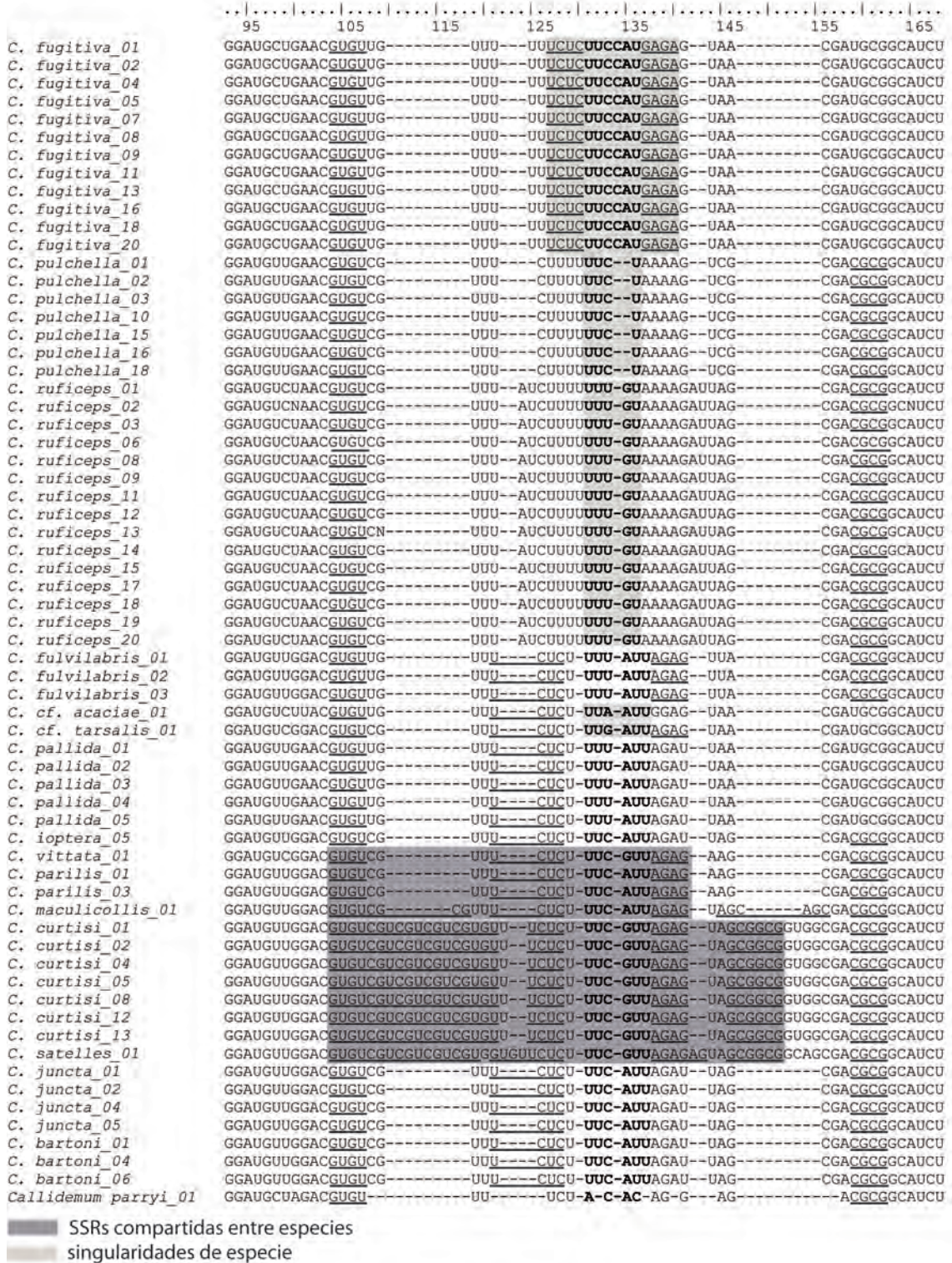
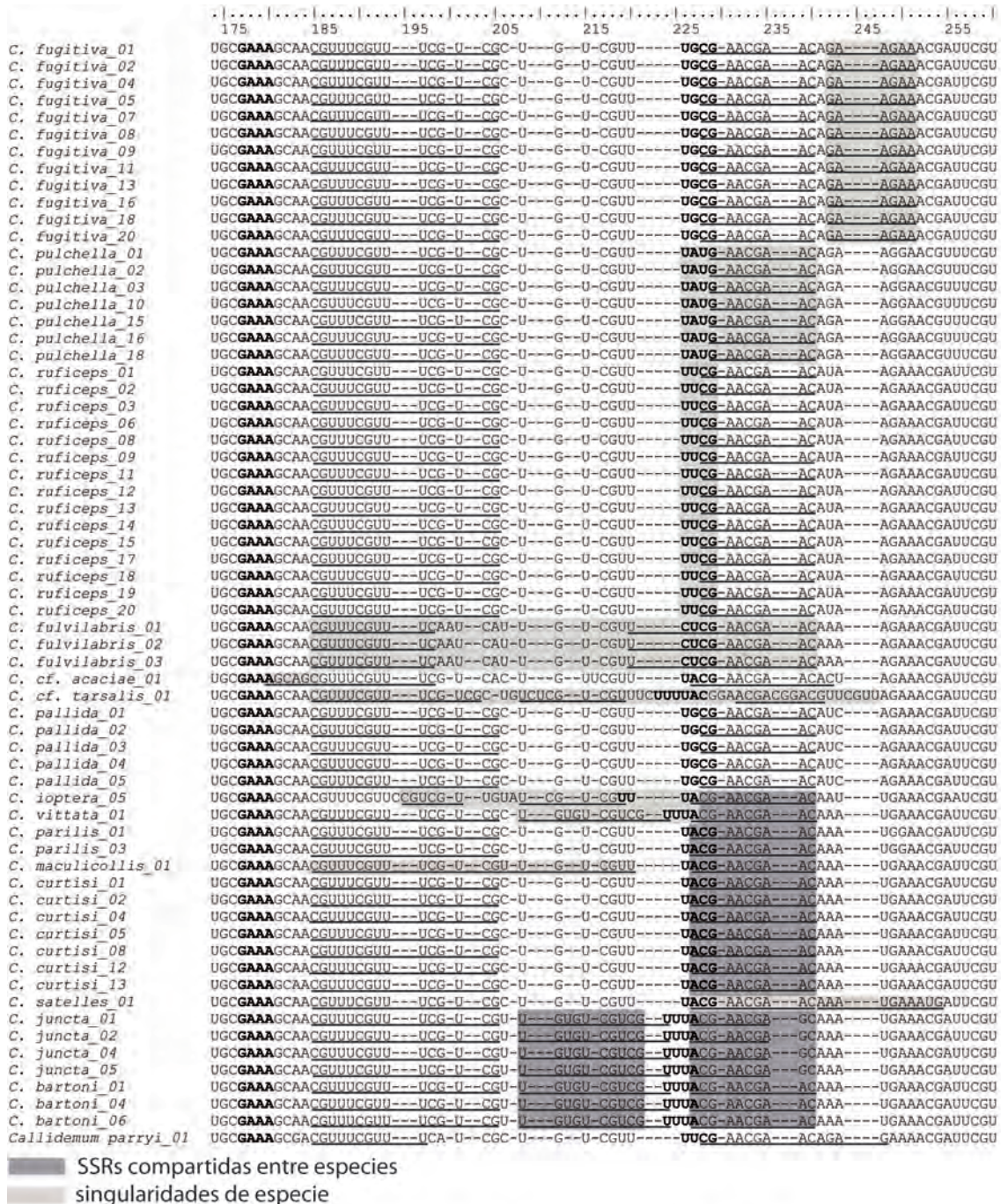
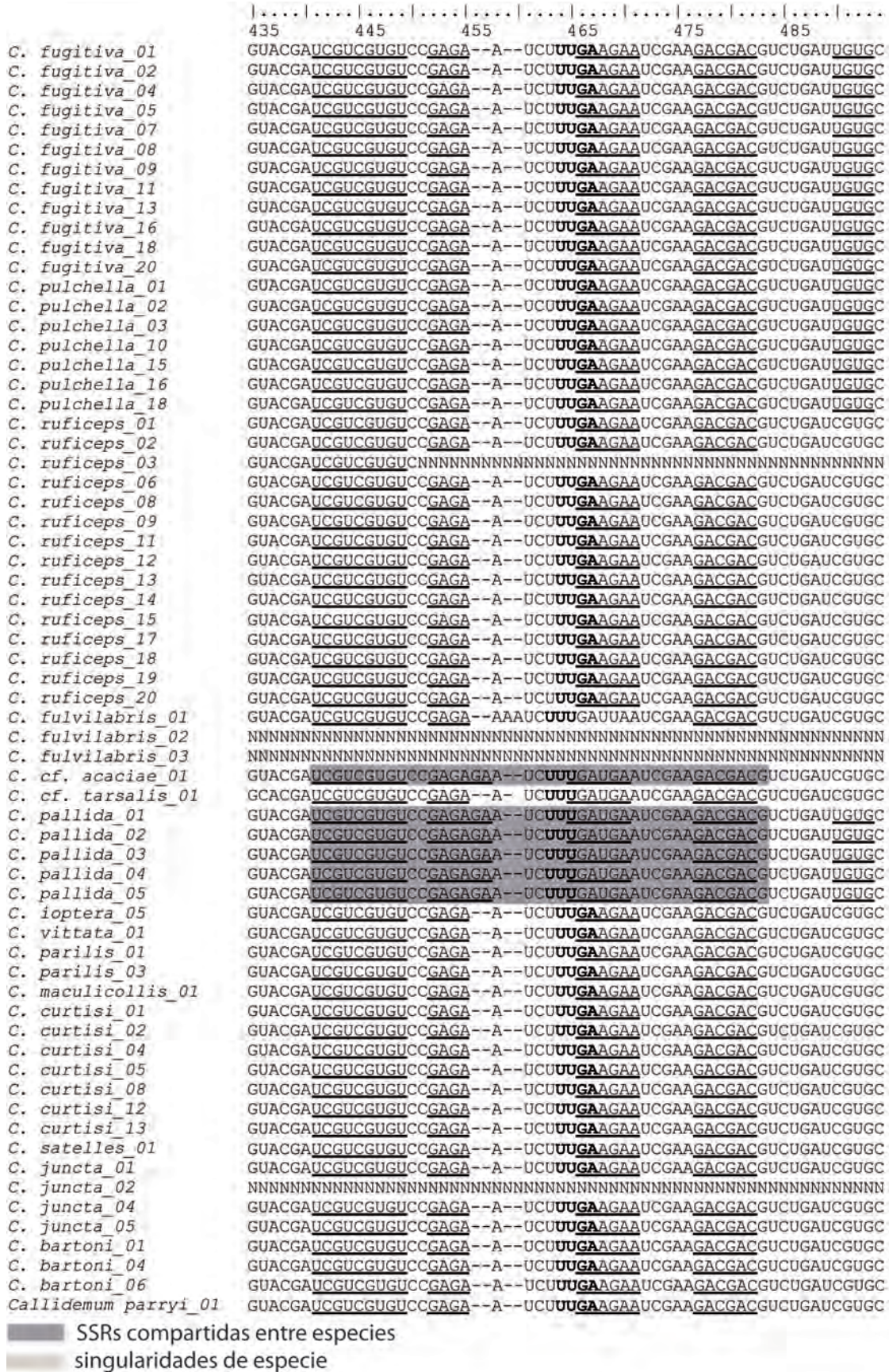


Figura 4.2-11. Alineamiento del dominio B de la estructura secundaria ITS2. Las posiciones que forman parte de los bucles terminales de las hélices aparecen en negrita. Las SSRs de indican mediante subrayado. En gris oscuro se marcan las SSRs compartidas entre especies. En gris claro se destacan las SSRs que son exclusivas de una especie.



**Figura 4.2-12.** Alineamiento de los dominios B' y C de la estructura secundaria ITS2. Las posiciones que forman parte de los bucles terminales de las hélices aparecen en negrita. Las SSRs de indican mediante subrayado. En gris oscuro se marcan las SSRs compartidas entre especies. En gris claro se destacan las SSRs que son exclusivas de una especie.



**Figura 4.2-13.** Alineamiento del dominio D de la estructura secundaria ITS2. Las posiciones que forman parte de los bucles terminales de las hélices aparecen en negrita. Las SSRs de indican mediante subrayado. En gris oscuro se marcan las SSRs compartidas entre especies. En gris claro se destacan las SSRs que son exclusivas de una especie.

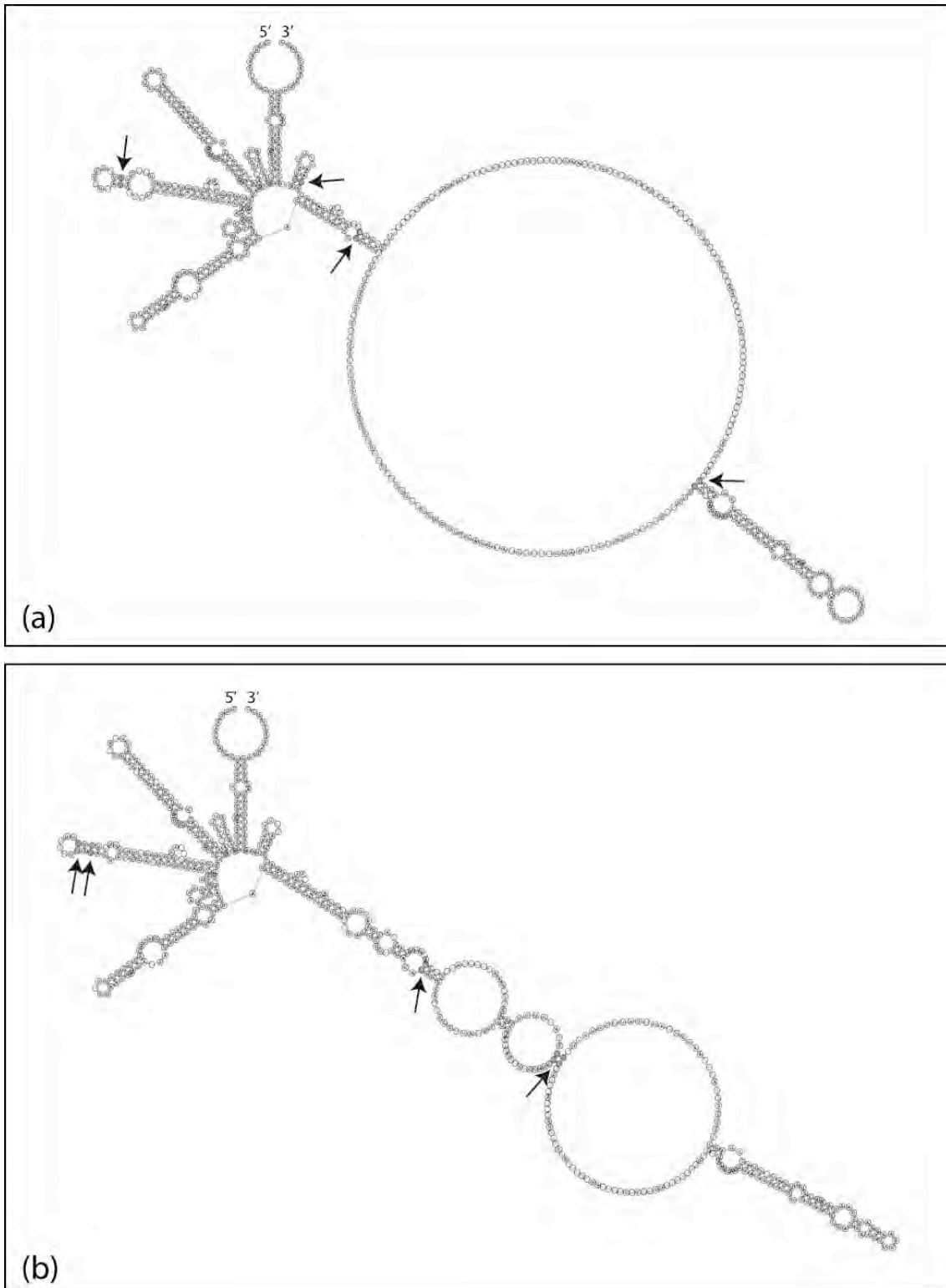


Las SSRs diagnósticas de especie se detectaron únicamente en los dominios B y B' (Tabla 4.2-4). Concretamente en el dominio B se observó la SSR (CG)<sub>2</sub> en la posición 108 de la matriz para la especie *C. maculicollis*, la repetición (GU)<sub>2</sub> en la posición 118 de *C. curtisi* y en la posición 121 de *C. satelles*, (UC)<sub>2</sub> en la posición 127 de *C. fugitiva*, (GA)<sub>2</sub> en la posición 137 de *C. fugitiva*, y (AGC)<sub>2</sub> en la posición 145 para *C. maculicollis*. Respecto al dominio B', se detectó una SSR de tipo compuesto (ACG)<sub>2</sub>(CGUUU)<sub>2</sub> en la columna 180 del alineamiento para la especie *C. aff. acaciae*, otra también compuesta (CGUUU)<sub>2</sub>(UCG)<sub>2</sub>(GUCGUU)<sub>2</sub> en la posición 185 de *C. maculicollis*, (CGU)<sub>2</sub> en la posición 195 para *C. ioptera*, (UC)<sub>2</sub>(UCG)<sub>2</sub> en la posición 208 de *C. aff. tarsalis*, (UCG)<sub>2</sub> en la posición 208 de *C. ioptera*, (UC)<sub>2</sub>(CGAA)<sub>2</sub> en la posición 220 de *C. fulvilabris*, (ACGA)<sub>2</sub>(AC)<sub>2</sub> en la posición 227 en *C. aff. acaciae*, (ACG)<sub>2</sub>(GACG)<sub>2</sub> en la posición 232 de *C. aff. tarsalis*, (AAAUG)<sub>2</sub> en la posición 241 de la especie *C. satelles*, y la SSR (GAA)<sub>2</sub> en la posición 242 de *C. fugitiva*.

La tabla 4.2-5 muestra los cambios de base compensatorios (CBCs y hemi-CBCs) en las secuencias ITS2. En el 64,8% de las comparaciones dos a dos entre especies se detectó al menos la ocurrencia de un CBC, y hasta un máximo de cinco CBCs. El valor modal del número de CBCs detectados fue de un CBC (38,1% de las observaciones) y la media se situó en 1,04 CBCs. Cuatro y cinco CBCs se obtuvieron únicamente al contrastar la estructura de *C. ruficeps* con las de las especies *C. pallida* y *C. fugitiva* (Figura 4.2-14). El número de hemi-CBCs osciló entre ninguno (*C. curtisi* vs. *C. vittata*) y 13 (*C. fugitiva* vs. *C. parilis*), situándose la moda en seis hemi-CBCs (12,4% de las comparaciones) y la media en 6,3 hemi-CBCs. En el 33,3% de las comparaciones realizadas entre especies se detectó al menos un CBC en los dominios C y D<sub>1</sub> de las estructuras secundarias ITS2, y hasta un máximo de tres como ocurre entre las parejas *C. fugitiva* - *C. ruficeps* y *C. fulvilabris* - *C. pallida* (Tabla 4.2-6). Todas las especies presentaron al menos un CBC con respecto a alguna de las demás especies, destacando el caso de la especie *C. fugitiva*, con CBCs en estas regiones respecto a 11 de las 14 especies con las que se comparó. En el otro extremo se situaron *C. curtisi* y *C. satelles*, ambas con un solo CBC con respecto a las demás especies. El análisis de correlación entre las distancias patrísticas interespecíficas extraídas de un árbol bayesiano de marcadores combinados y el número de CBCs en los dominios C y D<sub>1</sub> mostró una dependencia positiva entre ambas variables (Figura 4.2-15). La ocurrencia de CBCs entre especies de *Calomela* se incrementó con la distancia evolutiva que las separa, como ya sugirieron Müller *et al.* (2007) para una escala taxonómica mucho más amplia.

	<i>C. bartoni</i>	<i>C. cf. acaciae</i>	<i>C. cf. tarsalis</i>	<i>C. curtisi</i>	<i>C. fugitiva</i>	<i>C. fulvilabris</i>	<i>C. ioptera</i>	<i>C. juncta</i>	<i>C. maculicollis</i>	<i>C. pallida</i>	<i>C. parillis</i>	<i>C. pulchella</i>	<i>C. ruficeps</i>	<i>C. satelles</i>	<i>C. vittata</i>
<i>C. bartoni</i>	1	0	0	3	1	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1
<i>C. cf. acaciae</i>	11	1	1	2	1	0	1	0	0	0	2	3	1	1	1
<i>C. cf. tarsalis</i>	4	8	0	1	1	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0
<i>C. curtisi</i>	4	9	5	1	1	0	0	0	2	1	1	1	0	1	1
<i>C. fugitiva</i>	10	7	9	10	2	1	3	2	2	2	2	5	1	2	2
<i>C. fulvilabris</i>	6	7	6	5	6	0	1	0	3	1	3	3	1	1	1
<i>C. ioptera</i>	1	7	3	2	6	4	0	0	1	0	1	1	0	0	0
<i>C. juncta</i>	1	11	4	4	10	6	1	0	2	0	2	1	0	1	1
<i>C. maculicollis</i>	2	8	4	1	8	4	1	2	0	0	2	1	0	0	0
<i>C. pallida</i>	8	6	6	10	3	7	5	8	6	2	3	4	2	1	1
<i>C. parillis</i>	8	11	7	3	13	9	3	8	2	12	1	1	1	0	0
<i>C. pulchella</i>	8	11	6	9	10	7	4	8	4	5	9	0	1	1	1
<i>C. ruficeps</i>	7	9	5	8	12	6	3	7	3	7	6	2	2	1	1
<i>C. satelles</i>	5	10	6	1	11	6	3	5	2	11	4	10	9	1	1
<i>C. vittata</i>	7	10	5	0	10	5	3	8	1	10	3	8	10	1	1

**Tabla 4.2-5.** Número de CBCs (diagonal derecha) y Hemi CBCs (diagonal izquierda) detectados para cada especie en las estructuras secundarias ITS2.

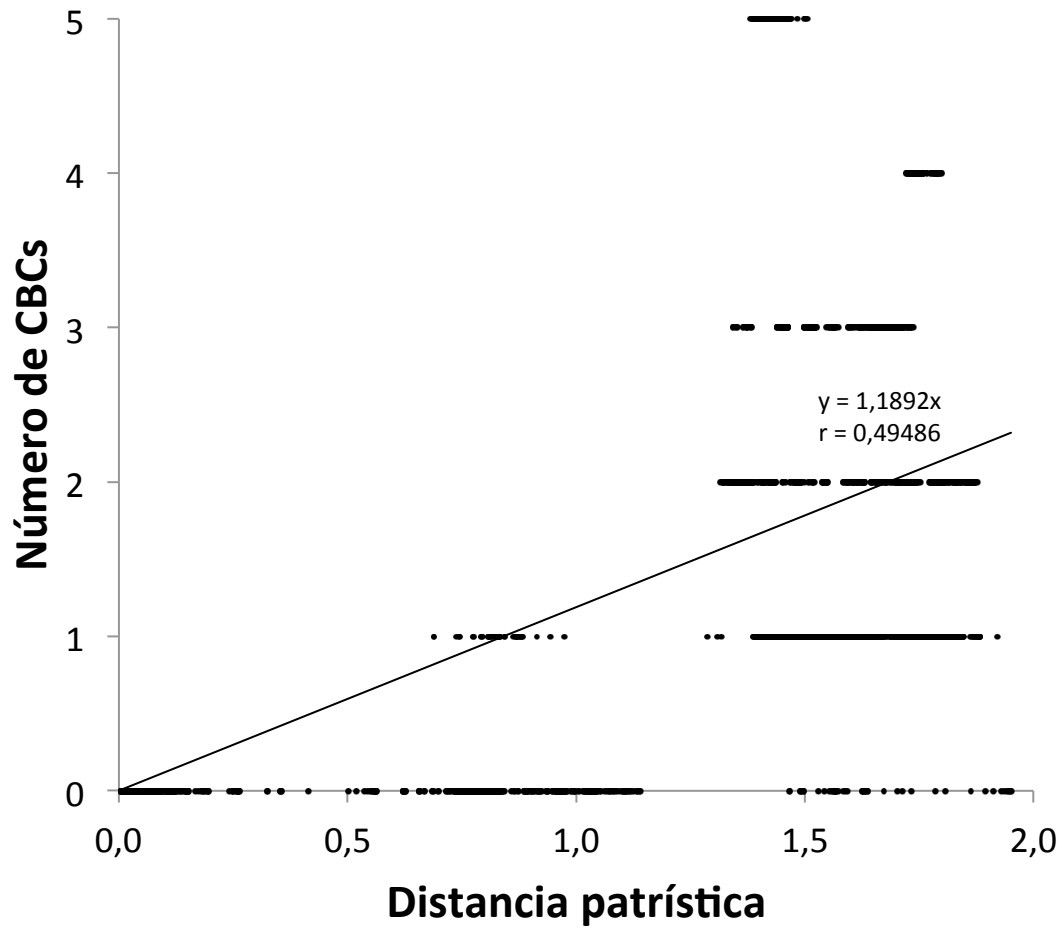


**Figura 4.2-14.** Estructuras secundarias ITS2 mostrando la distribución de los cambios de base compensatorios entre (a) las especies *C. pallida* y *C. ruficeps*, y (b) el par *C. fugitiva* y *C. ruficeps*.

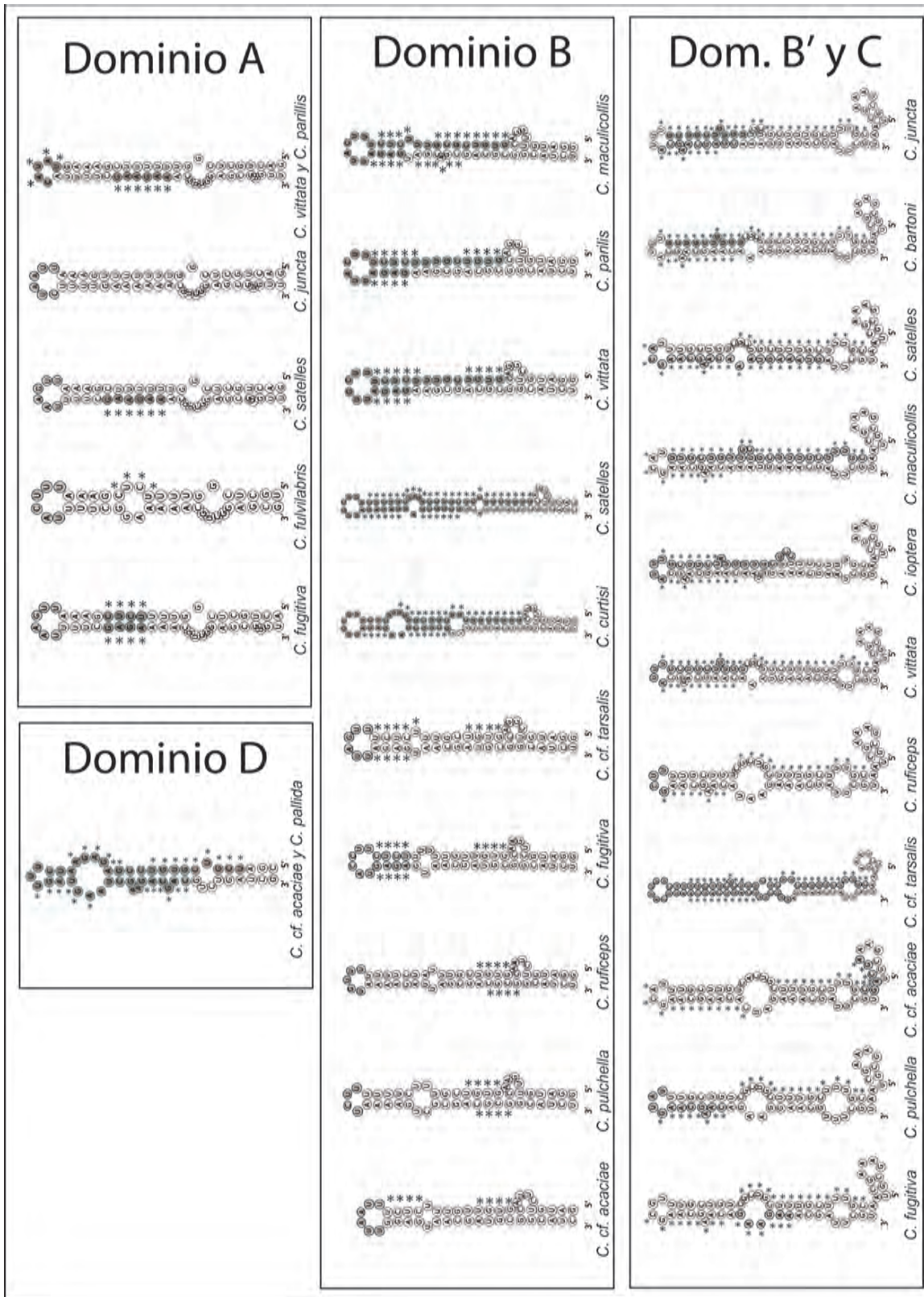
	<i>C. bartoni</i>	<i>C. cf. acaciae</i>	<i>C. cf. tarsalis</i>	<i>C. curtisi</i>	<i>C. fugitiva</i>	<i>C. fulvibrabis</i>	<i>C. ioptera</i>	<i>C. juncta</i>	<i>C. maculicollis</i>	<i>C. pallida</i>	<i>C. parillis</i>	<i>C. pulchella</i>	<i>C. ruficeps</i>	<i>C. satelles</i>
<i>C. cf. acaciae</i>	D <sub>2</sub> 711:723													
<i>C. cf. tarsalis</i>	n/a	D <sub>1</sub> 327:362												
<i>C. curtisi</i>	n/a	D <sub>2</sub> 711:723	n/a											
<i>C. fugitiva</i>	A 53:74 C 207:243 D <sub>1</sub> 352:574	D <sub>1</sub> 273:691 D <sub>2</sub> 711:723	D <sub>1</sub> 273:691	A 53:74										
<i>C. fulvibrabis</i>	D <sub>1</sub> 711:723	D <sub>1</sub> 273:691	D <sub>1</sub> 273:691	D <sub>2</sub> 711:723	C 207:243 D <sub>2</sub> 711:723									
<i>C. ioptera</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	C 207:243	n/a								
<i>C. juncta</i>	n/a	D <sub>2</sub> 711:723	n/a	n/a	A 53:74 C 207:243 D <sub>1</sub> 352:574	D <sub>2</sub> 711:723	n/a							
<i>C. maculicollis</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	A 53:74 C 207:243	n/a	n/a	n/a						
<i>C. pallida</i>	D <sub>1</sub> 424:516 D <sub>2</sub> 711:723	n/a	n/a	D <sub>1</sub> 424:516 D <sub>2</sub> 711:723	D <sub>1</sub> 273:691 D <sub>2</sub> 711:723	D <sub>1</sub> 273:691 D <sub>1</sub> 415:526 D <sub>1</sub> 424:516	D <sub>1</sub> 424:516	D <sub>1</sub> 424:516 D <sub>2</sub> 711:723	n/a					
<i>C. parillis</i>	n/a	D <sub>1</sub> 273:691 D <sub>2</sub> 711:723	D <sub>1</sub> 273:691	D <sub>2</sub> 709:725	A 53:74 D <sub>1</sub> 352:574	D <sub>2</sub> 711:723	n/a	n/a	n/a	D <sub>1</sub> 273:691 D <sub>2</sub> 711:723				
<i>C. pulchella</i>	B 128:139 C 207:243	D <sub>1</sub> 273:691 D <sub>1</sub> 406:522 D <sub>2</sub> 711:723	B 128:139	B 128:139	B 128:139 B 130:137	B 128:139 C 207:243 D <sub>1</sub> 424:516	B 128:139	B 128:139 C 207:243	B 128:139 C 207:243	B 128:139 D <sub>1</sub> 424:516 D <sub>2</sub> 711:723	B 128:139			
<i>C. ruficeps</i>	B 128:139	B 128:139 D <sub>1</sub> 273:691 D <sub>2</sub> 711:723	B 128:139 D <sub>1</sub> 273:691	B 128:139	B 128:139 B 130:137 D <sub>1</sub> 306:627 D <sub>1</sub> 351:577 D <sub>1</sub> 352:574	B 128:139 D <sub>1</sub> 424:516 D <sub>2</sub> 711:723	B 128:139	B 128:139	B 128:139	B 128:139 D <sub>1</sub> 273:691 D <sub>1</sub> 424:516 D <sub>2</sub> 711:723	B 128:139 B 128:139	n/a		
<i>C. satelles</i>	n/a	D <sub>2</sub> 711:723	n/a	n/a	A 53:74	D <sub>2</sub> 711:723	n/a	n/a	n/a	D <sub>1</sub> 424:516 D <sub>2</sub> 711:723	D <sub>2</sub> 709:725	B 128:139	B 124:143 B 128:139	
<i>C. vittata</i>	D <sub>1</sub> 390:542	D <sub>2</sub> 711:723	n/a	D <sub>2</sub> 709:725	A 53:74 D <sub>1</sub> 352:574	D <sub>2</sub> 711:723	n/a	D <sub>1</sub> 390:542	n/a	D <sub>2</sub> 711:723	n/a	B 128:139	B 128:139	D <sub>2</sub> 709:725

**Tabla 4.2-6.** Número y ubicación de los CBCs detectados en las estructuras secundarias ITS2 de *Calomela* a partir de las comparaciones de las especies de las especies dos a dos. Los CBCs afectando a los dominios C y D1 se muestran en negrita sobre fondo gris. Los valores numéricos separados por dos puntos se refieren a la posición en el alineamiento de cada una de las dos bases implicadas en el CBC.

Los patrones de distribución de las SSRs en los segmentos de expansión del ARNr también evolucionan de modo compensatorio en el caso de regiones apareadas, esto es, cuando una SSR incrementa su longitud, se fijan mutaciones compensatorias en la SSR de la otra hebra de modo que la estructura secundaria permanece estable (Hancock y Dover, 1990). El análisis de los patrones de apareamiento entre SSRs en nuestro conjunto de datos demostró que muchas de ellas han evolucionado de este modo. Es el caso de las SSRs del dominio A en la especie *C. fugitiva*, de las del dominio B en las especies *C. curtisi*, *C. fugitiva*, *C. maculicollis*, *C. parilis*, *C. pulchella*, *C. ruficeps*, *C. satelles*, *C. tarsalis* y *C. vittata*, y de las detectadas en el dominio B' para las especies *C. bartoni*, *C. fugitiva*, *C. ioptera*, *C. juncta*, *C. maculicollis*, *C. satelles*, *C. aff. tarsalis* y *C. vittata*, así como también determinadas regiones SSR en el dominio D de las especies *C. aff. acaciae* y *C. pallida* (Figura 4.2-16). Por otro lado, también se detectaron casos donde las SSRs aparecían compensadas tan sólo de modo parcial o bien quedaban integradas en bucles, como por ejemplo en el dominio A para las especies *C. fulvilabris*, *C. parilis*, *C. satelles* y *C. vittata*, en el dominio B para *C. aff. acaciae*, *C. curtisi*, *C. maculicollis*, *C. parilis*, *C. satelles* y *C. vittata*, y en el dominio B' de las especies *C. aff. acaciae*, *C. bartoni*, *C. fugitiva*, *C. juncta*, *C. maculicollis*, *C. pulchella*, *C. ruficeps*, *C. satelles*, *C. aff. tarsalis* y *C. vittata* (Figura 4.2-16). Varias SSRs de los segmentos de expansión de ITS2 de *Calomela* parecieron haber surgido en la misma posición a partir de una repetición similar. Ejemplos de ello serían las SSRs (GA)<sub>2</sub> y (GA)<sub>3</sub> presentes en el dominio A, que aparean con repeticiones tipo (UC)<sub>2</sub> o con variaciones de la misma. El mismo patrón se pudo apreciar en el extremo terminal del dominio B entre las regiones (AG)<sub>2</sub> y (AG)<sub>3</sub> y sus respectivas bases complementarias.



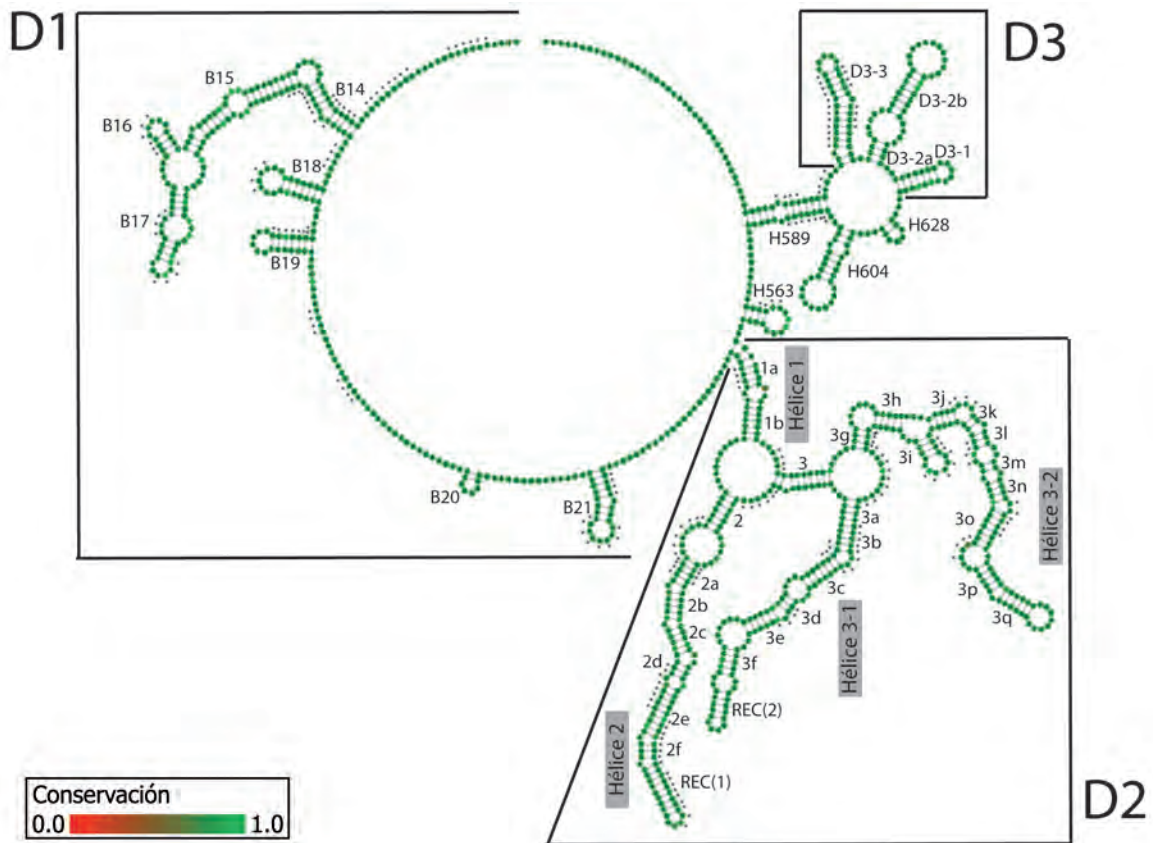
**Figura 4.2-15.** Correlación entre el número de CBCs y la distancia evolutiva. La gráfica muestra la dependencia entre el número de cambios de base compensatorios detectados en las comparaciones de secuencias ITS2 de *Calomela* tomadas dos a dos y la distancia patristica recuperada entre las mismas. La recta de regresión muestra la existencia de una dependencia positiva entre las variables soportada por un coeficiente de correlación lineal de Pearson de 0.49486.



**Figura 4.2-16.** Representación gráfica de los diferentes dominios que integran las estructuras secundarias ITS2 de una selección de especies de *Calomela*. Las bases que forman parte de una SSR aparecen indicadas con asteriscos. Las bases con color gris oscuro denotan posiciones compartidas con otras especies en el alineamiento. El color gris claro identifica a las bases que constituyen singularidades exclusivas de las especies que las portan.

## 4.2.4.3.- Estructura secundaria de las secuencias LSU

Las estructuras secundarias de LSU de las quince especies de *Calomela* (Figura 4.2-17) fueron muy similares entre- sí y altamente congruentes con los modelos existentes en la literatura (e.g., Wool, 1986; Gutell y Fox, 1988; Gutell *et al.*, 1990, 1993; Schnare *et al.*, 1996; Gillespie *et al.*, 2005). En estos plegamientos existen regiones de secuencia sin aparear, pues las bases complementarias a algunas regiones del fragmento D1-D3 del gen LSU se encuentran en fragmentos diferentes no secuenciados para *Calomela* (para una representación completa de la estructura secundaria del gen LSU consultar por ejemplo De Rijk *et al.*, 1998 o Gillespie *et al.*, 2004, 2005).



**Figura 4.2-17.** Estructura secundaria LSU D1-D3 consenso de las 15 especies de *Calomela* estudiadas. Los dominios se han nombrado siguiendo a Rijk *et al.* (1994) y a Gillespie *et al.* (2004).



Las estructuras secundarias para individuos de una misma especie fueron idénticas. Sin embargo, y a pesar de la reducida variabilidad, los cambios nucleotídicos resultaron ser muy informativos a nivel interespecífico, debido a que la distribución de las mutaciones y su hipotética repercusión sobre las estructuras secundarias reflejaron unos patrones exclusivos y característicos para cada una de las especies. La tabla 4.2-7 resume el análisis de las 35 posiciones variables detectadas en el alineamiento de LSU respecto a su estructura secundaria y teniendo en cuenta los cambios de base compensatorios, concretamente seis posiciones apareadas involucradas en CBCs y otras once posiciones relacionadas con hemi-CBCs. También se tuvo en consideración si las mutaciones afectaban a la conformación estructural de la molécula (doce casos detectados), y si las mismas eran exclusivas de cada especie (20 casos) o bien eran características de un determinado individuo (dos casos). Estos cambios mutacionales y estructurales se ilustran con detalle en la figura 4.2-18.

El dominio 1 contenía cinco posiciones variables, cuatro de las cuáles (pos. 2, 50, 114 y 125) se encontraron en regiones no apareadas y, por tanto, no alteraron la estructura secundaria, si bien una de ellas (pos. 125) presentó una mutación exclusiva de *C. pallida*. La posición variable 121 en la hélice B15 del dominio 1 estuvo implicada en un hemi-CBC propio de esta misma especie (Figura 4.2-18-D1; Tabla 4.2-7).

Al igual que en otros estudios (*e.g.* Gillespie *et al.*, 2004, 2005), la mayor parte de los cambios se observaron en las hélices 2, 3-1 y 3-2 del dominio 2, que en *Calomela* incluyeron el 71% de las posiciones variables. Concretamente en la hélice 2 (Figura 4.2-18-D2:hélice 2; Tabla 4.2-7) se detectaron doce posiciones variables, cuatro con CBCs (pos. 359, 371, 408 y 421) y cuatro con hemi-CBCs (pos. 369, 373, 399 y 405), además de otras cuatro que modificaban la conformación de las estructuras secundarias (pos. 354, 366, 414 y 425). El CBC de las posiciones 359:421 contenía dos tipos de emparejamientos de bases, siendo el más común el enlace A-U, mientras que el par G-C tan sólo pudo observarse en las especies *C. curtisi* y *C. pallida*. El otro CBC de la hélice 2 se halló en las posiciones 371:408, entre las especies *C. pallida* (G-C) y *C. aff. tarsalis* (A-U). La adenosina de la posición 371 en *C. aff. tarsalis*, y la citidina en la posición 408 propia de *C. pallida* representarían mutaciones exclusivas características de estas especies. También fueron exclusivos a nivel de especie los hemi-CBCs encontrados en las posiciones 369 y 399 para *C. aff. tarsalis*, y en la posición 373 para *C. fulvilabris*. Por otro lado, la posición 405 incluiría un hemi-CBC compartido por las especies *C. maculicollis*, *C. parilis* y *C. vittata*. En esta misma posición se detectó además una mutación en *C. curtisi* que forzaría un

ligero cambio en la estructura secundaria de la hélice (Figura 4.2-18-D2:hélice 2; Tabla 4.2-7). La figura 4.2-18-D2:hélice 2 ilustra el efecto de las mutaciones con repercusión sobre el patrón de plegamiento de la molécula. Los cambios autoapomórficos existentes en las posiciones 354 y 425 de *C. fugitiva* incrementaron en dos el número de bases no apareadas en la región (Figura 4.2-18-D2:hélice 2). De igual manera restaron apareamientos en la hélice, las cuatro sustituciones no-adenosina de la posición 366 detectadas en las especies *C. bartoni*, *C. fulvilabris*, *C. juncta* y *C. curtisi*, esta última con carácter autoapomórfico (Figura 4.2-18-D2:hélice 2). Un caso singular sería el derivado de la mutación en la posición 414 para la especie *C. fugitiva*, que incrementó el número de posiciones apareadas en la hélice con respecto al resto de las especies (Figura 4.2-18-D2:hélice 2).

En cuanto a la hélice 3-1 del dominio 2, ésta contenía seis posiciones variables, incluyendo las únicas mutaciones puntuales exclusivas detectadas a nivel individual, concretamente en los ejemplares *C. pallida* 4 y *C. ruficeps* 16 (Figura 4.2-18-D2:hélice 3-1; Tabla 4.2-7). Estos especímenes exhibieron sendas mutaciones en las posiciones 542 y 548, la primera de ellas formando parte de un hemi-CBC y la segunda de un lugar no apareado de la estructura secundaria. Además, en esta misma hélice se observaron otras dos sustituciones de tipo hemi-CBC en las posiciones 501 y 502, la primera de ellas compartida por *C. pallida* y *C. pulchella*, y la segunda una autoapomorfía de *C. fulvilabris* (Figura 4.2-18-D2:hélice 3-1). En este mismo dominio se detectaron dos posiciones apareadas (487:534) relacionadas con un CBC entre las especies *C. aff. acaciae* (U-A) y *C. pulchella* (C-G) (Figura 4.2-18-D2:hélice 3-1).

La tercera región con más mutaciones del dominio 2 correspondió a la hélice 3-2 (Figura 4.2-18-D2:hélice 3-2, Tabla 4.2-7). De sus siete posiciones variables, cuatro estuvieron en regiones no apareadas de las estructuras secundarias (pos. 564, 584, 619 y 640), y una de ellas representó una sustitución exclusiva de *C. aff. tarsalis* (Tabla 4.2-7). En esta misma hélice también se detectaron tres sustituciones afectando potencialmente a la estructura secundaria. Dos de estas sustituciones se dieron en la posición 603 e incrementaron el número de bases apareadas en los plegamientos de *C. bartoni* y de *C. juncta* con respecto a las demás especies (Figura 4.2-18-D2:hélice 3-2), y la restante consistió en una mutación autoapomórfica en la posición 611 del alineamiento reduciendo el número de bases apareadas en *C. pallida* (Figura 4.2-18-D2:hélice 3-2). La posición 649 apareció relacionada con un hemi-CBC donde *C. curtisi*, *C. maculicollis*, *C. parilis* y *C. vittata* exhibieron uridina mientras que el resto de especies poseían citidina.

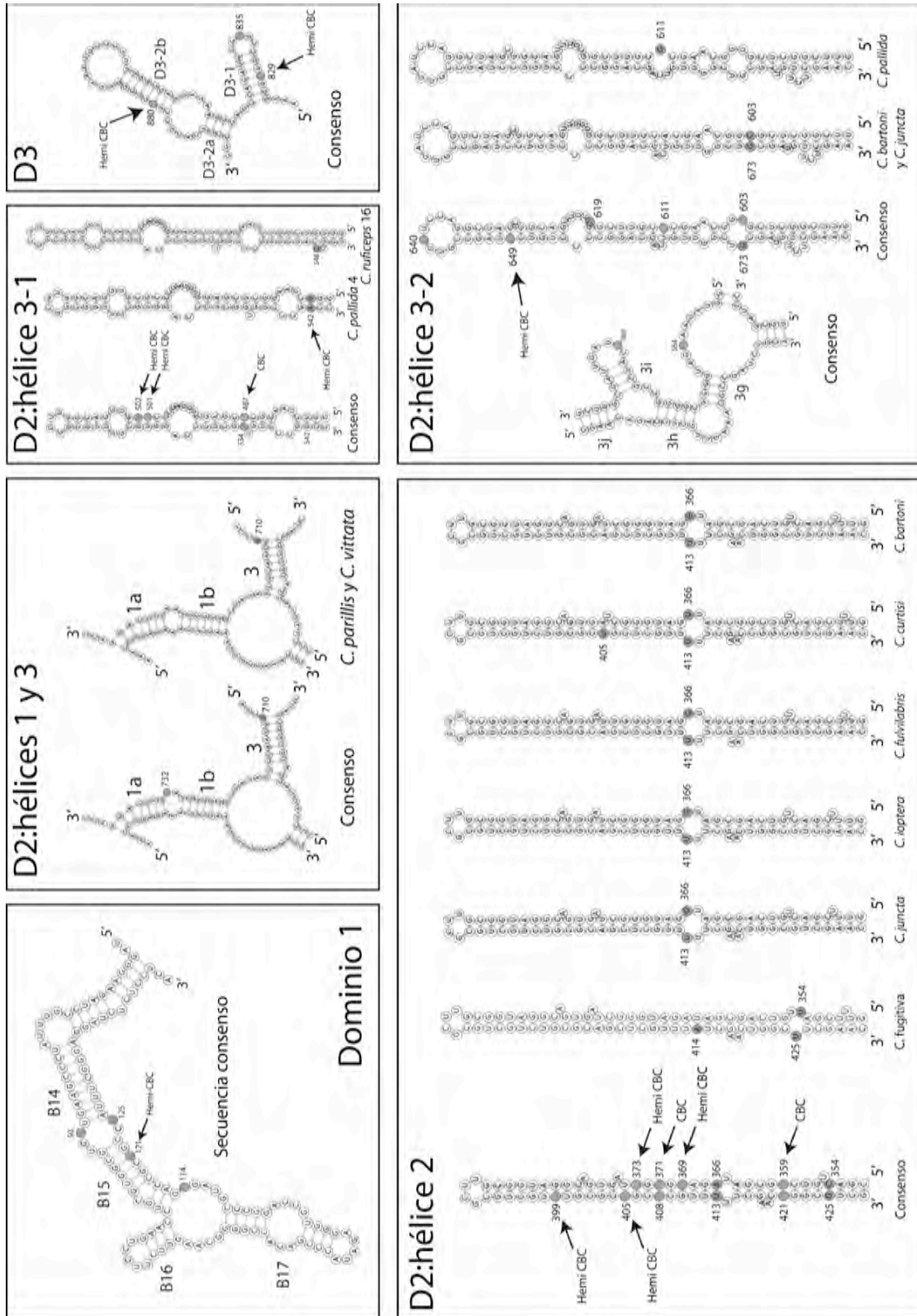
La hélices 1 y 3 del dominio 2, aunque cortas, también resultaron ser variables (Figura 4.2-18-D2:hélices 1 y 3; Tabla 4.2-7). En la primera, las mutaciones en la posición 732 estaban fuera de las regiones apareadas de las moléculas, sin influir en principio sobre la conformación estructural de las mismas. Sin embargo, la sustitución hallada en la segunda sí que implicó una reducción de posiciones apareadas en las especies *C. parilis* y *C. vittata* (Figura 4.2-18-D2:hélices 1 y 3).

En el dominio 3, se identificaron tres posiciones variables, todas ellas conteniendo una única sustitución con carácter autoapomórfico (Figura 4.2-18-D3; Tabla 4.2-7). Concretamente en la hélice D3-1 se detectaron un hemi-CBC exclusivo de *C. fulvilabris* y una mutación propia de *C. aff. tarsalis*, esta última ubicada en un bucle. El cambio observado en la hélice D3-2b se correspondió con un hemi-CBC presente únicamente en *C. aff. tarsalis*.

En el conjunto de secuencias LSU se detectaron 45 regiones SSR, de las cuales el 76% fueron compartidas por todas las especies de *Calomela*, el 20% fueron comunes a varias especies y, de las dos restantes, una fue exclusiva de *C. curtisi* (pos. 403, D2-hélice 2: (GCU)<sub>2</sub>) y la otra propia del ejemplar 4 de *C. pallida* (D2-hélice 3-1: (CGAC)<sub>2</sub>). Las SSRs (excluyendo las de tipo homopolimérico) constaron de repeticiones de unidades cuya longitud osciló entre 2-5 nucleótidos, situándose el valor modal en dos. Las repeticiones pentanucleotídicas se limitaron a la SSR (GUGCG)<sub>2</sub> compartida por todas las especies en la posición 51 del alineamiento. La mayor acumulación de SSRs se dió en el dominio D2 (17 repeticiones), seguida de los dominios D1 (14 SSRs) y D3 (3 SSRs) (Figura 4.2-17; Tabla 4.2-8). Entre las SSR compartidas por todas las especies de *Calomela*, la repetición (CUCG)<sub>2</sub> en la posición 547 de la matriz se mostró como 5'-CCCGCUCG-3' en el caso de *C. ruficeps* 16.

Al igual que ocurría en el conjunto de datos ITS2, las mutaciones compensatorias también estuvieron presentes en las SSRs del fragmento LSU estudiado. Fue el caso de las repeticiones complementarias detectadas en la hélice B14 del dominio D1, las de la región 2a en la hélice 2 del dominio 2 y las de la hélice D3-3 en el dominio 3, todas ellas presentes en todas las especies (Figura 4.2-17).

También se hallaron SSRs compensadas tan sólo parcialmente o integradas en bucles, como por ejemplo las SSRs presentes en la hélice B17, B19 y B21 del dominio 1, las de las regiones del dominio 2 2-2a, REC(1), 3a-3g, 3i, 3l-3m, 3o-3p, 3o-3n, 3m-3l, 3k-3j, y las porciones del dominio 3 y sus zonas adyacentes que incluyen las SSRs de las hélices H563 y H589.



**Figura 4.2-18.** Representación gráfica detallada de las diferentes hélices que integran la estructura secundaria LSU D1-D3 de *Calomela* indicando las mutaciones exclusivas detectadas para las diferentes especies, así como las posiciones involucradas en CBCs y Hemi-CBCs.

Posición en el alineamiento

Especies de <i>Calomela</i>	2	50	114	121	125	354	359	366	369	371	373	399	405	408	414	421	425	487	501	502	534	542	548	564	584	603	611	619	640	649	710	732	829	835	880	
<i>C. cf. acaciae</i>	C	U	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	C	A	C	U	C	U	U	
<i>C. bartoni</i>	A	C	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	
<i>C. curtisi</i>	A	C	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	
<i>C. fugitiva</i>	C	C	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	
<i>C. fulvibrabis</i>	A	U	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	
<i>C. ioptera</i>	N	C	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	
<i>C. juncta</i>	A	C	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	
<i>C. maculicollis</i>	A	C	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	
<i>C. pallida</i>	A	C	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	
<i>C. parilis</i>	A	C	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	
<i>C. pulchella</i>	C	C	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	
<i>C. ruficeps</i>	C	C	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	U
<i>C. cf. tarsalis</i>	C	U	C	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	U
<i>C. vittata</i>	A	C	U	U	U	C	A	A	U	G	C	C	A	U	U	U	G	U	A	C	A	G	U	U	U	U	U	A	U	A	U	U	U	U	U	U

■ = CBC, ● = Hemi CBC, ▲ = cambio que afecta a la estructura secundaria, \* = cambio exclusivo de especie, \*\* = cambio exclusivo de un individuo.

**Tabla 4.2-7.** Análisis comparativo de las 35 posiciones variables en el alineamiento LSU de *Calomela*. Las bases marcadas con un cuadrado indican su participación en un CBC. Los círculos denotan bases involucradas en hemi-CBCs. Los triángulos identifican las mutaciones que alteran la estructura secundaria de la molécula. Los cambios exclusivos de una sola especie se indican con un asterisco, mientras que los cambios propios de un individuo se señalan con dos

Dominio-hélice	Posición	SSR	Especies - individuos
D1	5	(CCG) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	16	(UG) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	20	(GU) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	27	(GGA) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	50	(UG) <sub>2</sub>	Fl, nA, nT, Pu 16
D1	51	(GUGCG) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	69	(CUU) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	84	(CA) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	94	(AG) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	132	(GGA) <sub>2</sub> (UC) <sub>3</sub>	Todas las especies
D1	147	(AG) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	162	(GA) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	178	(GUGG) <sub>2</sub> (GGU) <sub>2</sub> *	Todas las especies
D1	206	(AU) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	216	(GA) <sub>2</sub>	Todas las especies
D1	266	(AG) <sub>4</sub>	Todas las especies
D1	278	(AG) <sub>2</sub>	Todas las especies
D2-h1	309	(GA) <sub>2</sub>	Todas las especies
D2-h2	336	(AUUC) <sub>2</sub> (CG) <sub>2</sub> *	Todas las especies
D2-h2	362	(GAUG) <sub>2</sub>	B, Fl, J
D2-h2	391	(CG) <sub>2</sub> (CGU) <sub>2</sub> *	Todas las especies excepto NTa
D2-h2	401	(GC) <sub>2</sub>	Todas las especies
D2-h2	403	(GCU) <sub>2</sub>	C
D2-h2	431	(CG) <sub>2</sub>	Todas las especies
	448	(UAG) <sub>2</sub>	Todas las especies
D2-h3-1	472	(GU) <sub>2</sub>	Todas las especies
D2-h3-1	534	(GU) <sub>2</sub>	Todas las especies excepto nA
D2-h3-1	540	(CGAC) <sub>2</sub>	Pal 4
D2-h3-1	547	(CUCG) <sub>2</sub>	Todas las especies excepto R 16
D2-h3-2	559	(UA) <sub>2</sub>	Todas las especies
D2-h3-2	563	(AUG) <sub>2</sub>	nA, nT, Pal
D2-h3-2	569	(GC) <sub>2</sub>	Todas las especies
D2-h3-2	584	(UUAG) <sub>2</sub>	Todas las especies excepto Fl y I
D2-h3-2	601	(CG) <sub>2</sub>	B, J
D2-h3-2	618	(GU) <sub>2</sub>	B, Fg, Fl, I, J, M, P
D2-h3-2	659	(GAC) <sub>2</sub>	Todas las especies
D2-h3-2	680	(UC) <sub>2</sub>	Todas las especies
	718	(UA) <sub>2</sub>	Todas las especies
	752	(AC) <sub>2</sub>	Todas las especies
	774	(UG) <sub>2</sub> (CG) <sub>2</sub>	Todas las especies
D3	898	(UC) <sub>2</sub>	Todas las especies
D3	904	(UC) <sub>2</sub>	Todas las especies
D3	913	(GA) <sub>2</sub> (AGA) <sub>2</sub> *(AG) <sub>2</sub> *(GC) <sub>2</sub>	Todas las especies
	929	(AG) <sub>2</sub>	Todas las especies
	936	(AC) <sub>2</sub>	Todas las especies

**Tabla 4.2-8.** Listado y posición de las repeticiones simples de secuencia (SSRs) detectadas en el alineamiento LSU de *Calomela*. \* = SSR solapante con la repetición anterior. Abreviaturas: B = *C. bartoni*, C = *C. curtisi*, Fg = *C. fugitiva*, Fl = *C. fulvilabris*, I = *C. ioptera*, J = *C. juncta*, M = *C. maculicollis*, nA = *C. aff. acaciae*, nT = *C. aff. tarsalis*, Pal = *C. pallida*, Pu = *C. pulchella*, R = *C. ruficeps*.

#### 4.2.4.4.- Selección de modelos evolutivos y de la estrategia de partición de datos

La tabla 4.2-9 resume el resultado de la selección estadística bajo el criterio de selección de Akaike de los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaron a cada una de las particiones de datos. Se pudo comprobar la existencia de diferencias en cuanto a la selección de modelos entre los análisis de los genes subdivididos y sin subdividir. Por ejemplo, en el caso de la matriz *cox1*, el modelo preferido resultó ser HKY+I+G, mientras que para las primeras, segundas y terceras posiciones de codón analizadas separadamente se obtuvieron los modelos GTR+G, HKY+I y GTR+I+G, respectivamente. Este último modelo evolutivo también fue el escogido en el caso del tratamiento conjunto de las primeras y segundas posiciones de codón *cox1*. Para los otros genes y estrategias de partición se dieron situaciones análogas (Tabla 4.2-9). Respecto a los marcadores combinados, diez de las once estrategias diseñadas para analizar las secuencias coincidieron en la asignación de un modelo GTR, radicando las diferencias entre ellos únicamente en la presencia o ausencia de una proporción de sitios invariables y del parámetro Gamma. La excepción se correspondió con la partición de los tallos en las estructuras secundarias, para las que se escogió un modelo HKY+I.

La tabla 4.2-10 muestra los resultados de la selección de los esquemas óptimos de partición de datos tanto para marcadores individuales como para su combinación. Respecto a los genes por separado, las verosimilitudes fueron mejores en los casos en los que se subdividieron al máximo las posiciones de codón de los genes codificantes y las regiones de tallos y bucles de los genes ribosomales. Los criterios de decisión AIC, AICc y BIC, aunque penalizan el exceso de parámetros, coincidieron en seleccionar estas mismas estrategias como las más apropiadas, independientemente de si se computaron o no las longitudes de rama como parámetros libres. En cuanto a la estrategia de partición de datos de los genes combinados, todos los criterios de selección también escogieron el esquema con mayor número de particiones y de parámetros libres, por tanto contemplando los cuatro genes separados, cada uno de ellos organizado según su mejor esquema de partición individual.

	<b>Partición</b>	<b>Modelo seleccionado</b>
<b>cox1</b>	cox1	HKY+I+G
	cox1 codón 1	GTR+G
	cox1 codón 2	HKY+I
	cox1 codón 3	GTR+I+G
	cox1 codón 1 + codón 2	GTR+I+G
<b>CAD</b>	CAD	HKY+I
	CAD codón 1	GTR+I
	CAD codón 2	K80
	CAD codón 3	HKY+I+G
	CAD codón 1 + codón 2	HKY+I
<b>ITS2</b>	ITS2	GTR+I+G
	tallos ITS2 compartidos	K80+G
	bucles ITS2 compartidos	GTR+I
	tallos y bucles ITS2 no compartidos	SYM+G
<b>LSU</b>	LSU	GTR+I
	tallos LSU	HKY+I
	bucles LSU	HKY+I
	bases huérfanas LSU	F81
<b>marcadores combinados</b>	cox1 + CAD + ITS2 + LSU	GTR+I+G
	genes mitocondriales	GTR+I+G
	genes nucleares	GTR+I+G
	genes codificantes	GTR+I+G
	genes no codificantes	GTR+G
	primeras posiciones de codón	GTR+I
	segundas posiciones de codón	GTR+G
	terceras posiciones de codón	GTR+G
	primeras y segundas posiciones de codón	GTR+I
	bucles de estructura secundaria	GTR+I+G
tallos de estructura secundaria	HKY+I	

**Tabla 4.2-9.** Resumen de los modelos evolutivos seleccionados bajo el criterio de selección de Akaike para cada una de las particiones analizadas tanto a nivel de genes individuales como de marcadores combinados.



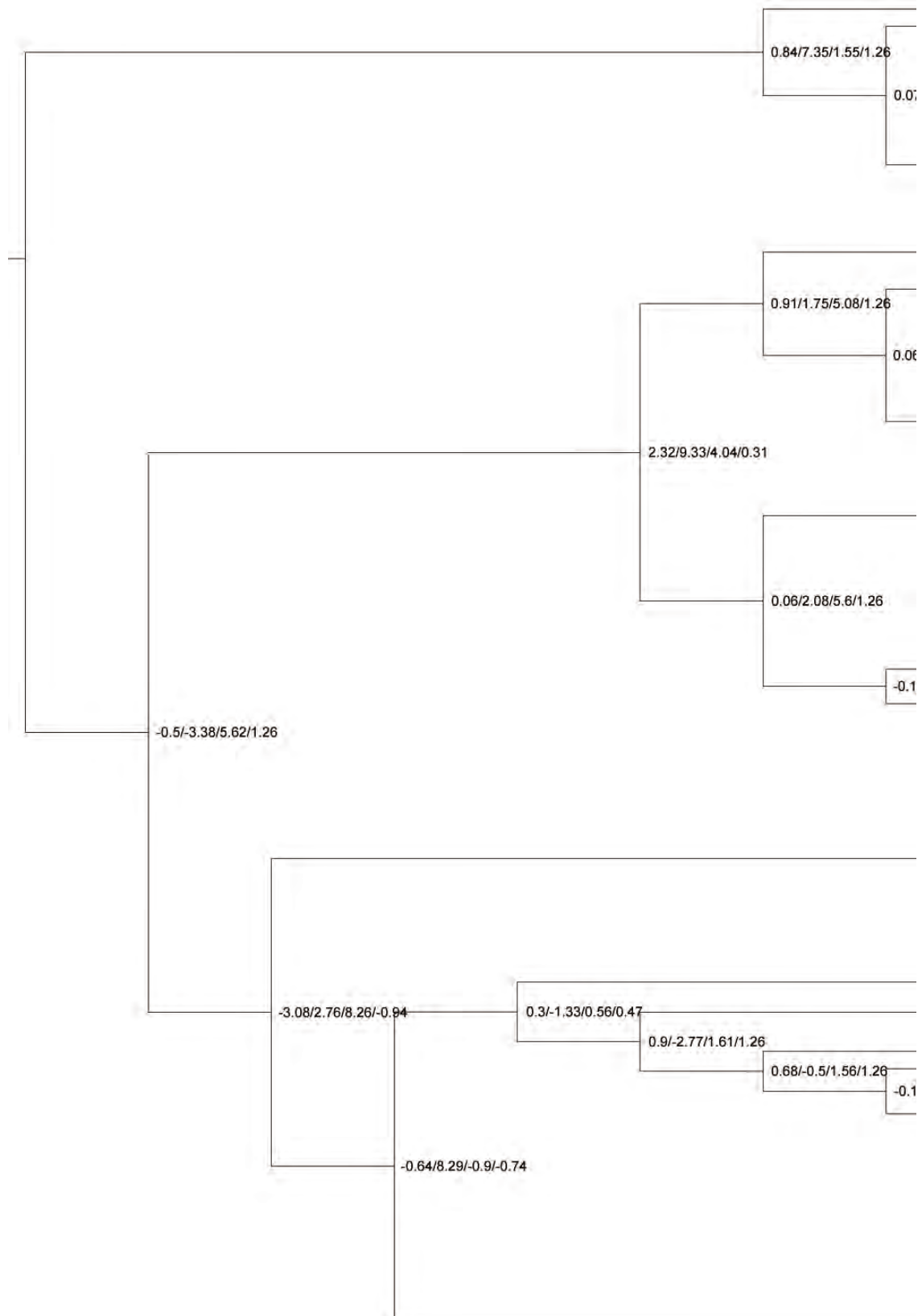
Estrategia de partición de datos	particiones			N	-logL	parámetros libres $\gamma^{**}$			longitudes de rama son parámetros libres			longitudes de rama no son parámetros libres		
	n	n	n			AIC	AICc	BIC	AIC	AICc	BIC	AIC	AICc	BIC
COX1	1	718	75	-5447,3562	10/157	11208,7124	10610,9775	11343,1239	10914,7124	10918,1499	10923,2736			
	3	718	75	-5065,734	26/173	10477,468	9869,34679	10625,5775	10183,468	10212,718	10205,7272			
	2	718	75	-5096,384	21/168	10528,768	9924,68289	10672,5969	10234,768	10252,202	10252,7466			
CAD	1	480	68	-2198,7384	5/138	4673,4768	4133,13877	4767,48809	4407,4768	4408,44454	4410,88301			
	3	480	68	-2017,5341	21/154	4343,0682	3794,33257	4447,97935	4077,0682	4097,15516	4091,37427			
	2	480	68	-2045,1881	15/148	4386,3762	3841,88237	4487,1999	4120,3762	4129,60697	4130,59482			
ITS2	1	752	66	-3001,9005	10/139	6281,801	5755,85505	6403,59528	6023,801	6027,801	6032,56318			
	3	752	66	-2905,5752	25/154	6119,1504	5592,74591	6254,08795	5861,1504	5893,6504	5883,05585			
	1	982	69	-1675,6188	9/144	3639,2376	3089,76392	3782,10165	3369,2376	3372,28845	3378,1666			
LSU	3	982	69	-1623,676	15/150	3547,352	2994,91298	3696,16872	3277,352	3286,4086	3292,23367			
	1	2932	84	-13175,443	10/175	26700,8862	26031,321	26957,6399	26370,8862	26373,8999	26385,5578			
	4	2932	84	-12666,96	33/198	25729,92	25044,6678	26020,4185	25399,92	25444,8	25448,3364			
genes separados	12	2932	84	-11953,534	90/255	24417,0684	23657,9986	24791,1952	24087,0684	21747,0684	24219,1132			
	2	2932	84	-12886,557	21/186	26145,1132	25469,7346	26418,0057	25815,1132	25830,0164	25845,9236			
	7	2932	84	-12996,821	20/185	26363,6412	25688,9353	26635,0665	26033,6412	26046,9745	26062,9845			
marcadores combinados	6	2932	84	-12178,086	60/225	24806,171	24089,9738	25136,2829	24476,171	24794,4319	24564,2008			
	9	2932	84	-12125,418	71/236	24722,8368	23991,6995	25069,0875	24392,8368	25244,8368	24497,0054			
	8	2932	84	-12165,948	61/226	24783,896	24066,3655	25115,4751	24453,896	24797,7142	24543,393			

**Tabla 4.2-10.** Resultados de la selección de los esquemas óptimos de partición de datos bajo los criterios de AIC, AICc y BIC tanto a nivel de marcadores individuales como de marcadores combinados. Los datos se analizaron sin considerar las longitudes de rama como parámetros libres (\*) y considerándolos (\*\*). Abreviaturas = n = número de caracteres en la partición; N = número de taxa; -logL = valor de máxima verosimilitud.

4.2.4.5.- *Congruencia entre marcadores moleculares*

Los resultados del test ILD mostraron niveles significativos de heterogeneidad para la matriz de todos los genes combinados ( $P = 0,04$ ). Para determinar con más exactitud el origen de esta incongruencia se realizaron pruebas ILD comparando los marcadores dos a dos. Así, se recuperaron como congruentes las señales filogenéticas de las parejas *cox1*-CAD ( $P = 0,28$ ), *cox1*-LSU ( $P = 1,00$ ), CAD-LSU ( $P = 0,56$ ) e ITS2-LSU ( $P = 0,59$ ). Por el contrario, se detectaron como incongruentes las comparaciones *cox1*-ITS2 ( $P = 0,03$ ) y CAD-ITS2 ( $P = 0,02$ ). Ante la sospecha de problemas de alineamiento en ITS2 que determinaran su incongruencia con los otros marcadores, se eliminaron las posiciones hipervariables que potencialmente pudieran revestir incertidumbre en el alineamiento de ITS2 mediante el programa Gblocks v.0.91b (Castresana, 2000). Los parámetros que se utilizaron fueron: número mínimo de secuencias compartiendo una región para considerarla conservada = 34 secuencias (*i.e.*, 50% del total); mínimo número de secuencias para definir una región flanqueante = 34 secuencias; máximo número de posiciones contiguas no conservadas = 1; longitud mínima para seleccionar un bloque conservado = 2; posiciones de inserción-delección permitidas = todas. El alineamiento ITS2 resultante consistió en 467 posiciones nucleotídicas, esto es, el 62% de las 753 posiciones originales. Al utilizar el nuevo alineamiento, la prueba ILD para la matriz de todos los genes combinados descartó la existencia de incongruencia filogenética al analizar los cuatro marcadores combinados ( $P = 0,78$ ).

El análisis de PBS basado en un árbol bayesiano de los marcadores combinados (Figura 4.2-19) mostró que las incongruencias entre marcadores estaban asociadas a valores negativos pero reducidos de soporte de Bremer, en la práctica totalidad de los casos muy próximos a cero. Las dos únicas regiones del árbol donde existieron discrepancias de signo entre valores elevados de PBS se correspondieron respectivamente con un nodo vinculando a los tres individuos de *C. fulvilabris* con los de las especies *C. aff. acaciae*, *C. aff. tarsalis* y *C. pallida* (*cox1*: -4,88; CAD: -0,47; ITS2: 10,09; LSU: -0,74), y con el nodo que conecta estas especies con un clado que incluye a *C. bartoni*, *C. curtisi*, *C. ioptera*, *C. juncta*, *C. maculicollis*, *C. parilis*, *C. satelles* y *C. vittata* (*cox1*: -3,08; CAD: 2,76; ITS2: 8,26; LSU: -0,94). El análisis de PBS basado en el árbol bayesiano de marcadores combinados con el alineamiento ITS2 recodificado con Gblocks generó resultados similares (Figura 4.2-20), si bien en este caso la posición filogenética de los miembros de la especie *C. fulvilabris* fue



**Figura 4.2-19.** Resultados del análisis particionado de Bremer a partir del árbol bayesiano de marcadores combinados. Los valores numéricos asociados a los nodos se corresponden con los soportes particionados de Bremer para los cuatro marcadores, y siguen el orden: cox1/CAD/ITS2/LSU. (Continúa en la página siguiente)

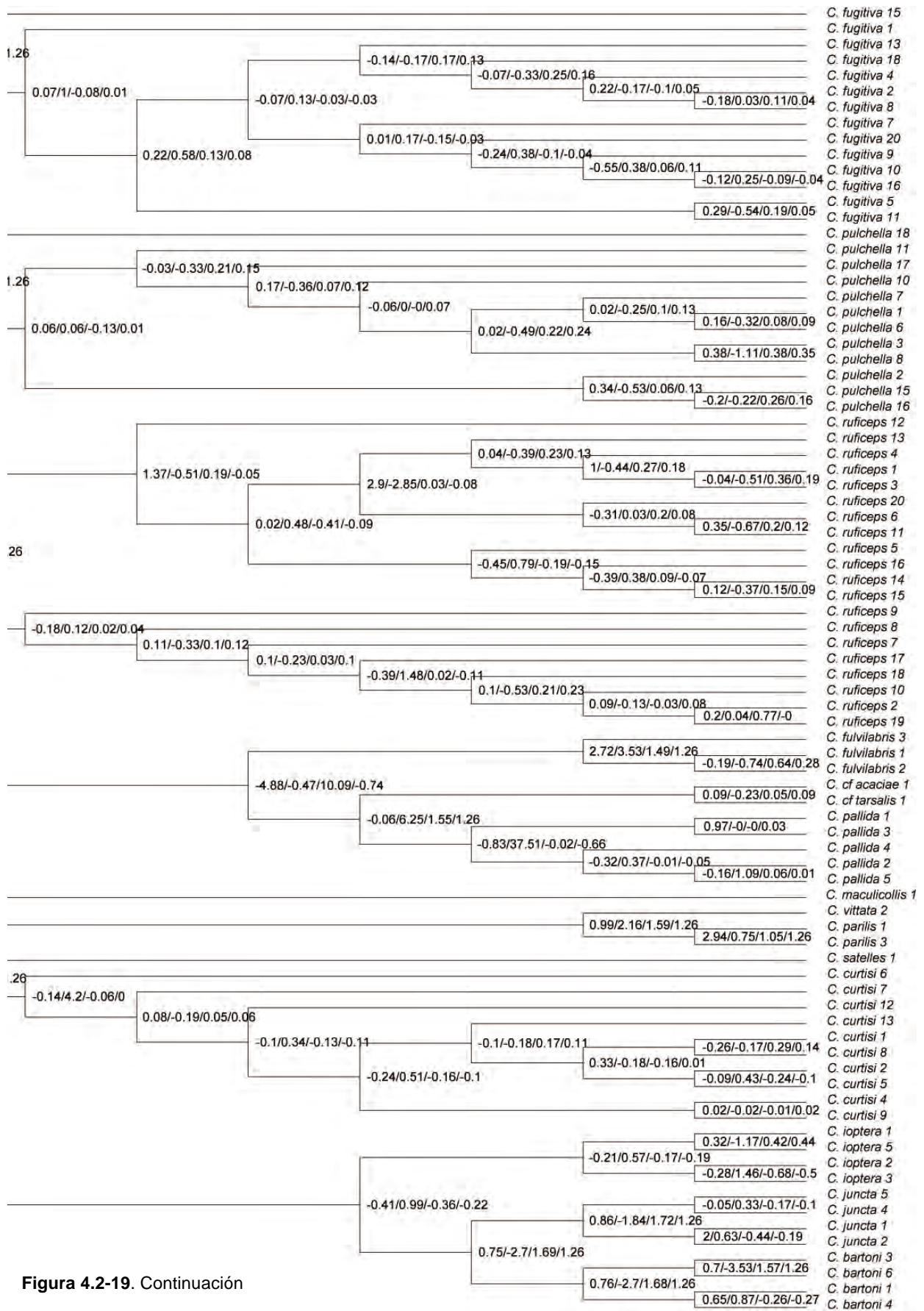
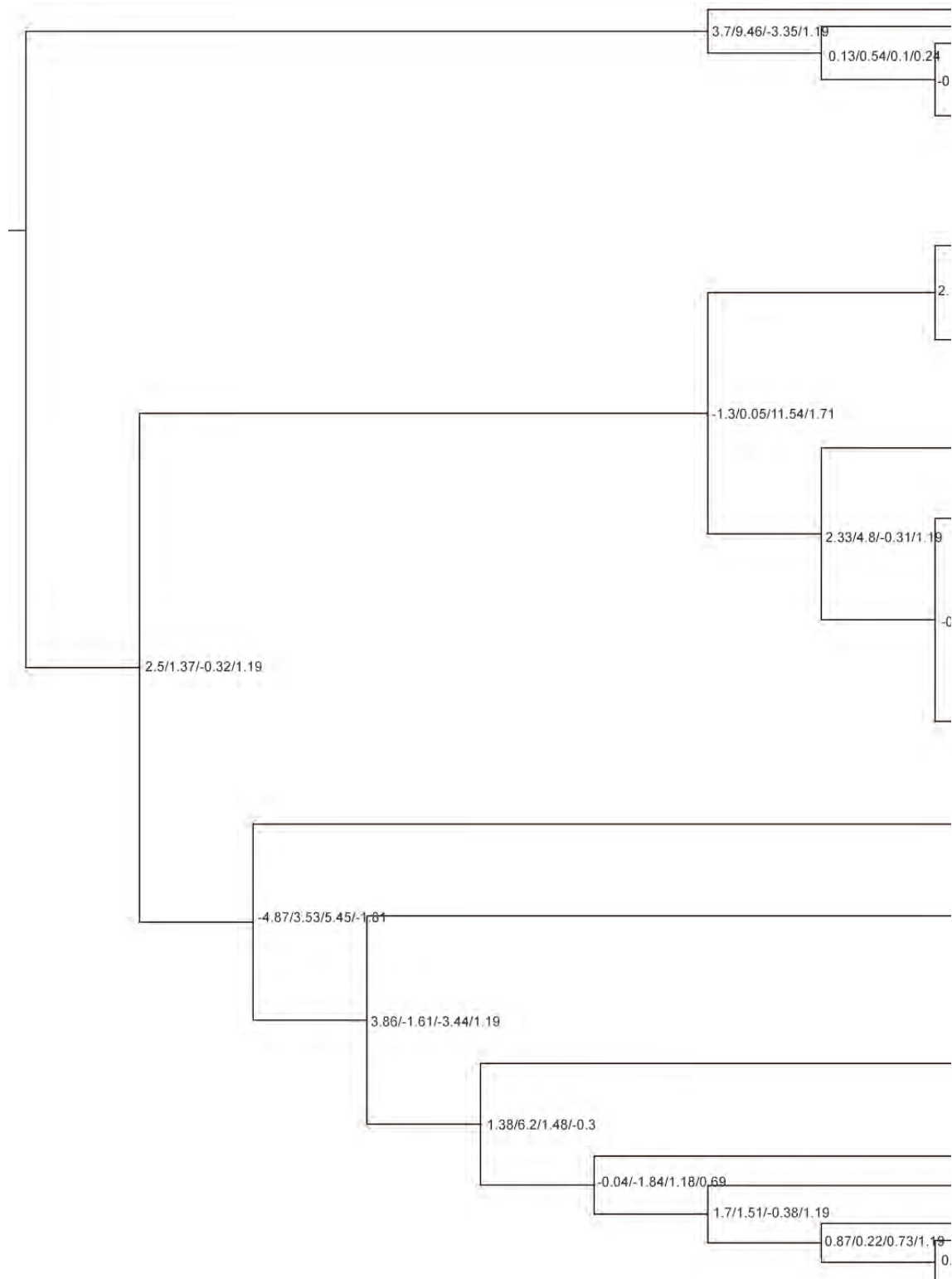


Figura 4.2-19. Continuación



**Figura 4.2-20.** Resultados del análisis particionado de Bremer a partir del árbol bayesiano de marcadores combinados donde el alineamiento ITS2 ha sido reducido con Gblocks. Los valores numéricos asociados a los nodos se corresponden con los soportes particionados de Bremer para los cuatro marcadores. v siguen el orden: cox1/CAD/ITS2/LSU. (Continúa en la página siguiente)

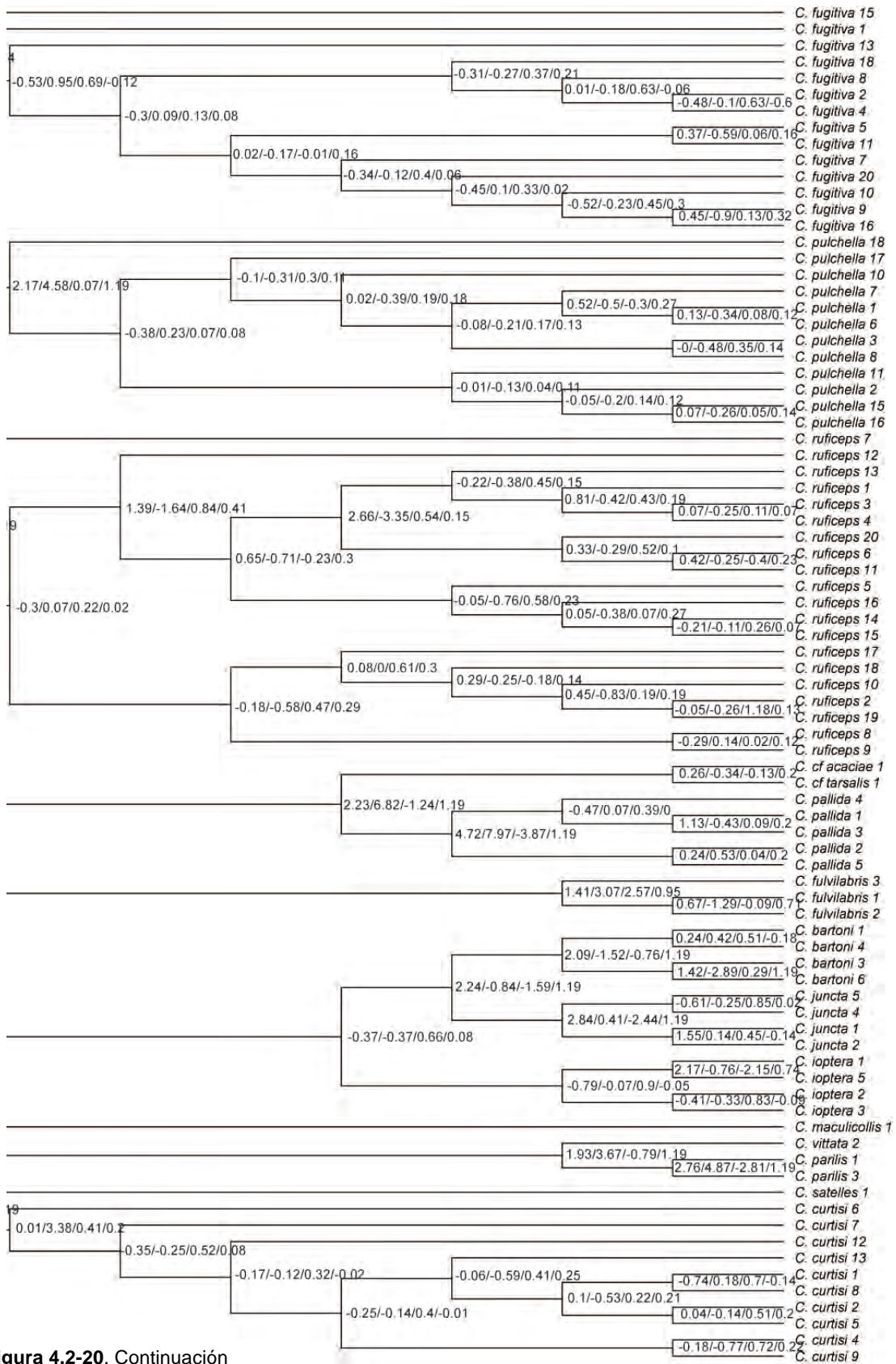


Figura 4.2-20. Continuación

diferente, pasando a ser hermana del clado integrado por las especies *C. bartoni*, *C. curtisi*, *C. ioptera*, *C. juncta*, *C. maculicollis*, *C. parilis*, *C. satelles* y *C. vittata*. Los valores de PBS para esta asociación fueron 3,86, -1,61, -3,44 y 1,19 para los marcadores *cox1*, CAD, ITS2 y LSU, respectivamente.

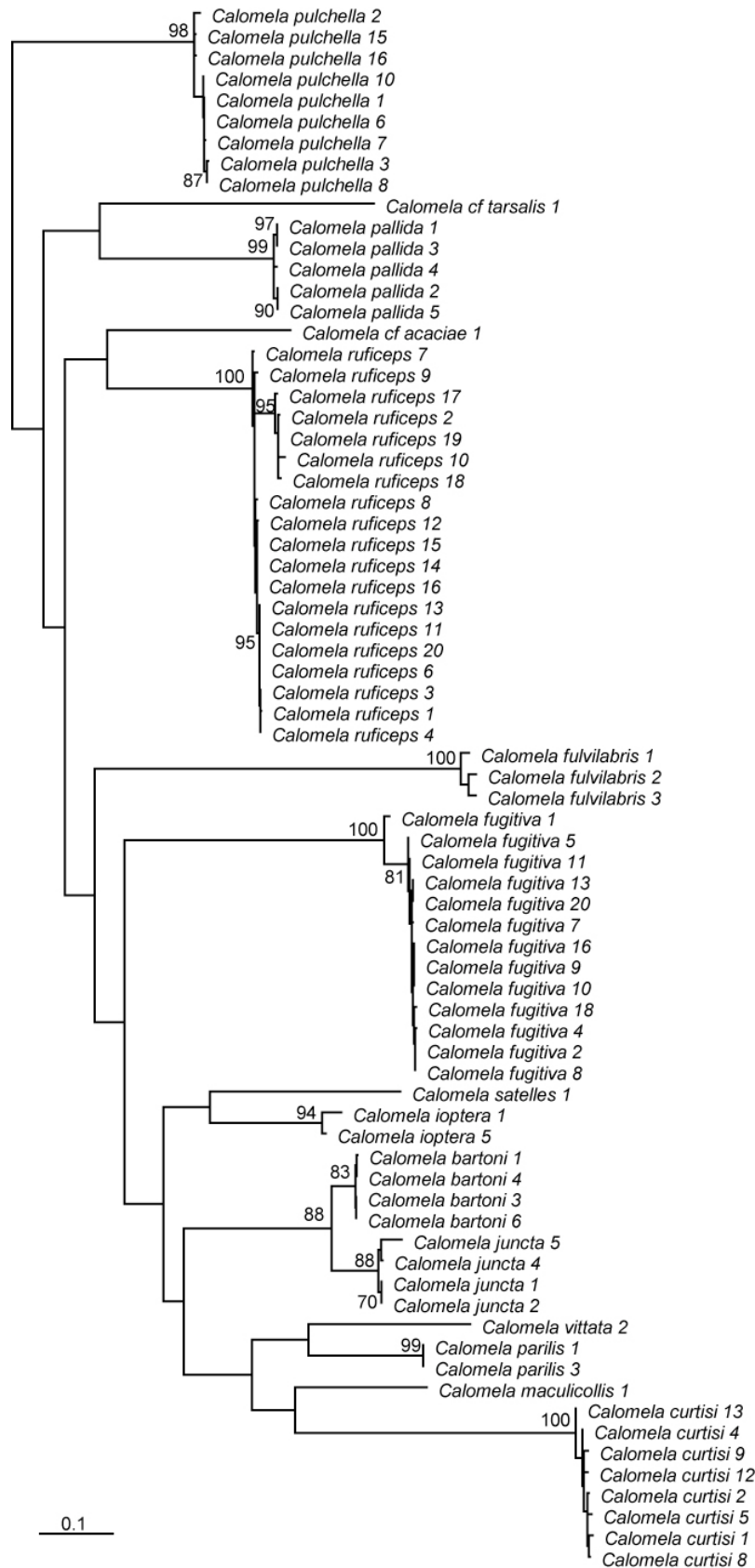
Atendiendo a los resultados obtenidos en los análisis de congruencia ILD y PBS, para llevar a cabo las inferencias filogenéticas tanto para los genes combinados como por cada uno de ellos por separado, se seleccionó la matriz reducida con las ambigüedades de alineamiento en ITS2 reducidas con Gblocks.

#### 4.2.4.6.- Filogenia de *Calomela*

Los árboles de máxima verosimilitud elegidos entre cinco réplicas independientes de búsqueda (Tabla 4.2-11) y sus respectivos valores de soporte *bootstrap* se muestran en las figuras 4.2-21 a 4.2-16.

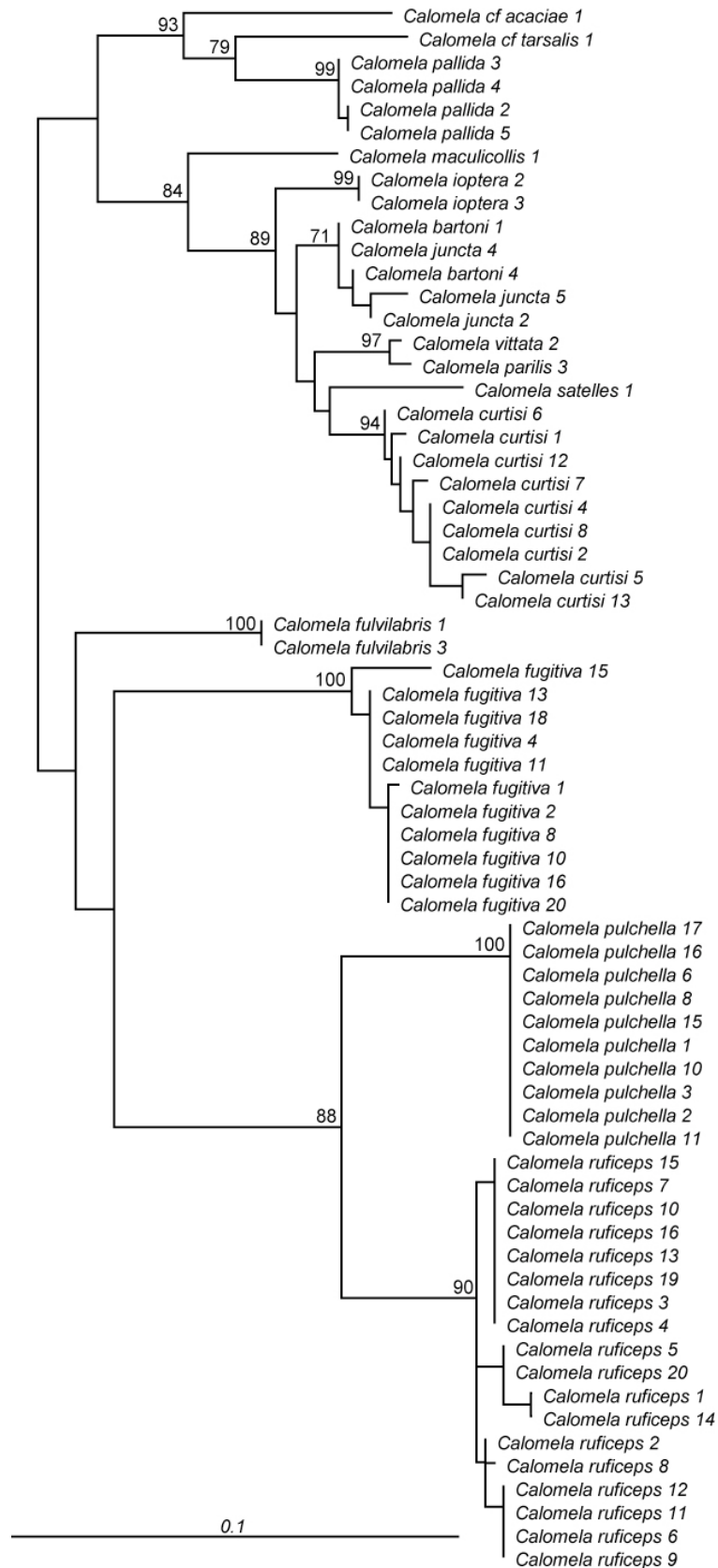
Réplica	<i>cox1</i>	CAD	ITS2	ITS2 <sup>a</sup>	LSU	Combinado	Combinado <sup>a</sup>
1	-5067.62520	-2017.54020	-2905.57520	-1897.08810	-1623.67600	-11953.50700	-10912.62100
2	-5066.24709	-2017.54839	-2905.57523	-1897.08809	-1623.67598	-11953.54173	-10912.60467
3	<b>-5065.73403</b>	-2017.54591	<b>-2905.57518</b>	<b>-1897.08808</b>	<b>-1623.67595</b>	-11953.57606	-10914.28462
4	-5067.63678	-2017.53553	-2905.57523	-1897.08809	-1623.67600	<b>-11953.49796</b>	-10916.60936
5	-5067.38599	<b>-2017.53414</b>	-2905.57519	-1897.08810	-1623.67596	-11953.60588	<b>-10912.43550</b>

**Tabla 4.2-11.** Valores de máxima verosimilitud obtenidos en los cinco análisis independientes ejecutados en Garli para cada uno de los conjuntos de datos estudiados. Los resultados señalados en negrita representan la mejor de las búsquedas. a = alineamiento ITS2 tras la eliminación con Gblocks de posiciones pobremente alineadas.

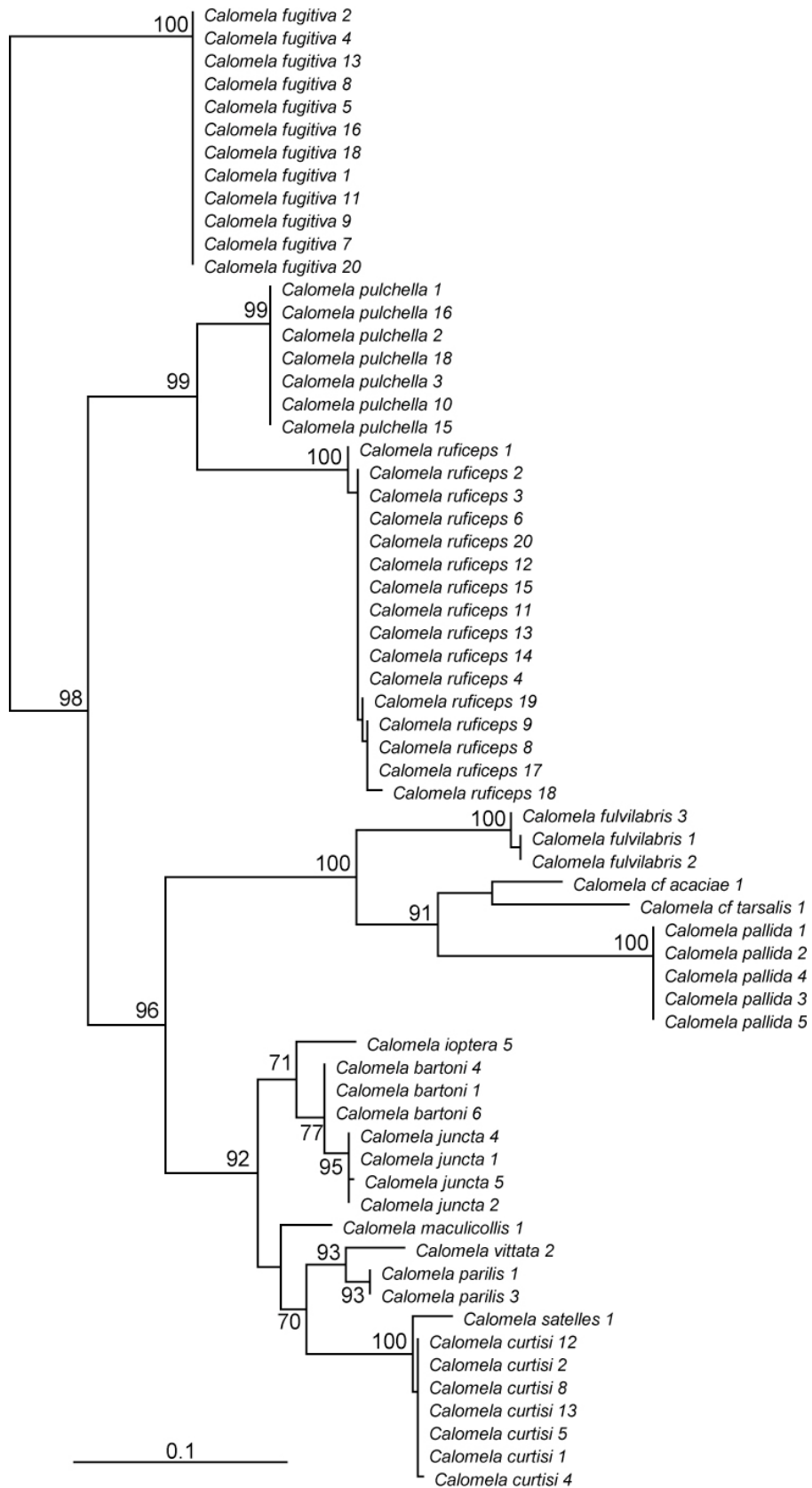


**Figura 4.2-21.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido en Garli a partir de la matriz de secuencias *cox1*. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de bootstrap. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con bootstrap  $\geq 70$ .

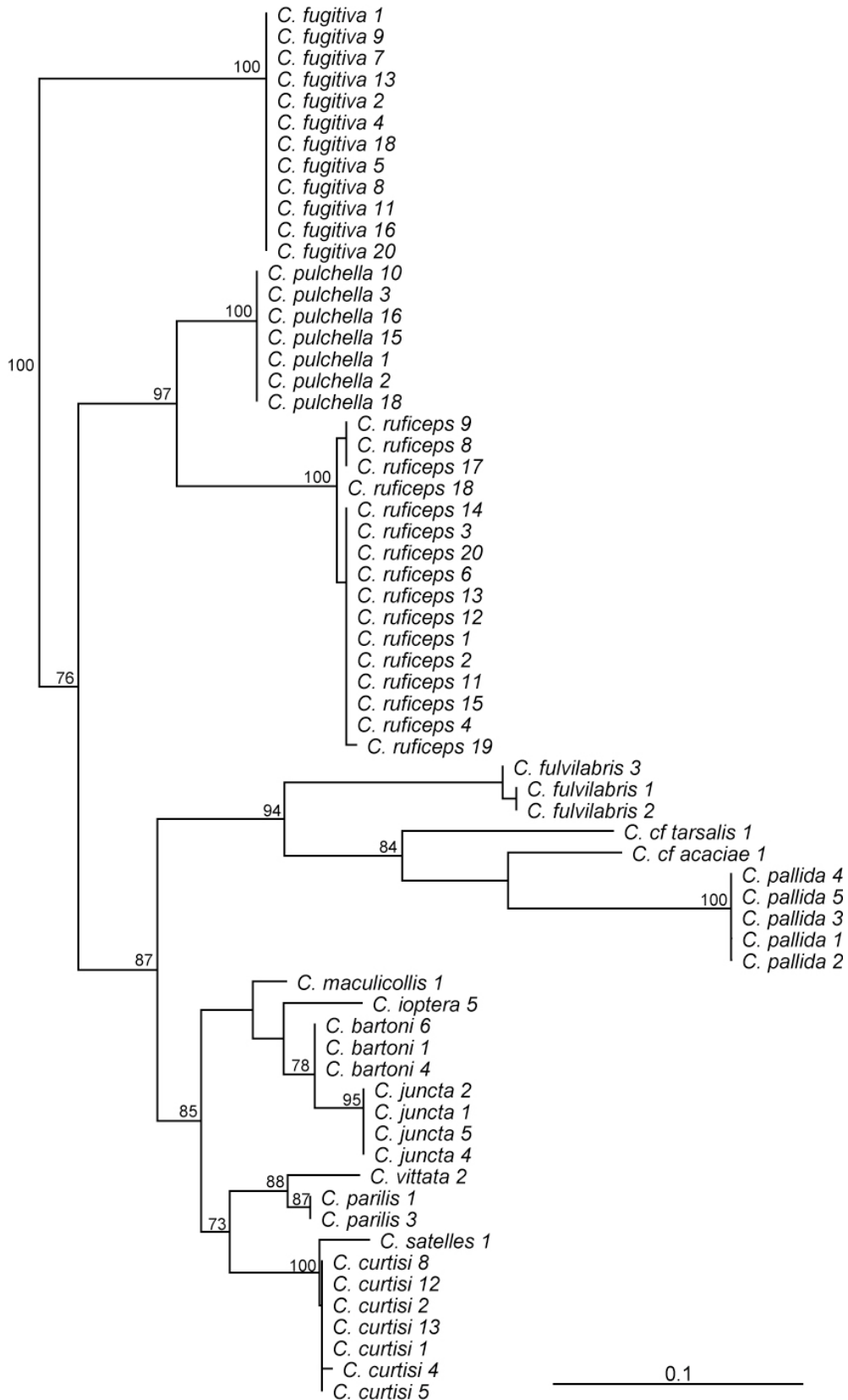




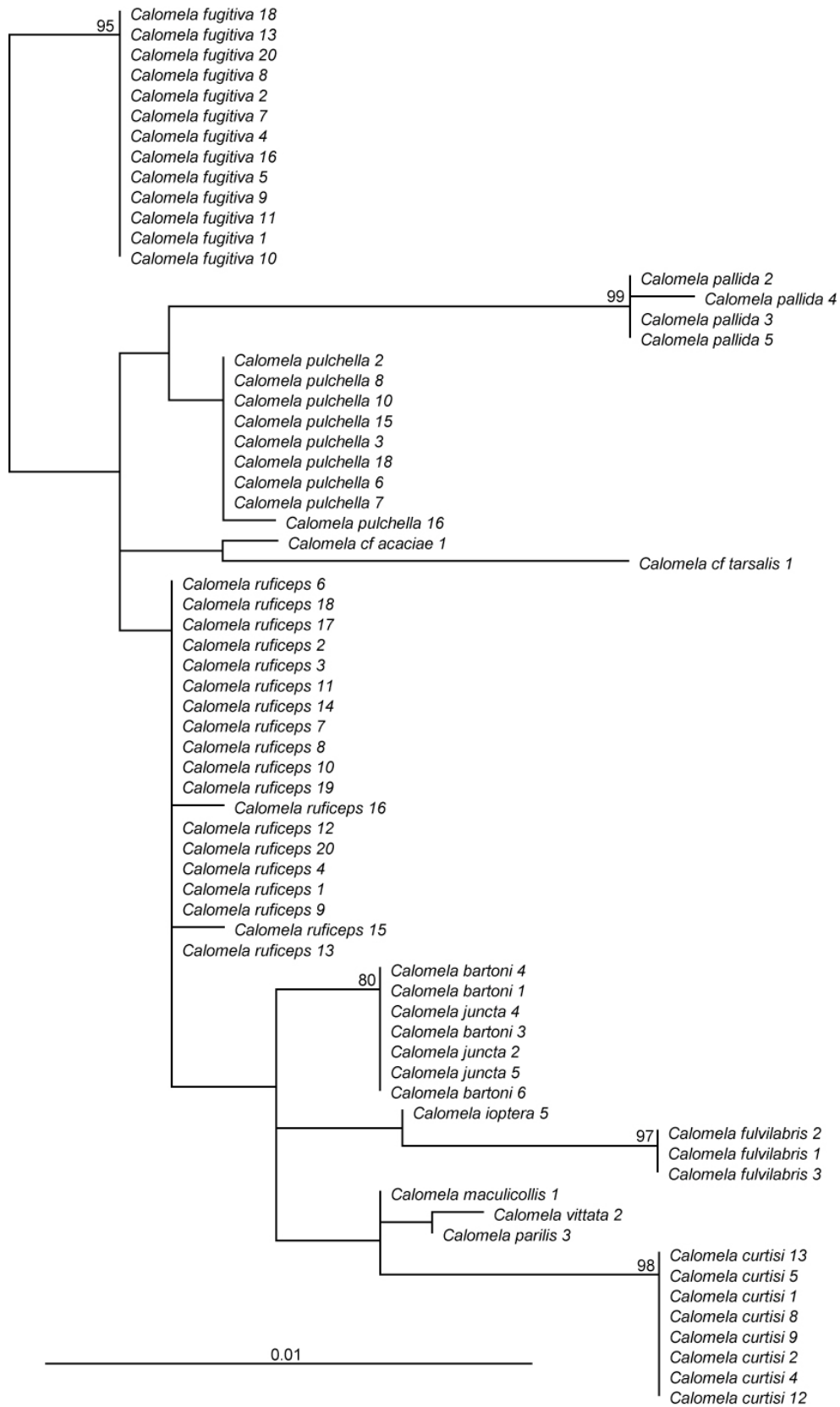
**Figura 4.2-22.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido en Garli a partir de la matriz de secuencias CAD. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de bootstrap. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con bootstrap  $\geq 70$ .



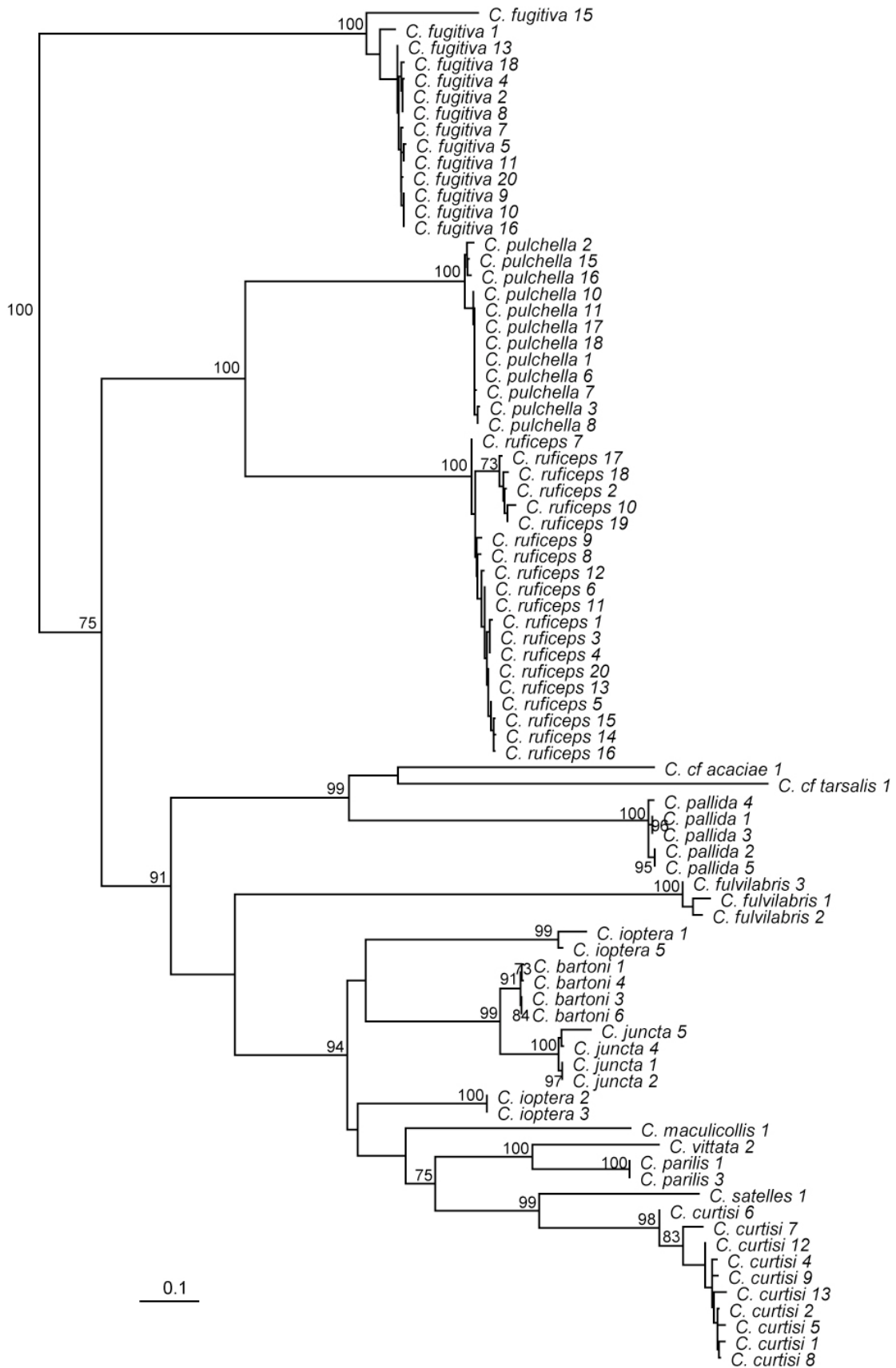
**Figura 4.2-23.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido en Garli a partir de la matriz de secuencias ITS2. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de bootstrap. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con bootstrap  $\geq 70$ .



**Figura 4.2-24.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido en Garli a partir de la matriz de secuencias ITS2 reducida con Gblocks. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de bootstrap. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con bootstrap  $\geq 70$ .



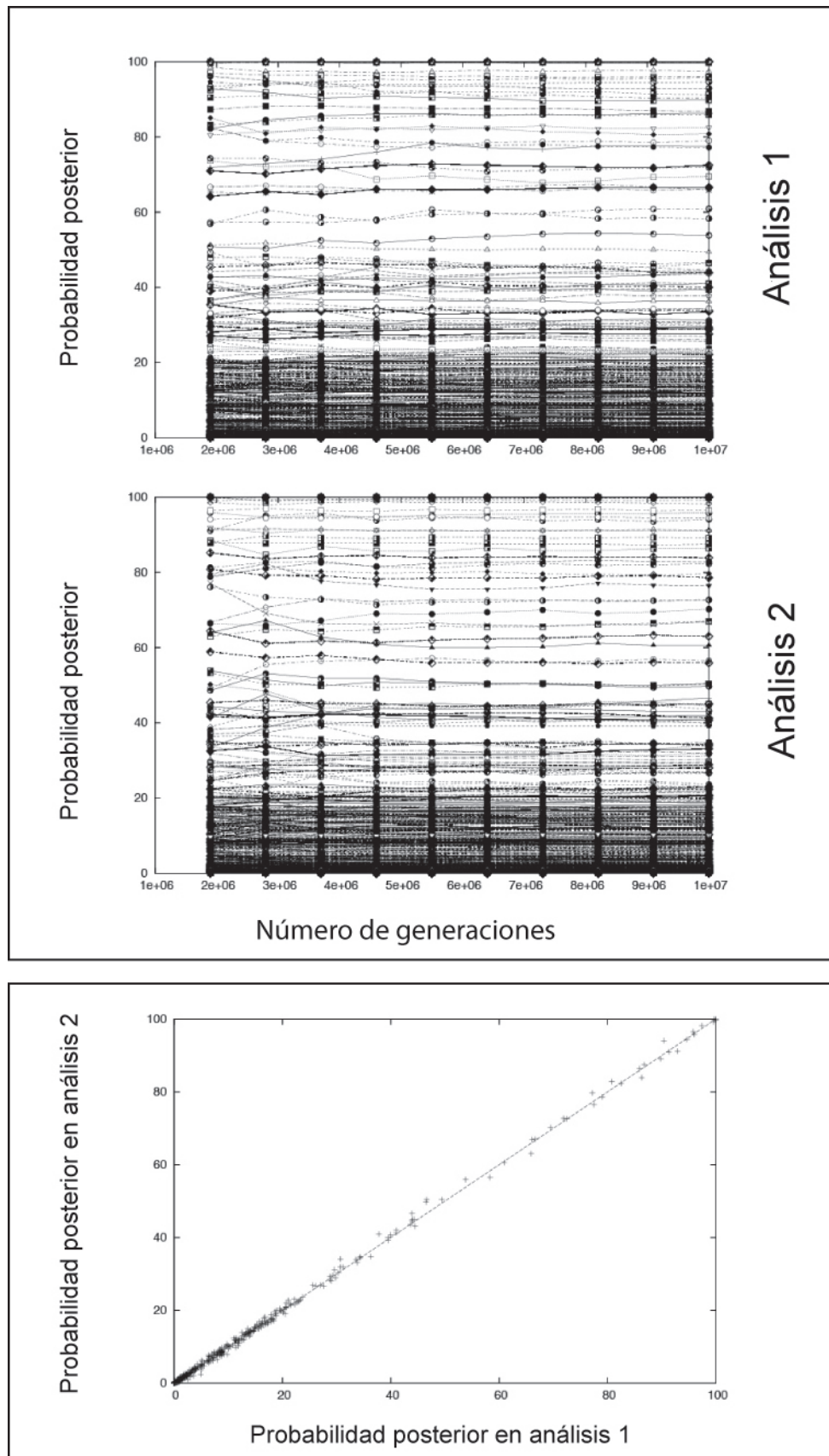
**Figura 4.2-25.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido en Garli a partir de la matriz de secuencias LSU. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de bootstrap. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con bootstrap  $\geq 70$ .



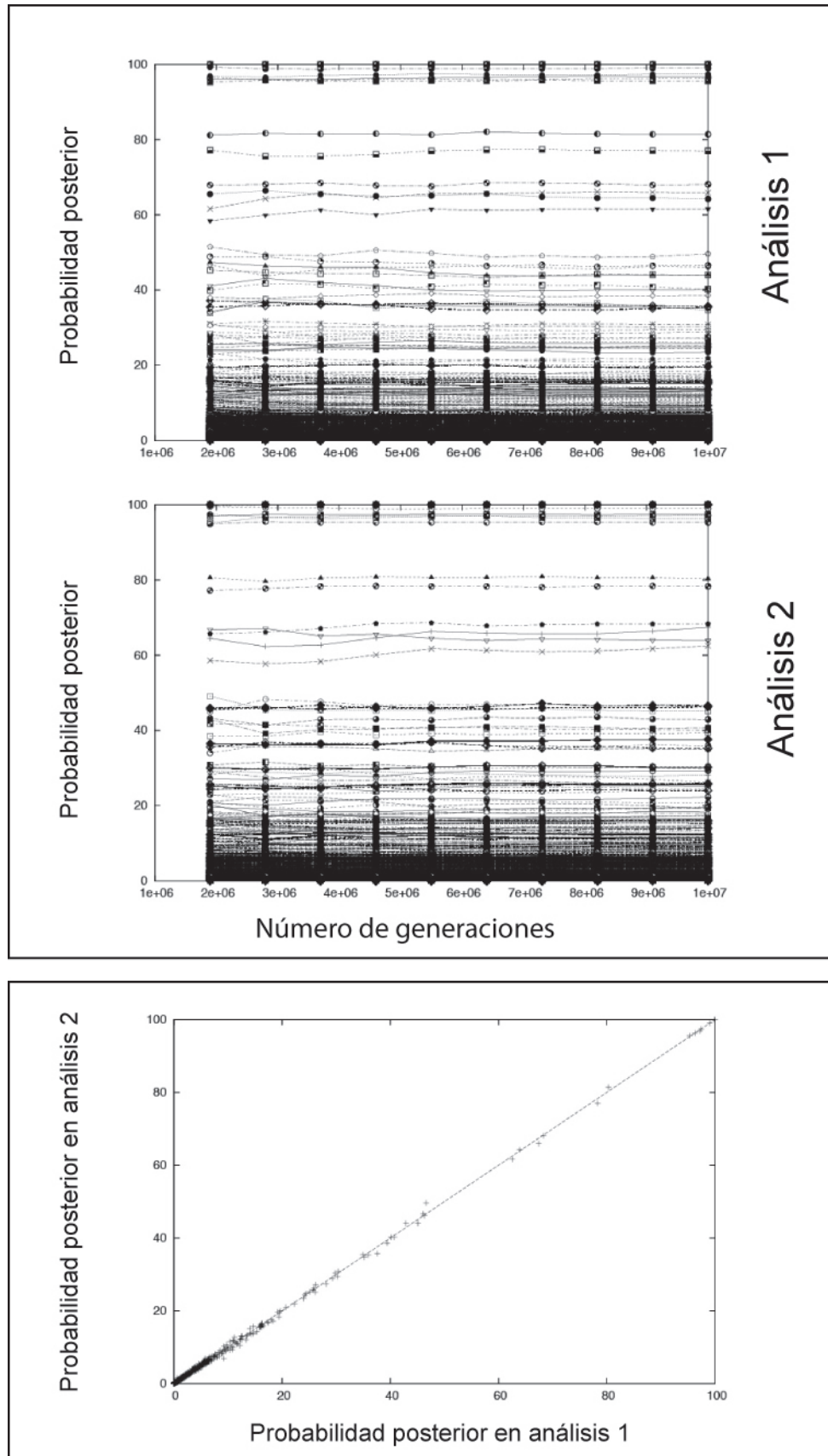
**Figura 4.2-26.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido en Garli a partir de la matriz de secuencias combinada (*cox1*, *CAD*, *ITS2* reducida con Gblocks, y *LSU*). Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de bootstrap. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con bootstrap  $\geq 70$ .

La exploración bayesiana de los datos generados durante los diferentes análisis MCMC determinó que en todos los casos un *burnin* equivalente al 10% inicial de las generaciones muestreadas (*i. e.*, un millón de generaciones) resultaba apropiado. Además, los gráficos obtenidos con AWYT a partir de los árboles colectados durante las búsquedas MCMC demostraron que los valores escogidos de 10 millones de generaciones en el caso de los genes analizados por separado y de 30 millones para la matriz combinada, garantizaban un nivel correcto de convergencia entre búsquedas independientes y en la estima de parámetros todos los casos (Figuras 4.2-27 a 4.2-31). Los árboles bayesianos para cada marcador y con sus respectivos valores de probabilidad posterior, se muestran en las figuras 4.2-32 a 4.2-37.

En general, ambos métodos de inferencia filogenética produjeron árboles muy similares entre sí. En la tabla 4.2-12 se muestra la comparación de las dos topologías obtenidas para cada matriz de datos. Los valores de similitud topológica obtenidos con el programa Compare2Trees se situaron entre el 80% (LSU) y el 95% (*cox1*). Consistentemente con estos resultados, las distancias de Robinson-Foulds estuvieron comprendidas entre 0,18 (*cox1*) y 0,72 (LSU). Los valores del índice de congruencia  $I_{cong}$  fueron altos en todos los casos, variando entre 2,13 (LSU) y 5,13 (matriz combinada), y con valores de significación estadística ( $P$ ) siempre inferiores a 0,00001. En todos los casos, las incongruencias topológicas detectadas se correspondieron con nodos no soportados, la gran mayoría de ellos pertenecientes a la porción más derivada de los árboles y afectando únicamente a las relaciones entre secuencias de una misma especie. La figura 4.2-38 ilustra la comparación entre topologías obtenidas a partir del análisis combinado de los datos bajo los criterios de máxima verosimilitud y bayesiano. La monofilia de las especies para las cuales se analizó más de un ejemplar, quedó demostrada y soportada en todos los casos (*C. bartoni*:  $pp = 0,98$ / $bootstrap = 91$ ; *C. curtisi*: 1,00/98; *C. fugitiva*: 1,00/100; *C. fulvilabris*: 1,00/100; *C. juncta*: 1,00/100; *C. pallida*: 1,00/100; *C. parilis*: 1,00/100; *C. pulchella*: 1,00/100; *C. ruficeps* 1,00/100), a excepción de la especie *C. ioptera* en el árbol de máxima verosimilitud. Los mismos resultados se obtuvieron a partir de los marcadores moleculares analizados por separado, excepto para las especies menos divergentes *C. bartoni* y *C. juncta* en los análisis de los dos marcadores con menor grado de variabilidad, CAD y LSU. Este último marcador tampoco permitió resolver la monofilia de *C. ruficeps*.

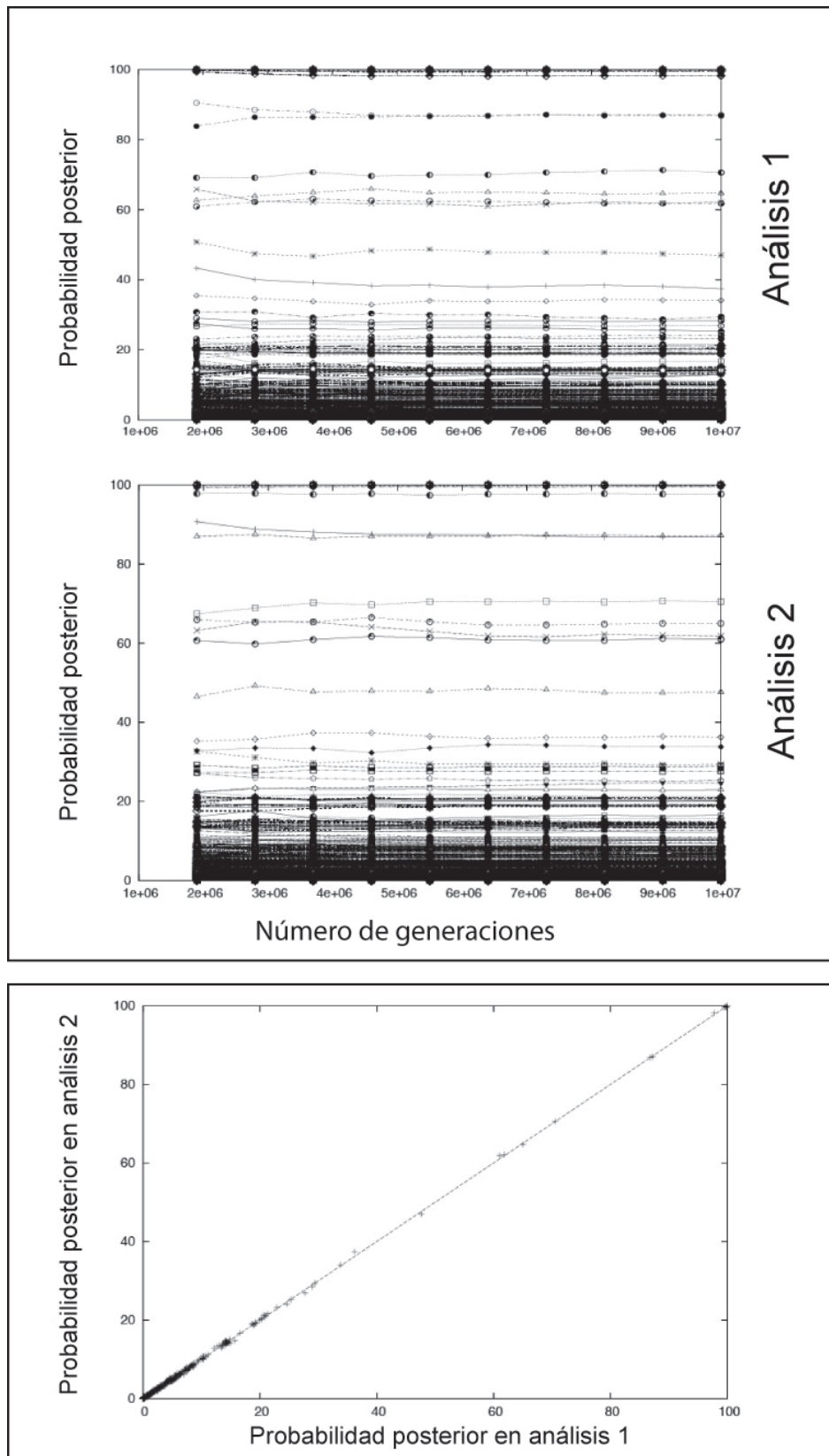


**Figura 4.2-27.** Graficas AWTY para los análisis bayesianos de la matriz *cox1*. El recuadro superior contiene las representaciones de los valores de probabilidad posterior asociados a cada una de las bifurcaciones recuperadas en el análisis a lo largo de las generaciones. El recuadro inferior muestra un enfrentamiento de los valores de probabilidad recuperados de manera independiente en los dos análisis.

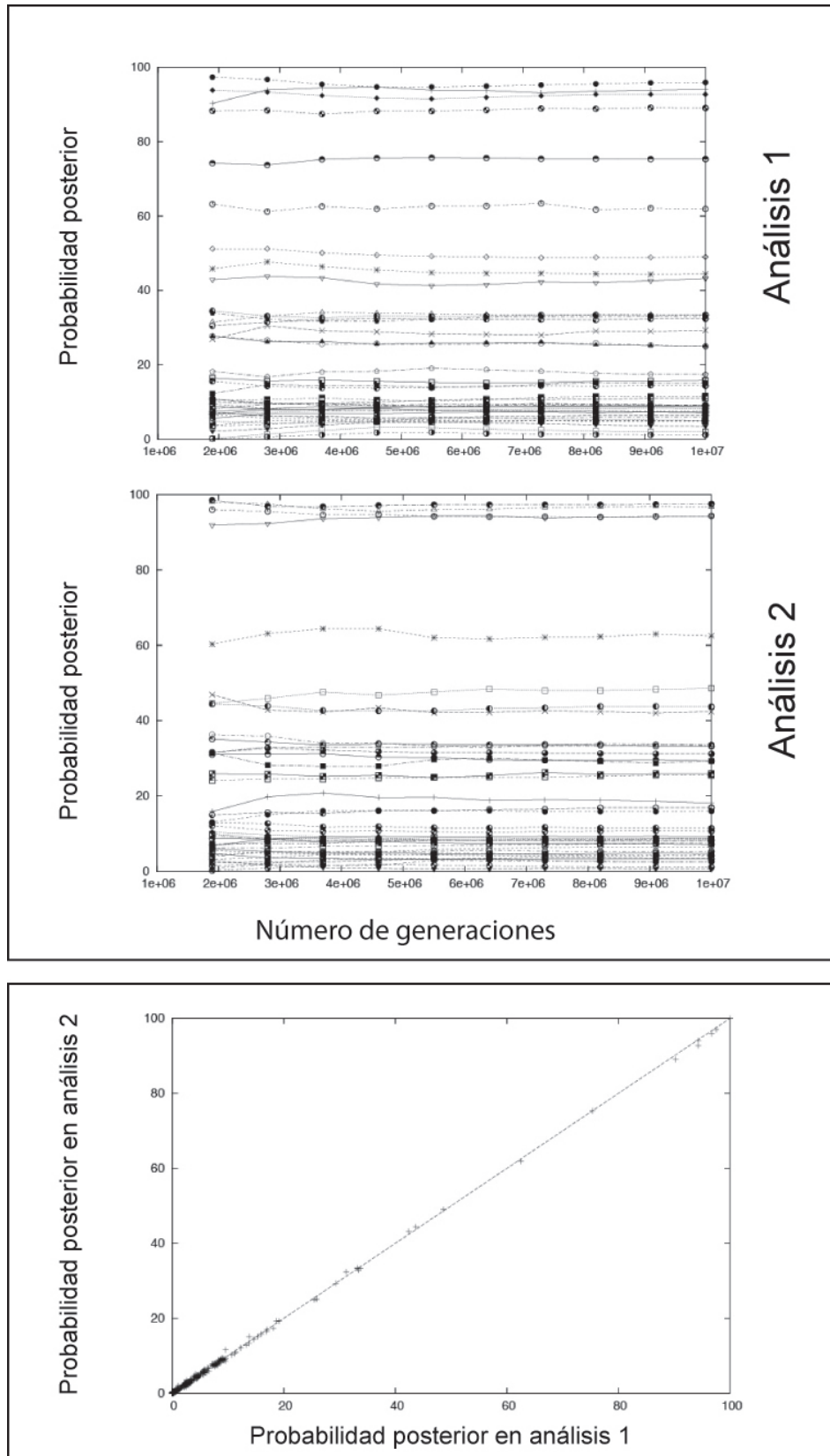


**Figura 4.2-28.** Graficas AWTY para los análisis bayesianos de la matriz CAD. El recuadro superior contiene las representaciones de los valores de probabilidad posterior asociados a cada una de las bifurcaciones recuperadas en el análisis a lo largo de las generaciones. El recuadro inferior muestra un enfrentamiento de los valores de probabilidad recuperados de manera independiente en los dos análisis.

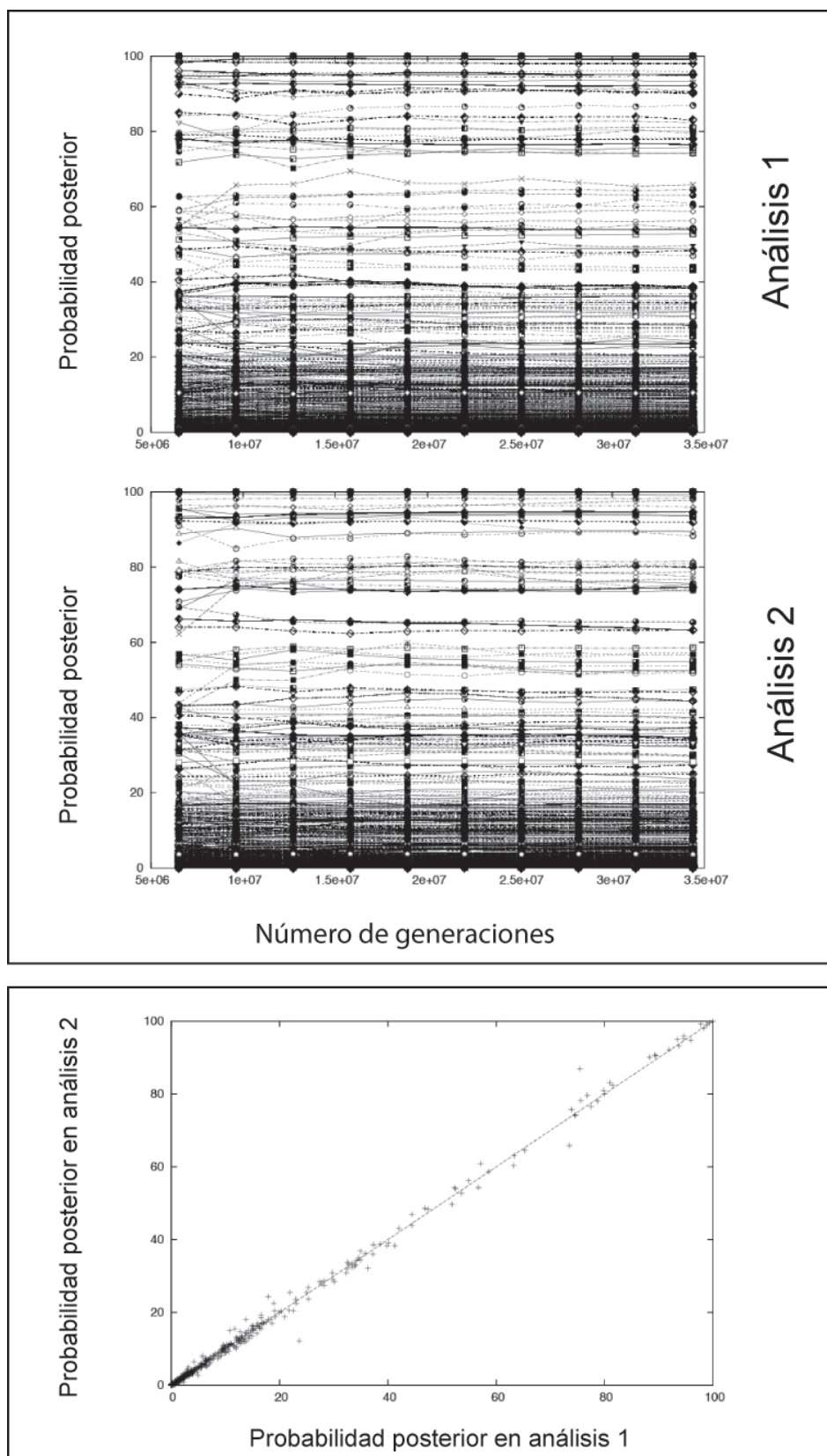




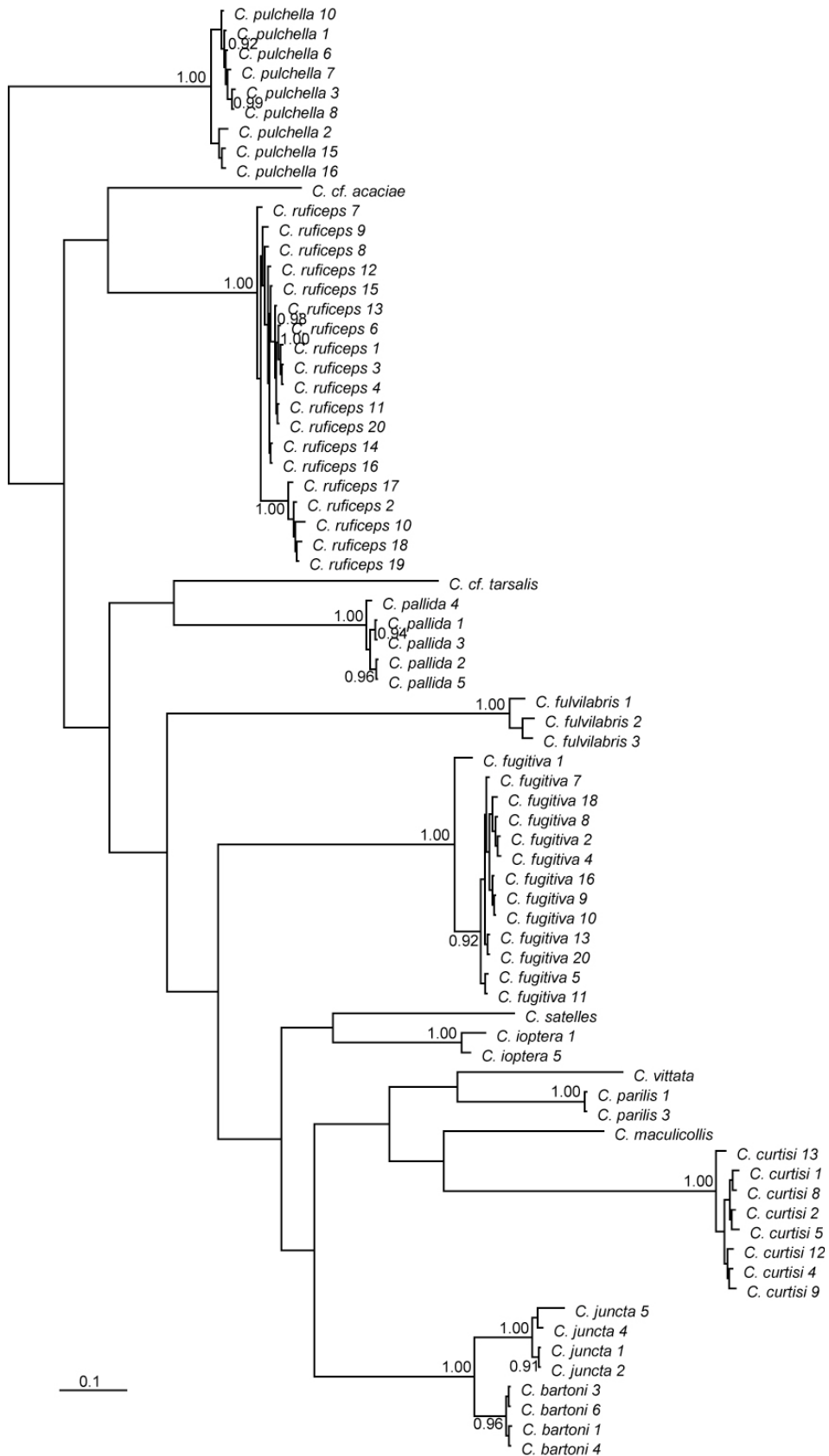
**Figura 4.2-29** Graficas AWTY para los análisis bayesianos de la matriz ITS2 reducida con Gblocks. El recuadro superior contiene las representaciones de los valores de probabilidad posterior asociados a cada una de las bifurcaciones recuperadas en el análisis a lo largo de las generaciones. El recuadro inferior muestra un enfrentamiento de los valores de probabilidad recuperados de manera independiente en los dos análisis.



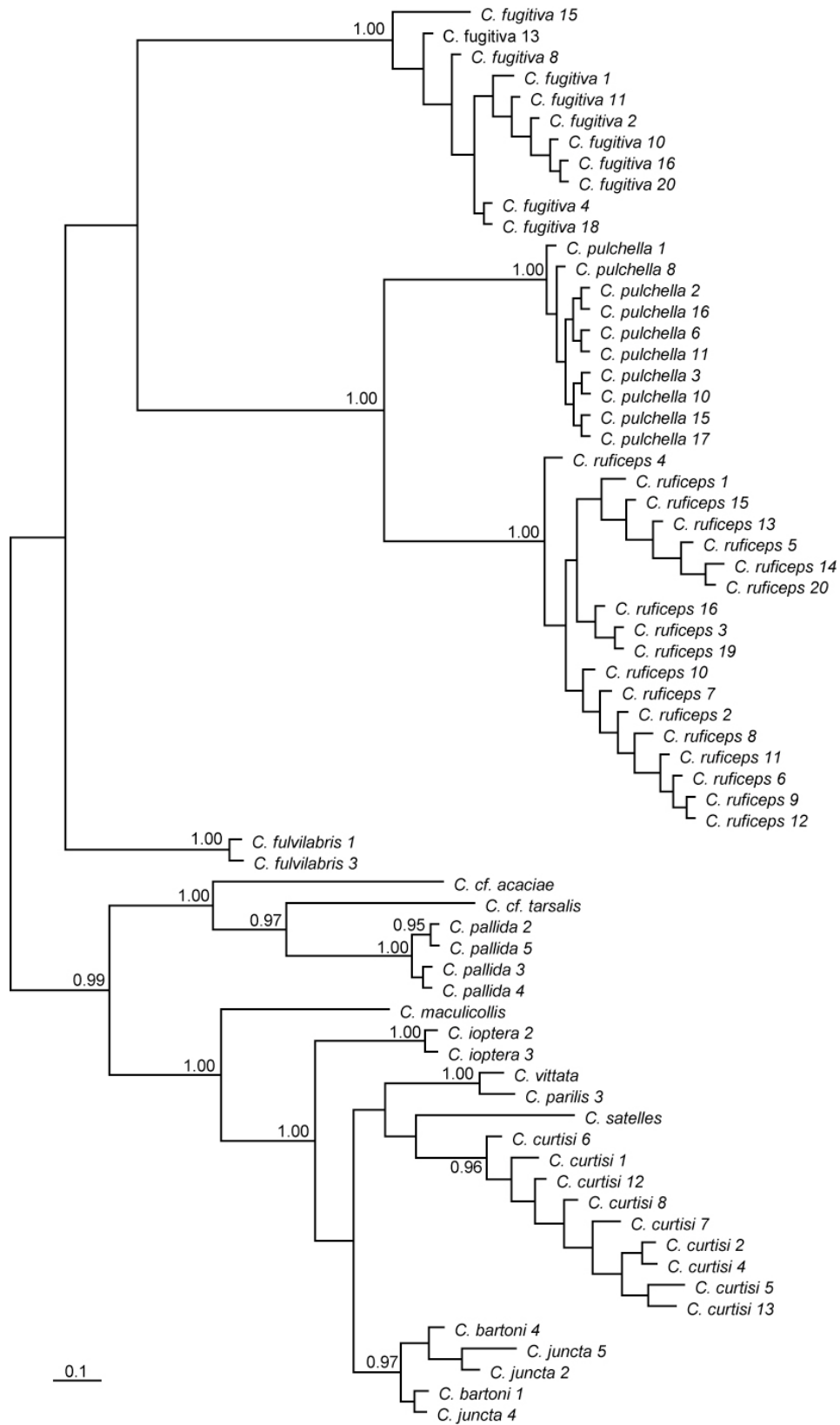
**Figura 4.2-30** Graficas AWTY para los análisis bayesianos de la matriz LSU. El recuadro superior contiene las representaciones de los valores de probabilidad posterior asociados a cada una de las bifurcaciones recuperadas en el análisis a lo largo de las generaciones. El recuadro inferior muestra un enfrentamiento de los valores de probabilidad recuperados de manera independiente en los dos análisis.



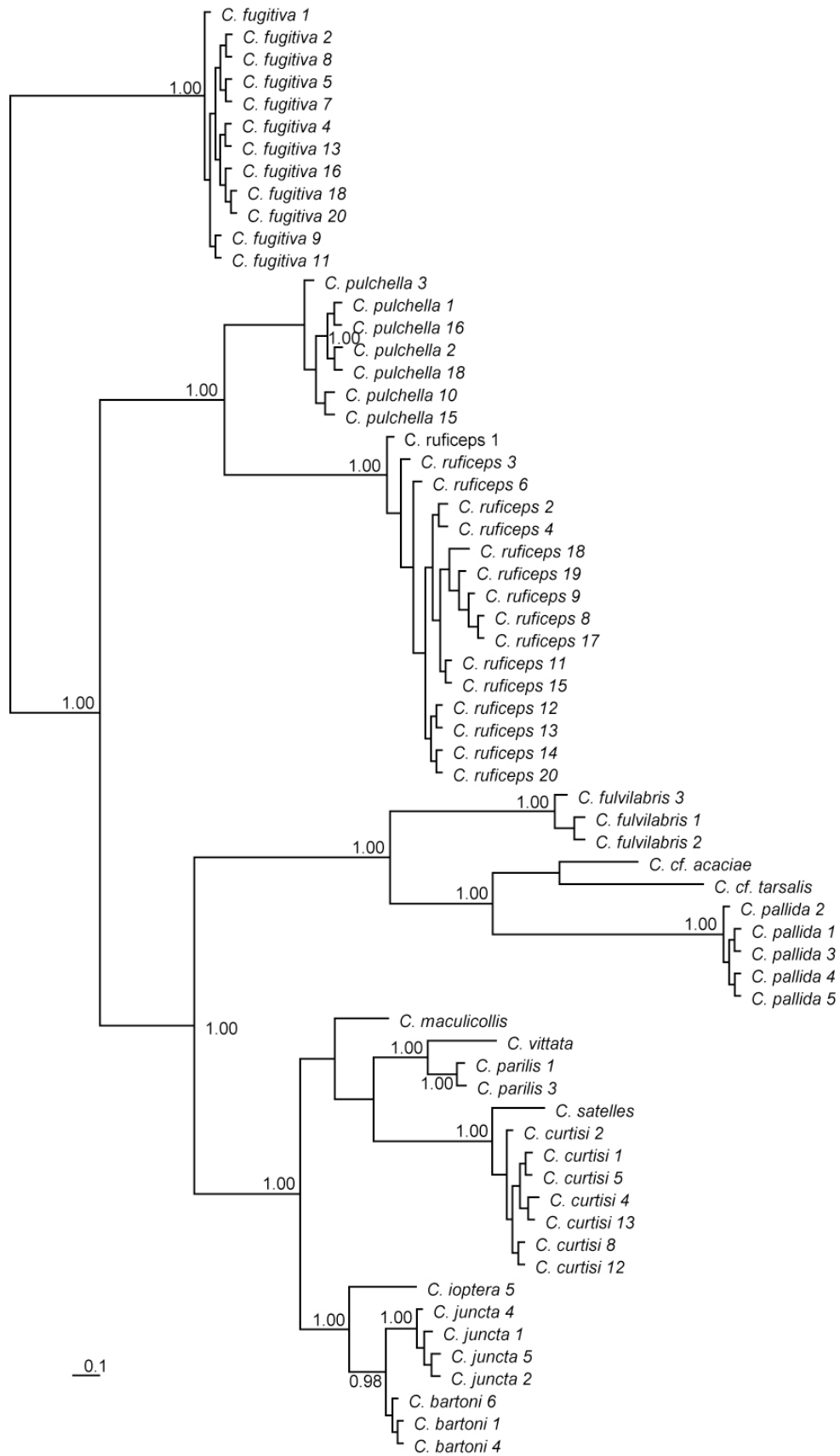
**Figura 4.2-31** Graficas AWTY para los análisis bayesianos de la matriz combinada de marcadores (cox1, CAD, ITS2 reducida con Gblocks, y LSU). El recuadro superior contiene las representaciones de los valores de probabilidad posterior asociados a cada una de las bifurcaciones recuperadas en el análisis a lo largo de las generaciones. El recuadro inferior muestra un enfrentamiento de los valores de probabilidad recuperados de manera independiente en los dos análisis.



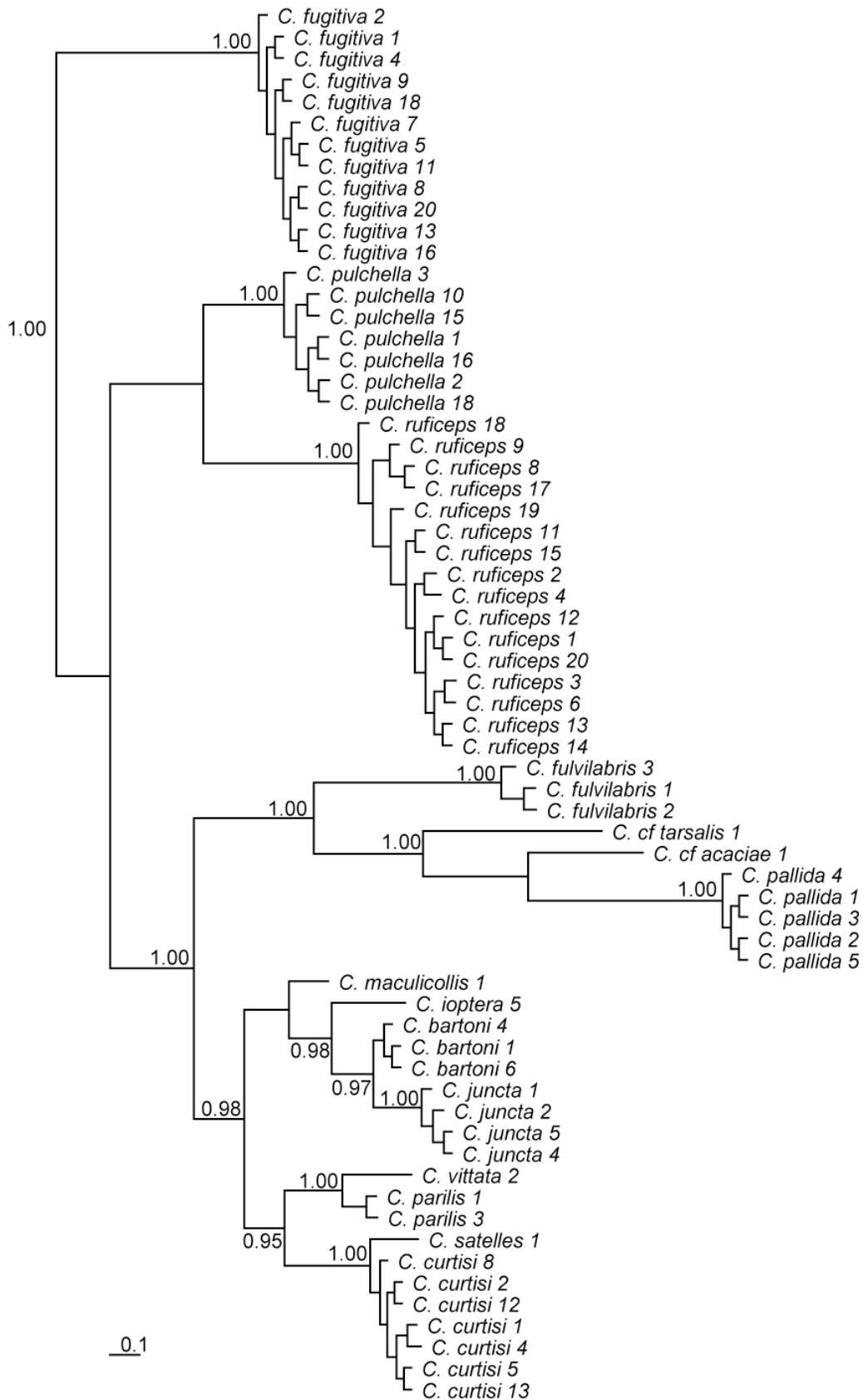
**Figura 4.2-32.** Árbol filogenético bayesiano obtenido con MrBayes a partir de la matriz alineada de secuencias *cox1*. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de probabilidad posterior. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con probabilidad posterior  $\geq 0.95$ .



**Figura 4.2-33.** Árbol filogenético bayesiano obtenido con MrBayes a partir de la matriz alineada de secuencias CAD. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de probabilidad posterior. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con probabilidad posterior  $\geq 0.95$ .



**Figura 4.2-34.** Árbol filogenético bayesiano obtenido con MrBayes a partir de la matriz alineada de secuencias ITS2. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de probabilidad posterior. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con probabilidad posterior  $\geq 0.95$ .



**Figura 4.2-35.** Árbol filogenético bayesiano obtenido con MrBayes a partir de la matriz alineada de secuencias ITS2 reducida con Gblocks. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de probabilidad posterior. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con probabilidad posterior  $\geq 0.95$ .



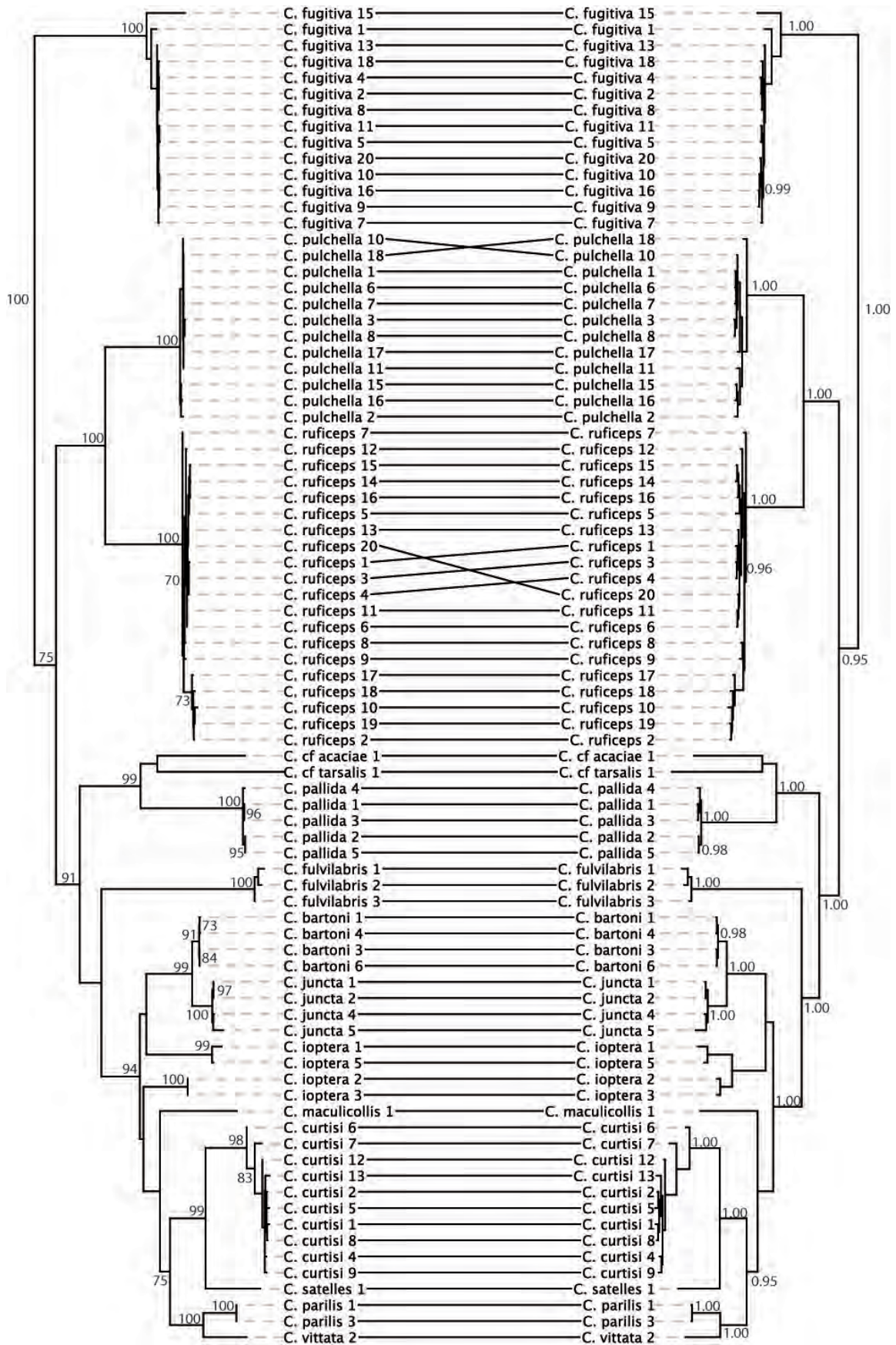
**Figura 4.2-36.** Árbol filogenético bayesiano obtenido con MrBayes a partir de la matriz alineada de secuencias LSU. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de probabilidad posterior. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con probabilidad posterior  $\geq 0.95$ .





Marcador molecular	Comparaciones entre árboles bayesianos y de máxima verosimilitud		
	Similitud global	Índice de congruencia	Distancia Robinson-Foulds
cox1	0,95	4,64 (P < 0,0001)	0,18
CAD	0,88	3,80 (P < 0,0001)	0,46
ITS2	0,87	3,86 (P < 0,0001)	0,51
ITS2 <sup>a</sup>	0,86	3,53 (P < 0,0001)	0,54
LSU	0,80	2,13 (P < 0,0001)	0,72
matriz combinada	0,94	5,13 (P < 0,0001)	0,23
matriz combinada reducida <sup>a</sup>	0,94	4,76 (P < 0,0001)	0,23

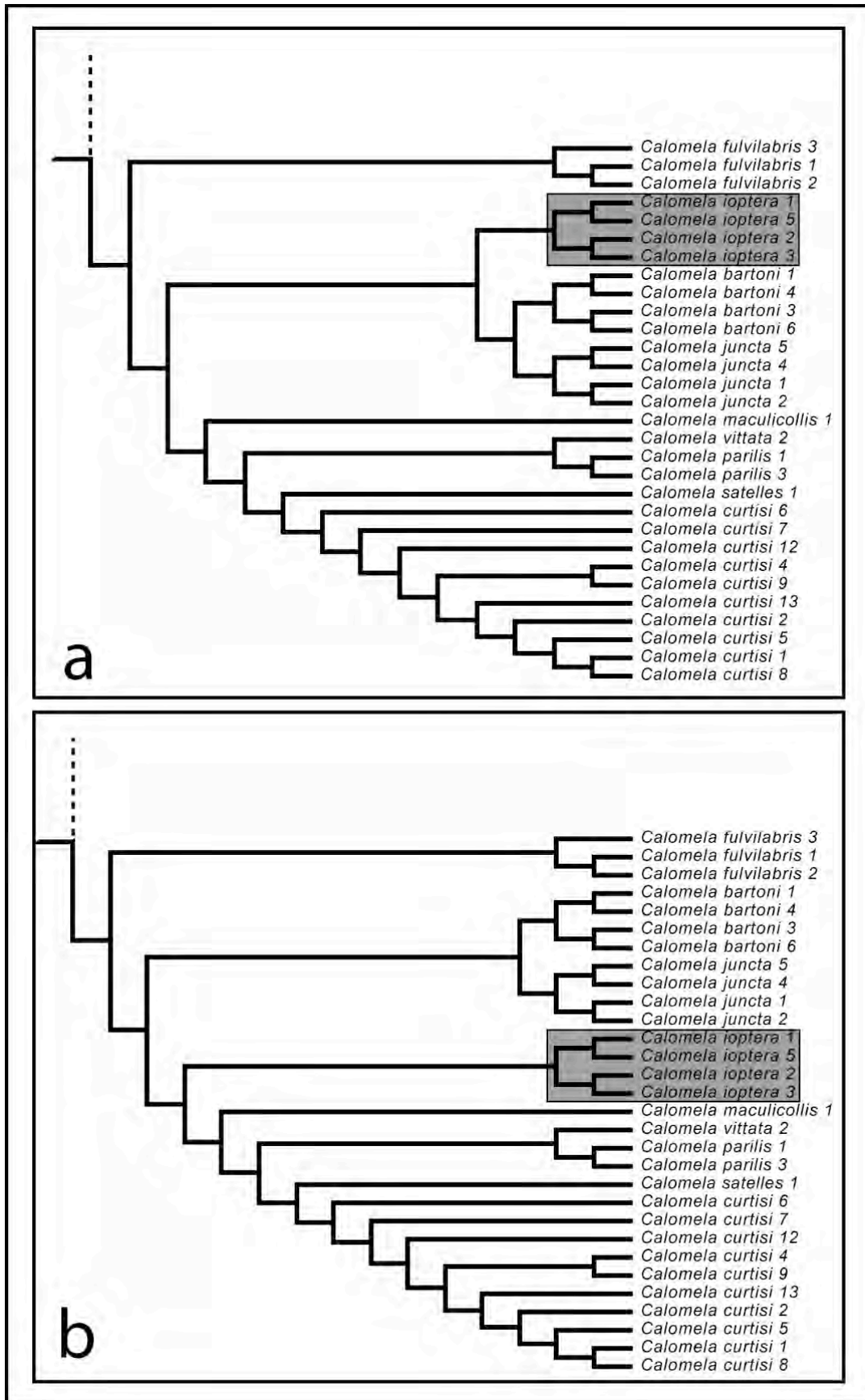
**Tabla 4.2-12.** Resultados de las pruebas de congruencia topológica entre los análisis de máxima verosimilitud y bayesianos para cada uno de los conjuntos de datos estudiados. (a = posiciones ITS2 pobremente alineadas eliminadas con Gblocks, ver texto principal).



**Figura 4.2-38.** Árboles filogenéticos enfrentados basados respectivamente en los análisis de marcadores combinados de máxima verosimilitud (izquierda) y bayesiano (derecha). Se muestran los valores de bootstrap  $\geq 70$  y de probabilidad posterior  $\geq 0.95$ .

Las relaciones filogenéticas interespecíficas obtenidas con ambos métodos resultaron idénticas exceptuando las discrepancias no soportadas en cuanto a la monofilia de la especie *C. ioptera*. Con la finalidad de testar la relación entre los cuatro ejemplares de *C. ioptera*, las topologías de máxima verosimilitud y bayesiana se compararon con dos árboles modificados a partir de la topología de máxima verosimilitud y en los cuáles se forzó la monofilia de los ejemplares de *C. ioptera* (Figura 4.2-39) y considerando el modelo evolutivo óptimo obtenido para el conjunto de secuencias combinadas donde la matriz ITS2 se había reducido con Gblocks (GTR+I+G). Los resultados (Tabla 4.2-13) mostraron la elección del árbol con *C. ioptera* monofilética y hermana del clado (*C. bartoni*, *C. juncta*) como la mejor topología en todos los casos (Figura 4.2-39-a). Esta solución coincidía con la topología del árbol bayesiano.

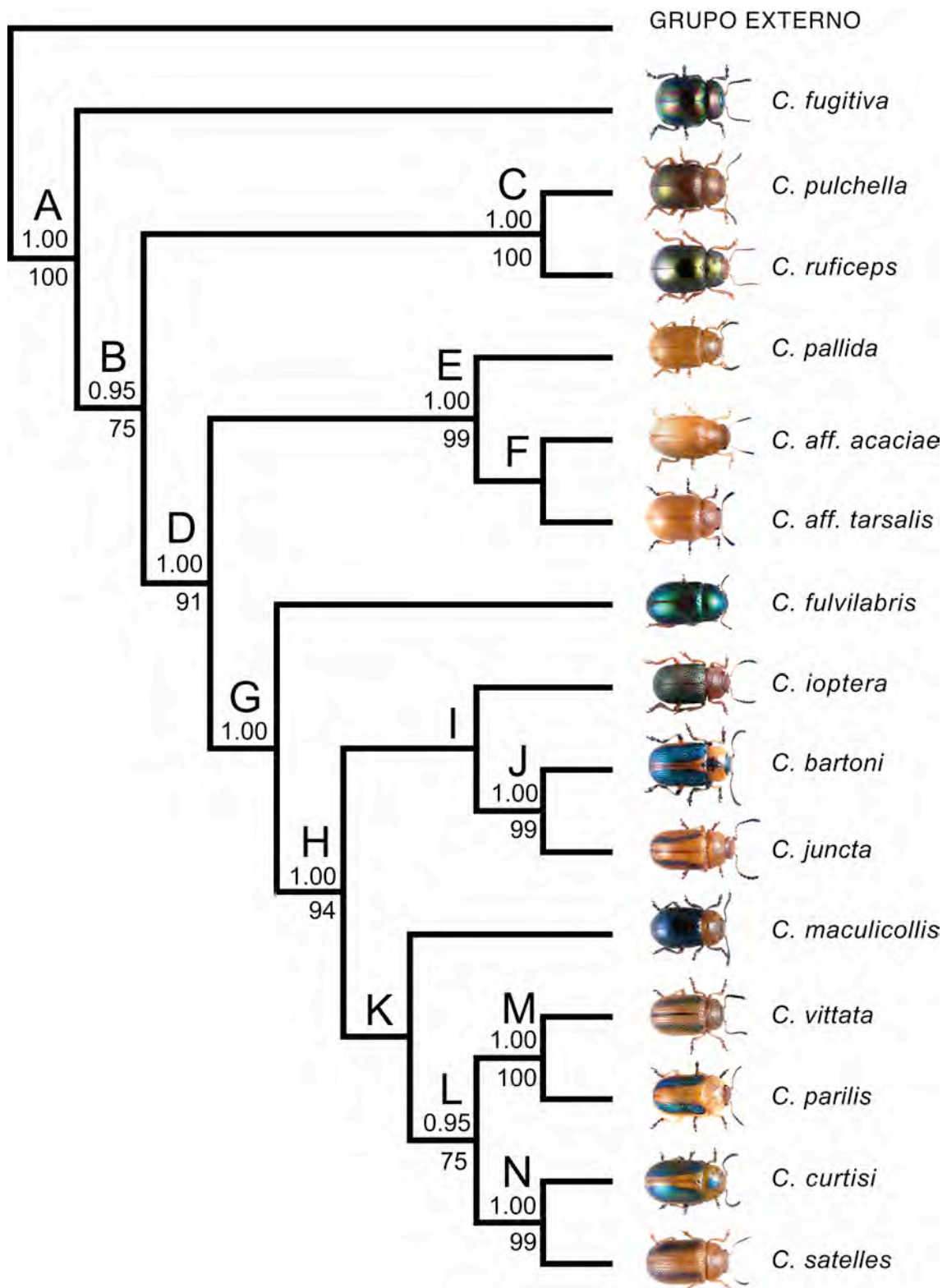
La figura 4.2-40 muestra el árbol consenso estricto basado en los análisis de máxima verosimilitud y bayesiano a partir de la matriz combinada de los datos de *Calomela* tras el filtrado de posiciones ITS2 pobremente alineadas. Los valores de soporte fueron altos para la mayoría de nodos ( $pp \geq 0,95$ ;  $bootstrap \geq 70\%$ ) excepto en el caso de los clados identificados en la figura con las letras F, I y K. En la filogenia se distinguieron cinco linajes bien diferenciados y soportados: (i) *C. fugitiva*, (ii) *C. pulchella* y *C. ruficeps* (clado C), (iii) grupo de *C. pallida* (clado E), (iv) *C. fulvilabris*, (v) y el resto de especies estudiadas (clado H).



**Figura 4.2-39.** Modificaciones topológicas a partir del árbol de máxima verosimilitud de marcadores combinados para evaluar la monofilia y posición filogenética de los cuatro ejemplares de *Calomela ioptera*.

árbol	log Verosimilitud	diferencia	desv. est.	p-SH	c-ELW
Bayes	-12611.49	0.09	0.4516	0.8350 +	0.2089 +
Garli	-12611.71	0.31	15.7040	0.5160 +	0.4503 +
Garli modificado (Fig. 4.2-39-a)	-12611.40	0.00	mejor	1.0000 +	0.2332 +
Garli modificado (Fig. 4.2-39-b)	-12613.26	1.86	2.2431	0.5580 +	0.1077 +

**Tabla 4.2-13.** Resultado de la batería de pruebas estadísticas para testar hipótesis filogenéticas alternativas en TreePuzzle. Las columnas muestran el resultado y los valores asociados del significación estadística p de los siguientes tests: 1sKH (test de Kishino-Hasegawa de una cola), SH (test de Shimodaira-Hasegawa), ELW (Expected Likelihood Weight), 2sKH – (test de Kishino-Hasegawa de dos colas). El símbolo + indica el no rechazo de la topología testada como significativamente peor que la escogida dentro del nivel de significancia del 5%.



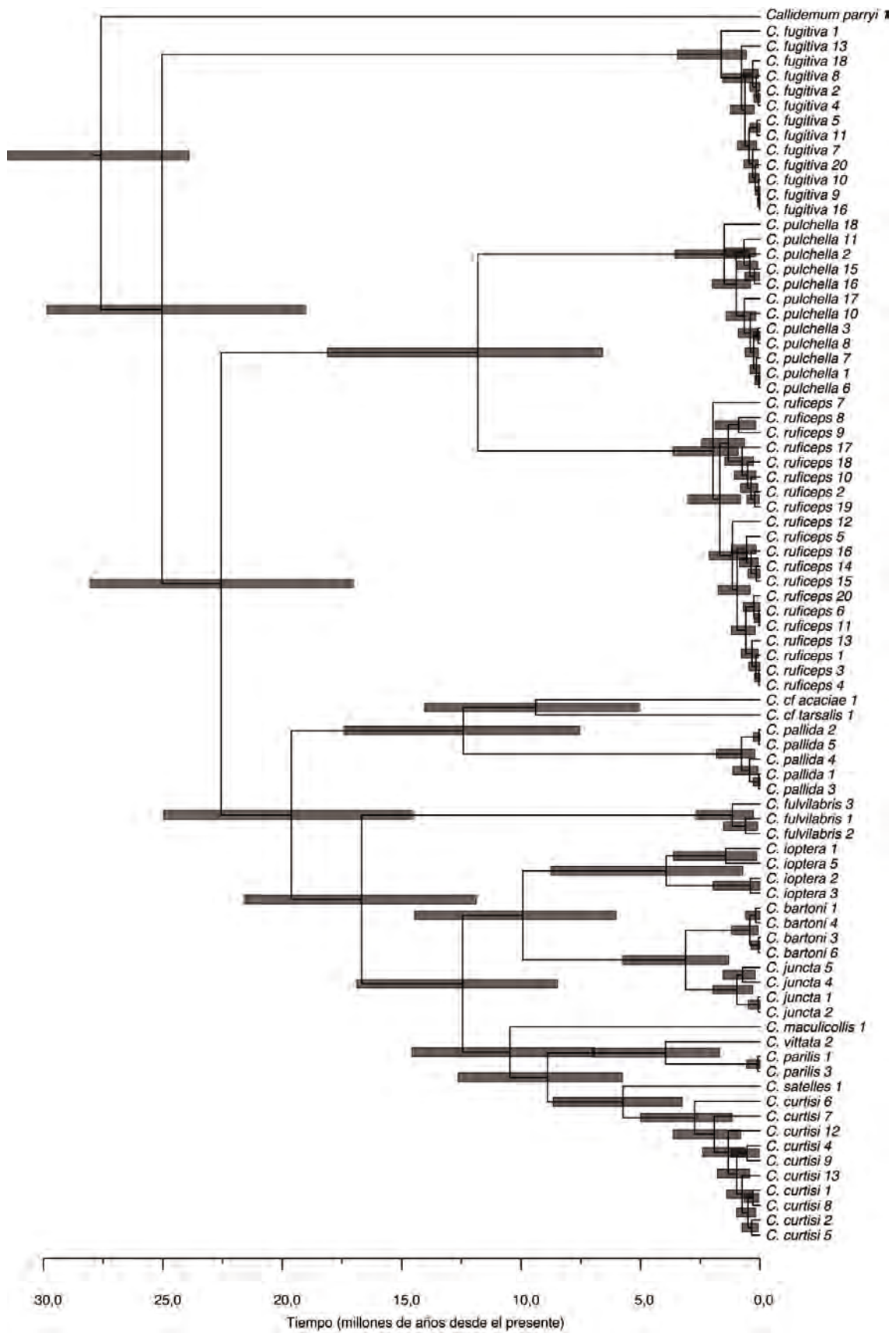
**Figura 4.2-40.** Cladograma consenso entre los análisis de marcadores combinados bayesianos y de máxima verosimilitud mostrando la filogenia de las especies de *Calomela*. Las cifras junto a cada nodo indican los valores de probabilidad posterior (sobre las ramas) y de bootstrap (bajo las ramas) siempre que estos sean iguales o superiores a 0.95 y 70, respectivamente. Las letras que identifican a cada uno de los nodos sirven como referencia en el texto principal.

4.2.4.7.- *Reloj molecular y tiempos de divergencia*

El cronograma resultante del análisis con BEAST con los correspondientes intervalos al 95% de confianza en la estima de las edades de los nodos se muestra en la figura 4.2-41. Las edades estimadas para cada uno de los nodos interespecíficos y sus intervalos de confianza se resumen en la tabla 4.2-14. La diversificación inicial en *Calomela* está definida por la separación entre *C. fugitiva* y el resto de especies estudiadas durante el final del Oligoceno hace unos 25 Ma (HPD95% = 29,8-19,0 Ma). En ese mismo periodo se produjo la separación entre el grupo de *C. pulchella* - *C. ruficeps* y el resto de especies, hace unos 22,6 Ma (intervalo de confianza: 28,0 – 17,0 Ma). Hacia el Mioceno superior se produjo una acumulación importante de eventos cladogenéticos para nuestro muestreo que daría lugar a la mayor parte de la diversidad actual de *Calomela*, hace entre 12,5 y 8,9 Ma. El proceso de especiación más reciente en el cronograma se correspondió con la separación entre *C. bartoni* y *C. juncta* en un periodo entre el Plioceno y el Pleistoceno, datado hace 3,1 Ma (HPD95% = 5,8 – 1,3 Ma). Las dataciones para cada uno de los clados de especies con más de un individuo muestreado y sus respectivos intervalos de confianza fueron: *C. bartoni*, 0,43 Ma (1,18 – 0,07 Ma); *C. curtisi*, 2,74 Ma (5,00 – 1,17); *C. fugitiva*, 1,63 Ma (3,45 – 0,56); *C. fulvilabris*, 1,16 Ma (2,67 – 0,28); *C. ioptera*, 3,93 Ma (8,76 – 0,72); *C. juncta*, 0,97 Ma (1,97 – 0,31); *C. pallida*, 0,77 Ma (1,83 – 0,22); *C. parilis*, 0,09 Ma (0 – 0,57); *C. pulchella*, 1,50 Ma (3,56 – 0,46); y *C. ruficeps*, 1,97 Ma (3,64 – 0,92).

El valor medio de las tasas de sustitución mitocondrial (*cox1*) por rama y millón de años fue de 0,027033, lo que sería equivalente a una divergencia media entre linajes de 5,4% por millón de años, y el valor del estadístico *ucl.d.stdev* fue de 1,1212. En el caso de la partición nuclear (CAD, ITS2 y LSU) el valor promedio de las tasas de sustitución fue de 0,0013861, lo que supone una divergencia media entre linajes de 2,77% por millón de años, y el valor *ucl.d.stdev* en este caso fue de 0,6593. El uso de un reloj molecular no correlacionado relajado, permitió además comparar el ajuste de cada una de las particiones a un reloj estricto (Drummond *et al.*, 2006), deduciéndose que tanto la partición mitocondrial como la nuclear evolucionarían bajo un modelo de reloj molecular relajado, a tenor del notable alejamiento respecto del valor cero de los respectivos estadísticos *ucl.d.stdev*.





**Figura 4.2-41.** Árbol datado derivado del análisis filogenético bayesiano con la aplicación de un reloj molecular relajado. El intervalo del 95% de confianza de la edad de los nodos se indica mediante las barras de error de color gris.

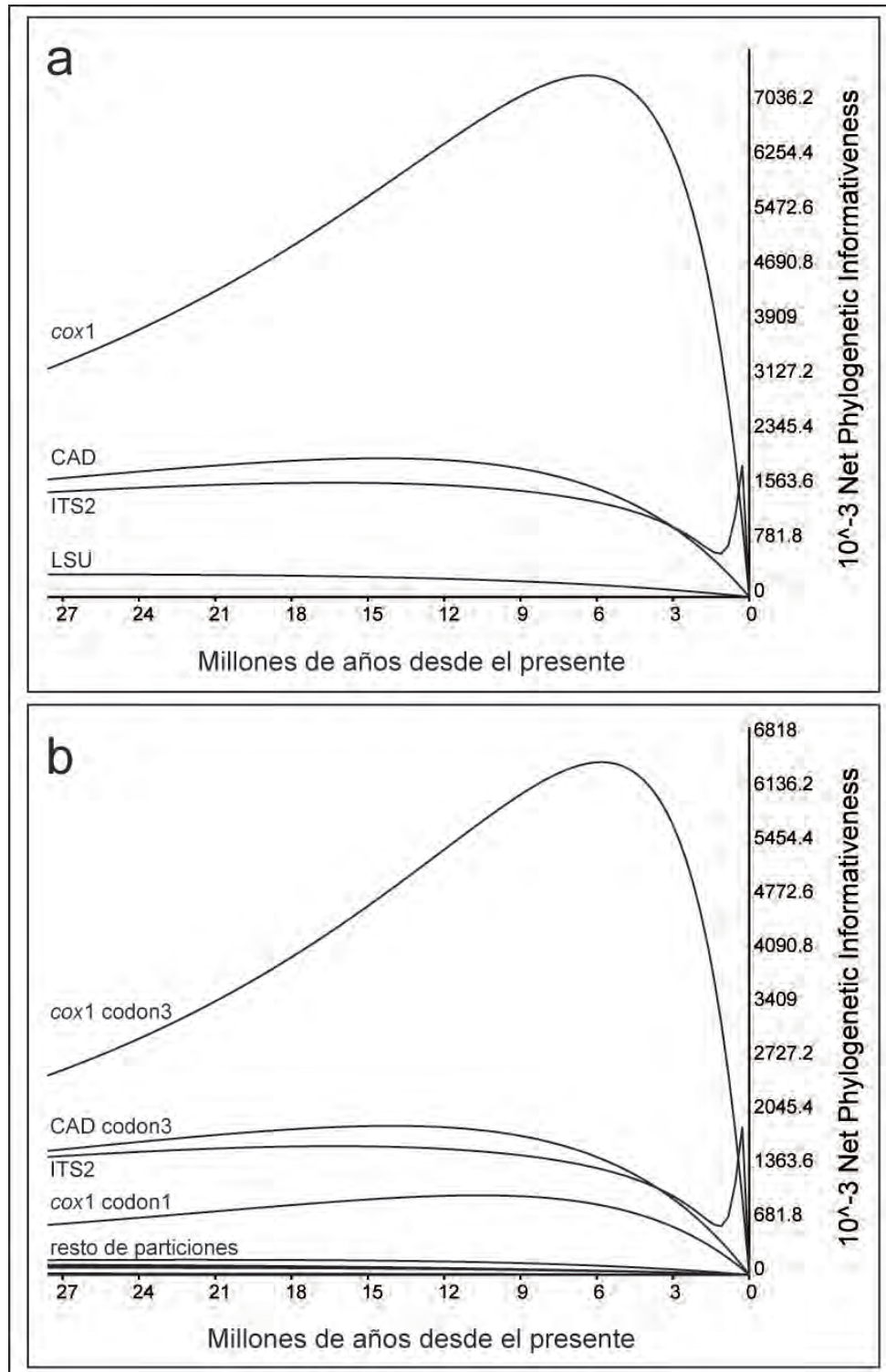
Nodo	<i>cox1</i> , CAD, ITS2, LSU D1-D3	<i>cox1</i> , <i>rrnL</i> , LSU D3-D6, <i>ef1a</i> , CAD
A	25.04 [28.85 – 19.03]	22.1 [26.99 – 17.57]
B	22.56 [28.04 – 17.03]	n.a.
C	11.81 [18.11 – 6.6]	14.89 [21.69 – 8.80]
D	19.62 [24.97 – 14.54]	18.00 [25.44 – 16.44]
E	12.42 [17.41 – 7.55]	12.89 [17.34 – 8.72]
F	9.39 [14.05 – 5.05]	n.a.
G	16.69 [21.59 – 11.88]	16.25 [20.48 – 12.45]
H	12.45 [16.88 – 8.48]	12.61 [16.39 – 9.27]
I	9.94 [14.46 – 6.04]	7.94 [11.35 – 4.97]
J	3.11 [5.75 – 1.32]	1.93 [3.60 – 0.77]
K	10.47 [14.57 – 6.93]	n.a.
L	8.9 [12.64 – 5.77]	n.a.
M	3.95 [7.02 – 1.69]	n.a.
N	5.74 [8.67 – 3.26]	6.37 [9.56 – 3.59]

**Tabla 4.2-14.** Edades medias en millones de años desde el presente e intervalos de confianza al 95% obtenidas para *Calomela* en los análisis con BEAST a partir de dos conjuntos diferentes de marcadores moleculares. Las letras identificativas de cada nodo se refieren a las utilizadas en la figura 4.2-40.

#### 4.2.4.8.- Distribución de la señal filogenética de los marcadores moleculares

Los resultados del análisis para cuantificar la señal filogenética de cada uno de los cuatro marcadores moleculares utilizados en nuestro estudio se resumen en la figura 4.2-42-a. En todos los casos el valor de información filogenética se incrementó desde el reciente hasta alcanzar un valor máximo, a partir del cual comenzó a decrecer de nuevo hacia la raíz, lo que podría asociarse a la ausencia de caracteres soportando las ramificaciones profundas en el árbol. La mayor intensidad de señal filogenética correspondió al marcador *cox1*, cuyo valor máximo se recuperó hace 6,3 Ma. Por su parte CAD e ITS2 mostraron niveles de intensidad de señal muy parecidos entre sí, con máximos respectivos en los instantes situados hace 14,3 Ma y 16,3 Ma, aunque en ambos casos ésta fue sensiblemente inferior a la calculada para *cox1*. El pico cercano al momento cero que se aprecia en la curva de ITS2 es un artefacto matemático inherente al método y que puede estar relacionado con la presencia de regiones de inserción-delección en las secuencias (<http://phydesign.townsend.yale.edu/faq.html>), lo que significa que la señal filogenética de ITS2 no sufre un incremento real en ese espacio temporal. La partición LSU mostró niveles de señal muy reducidos a lo largo de toda la filogenia. En el análisis basado en diez particiones, las terceras posiciones de codón de *cox1* fueron las que contribuyeron mayor intensidad de señal filogenética, con un valor máximo hace 5,8 Ma (Figura 4.2-42-b). Las terceras posiciones de codón del fragmento CAD y la

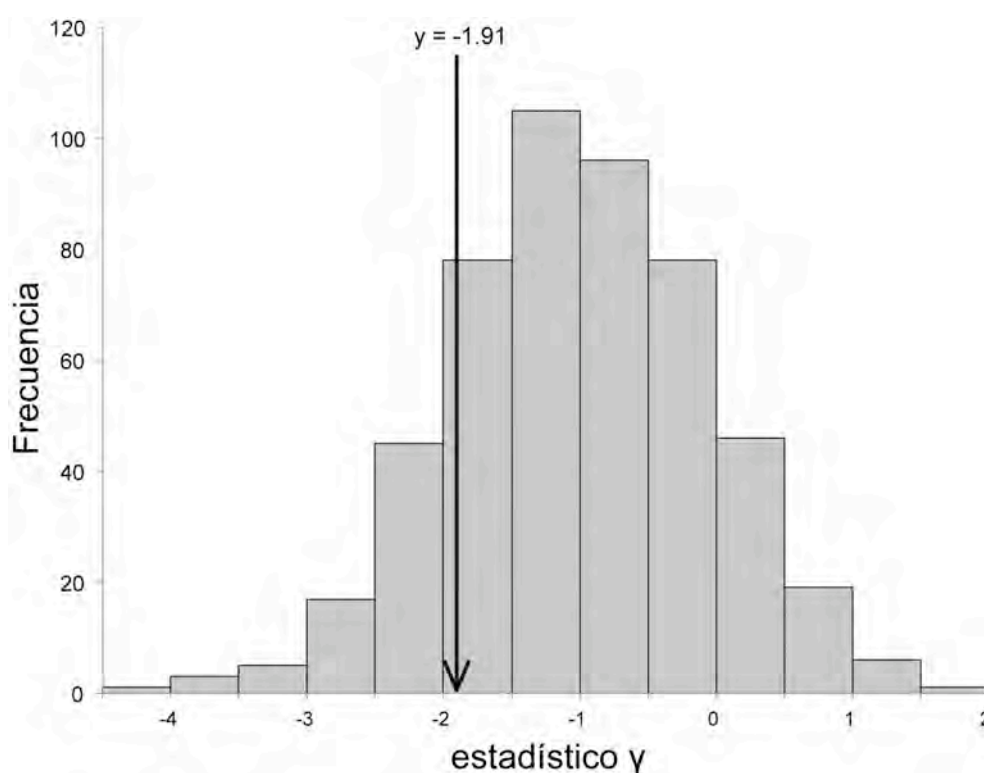
partición ITS2 exhibieron un nivel de señal similar, aunque inferior al de las terceras posiciones de codón de *cox1*, seguidas en intensidad de señal por las primeras posiciones de codón de *cox1*. El resto de particiones apenas mostraron señal filogenética.



**Figura 4.2-42.** Perfiles de señal filogenética obtenidos en PhyDesign a partir del cronograma generado por BEAST para (a) cada uno de los cuatro marcadores analizados y (b) las diez particiones que constituyen el esquema óptimo de partición de los datos.

4.2.4.9.- Tasas de diversificación en *Calomela*

El valor del estadístico  $\gamma$  obtenido en la prueba de tasas constantes de Pybus y Harvey (2000) fue -1,91, sugiriendo, aunque de modo sólo marginalmente significativo ( $P = 0,056$ ), la existencia de una tasa de diversificación no constante en *Calomela* y marcada por una acumulación temprana en la formación de linajes. El test MCCR para evaluar el efecto del muestreo incompleto de especies generó una distribución nula de  $\gamma$  con un valor crítico igual a -2,53 (Figura 4.2-43), no encontrando por tanto evidencias a favor de una aceleración temprana en la diversificación de *Calomela* ( $P = 0,16$ ).



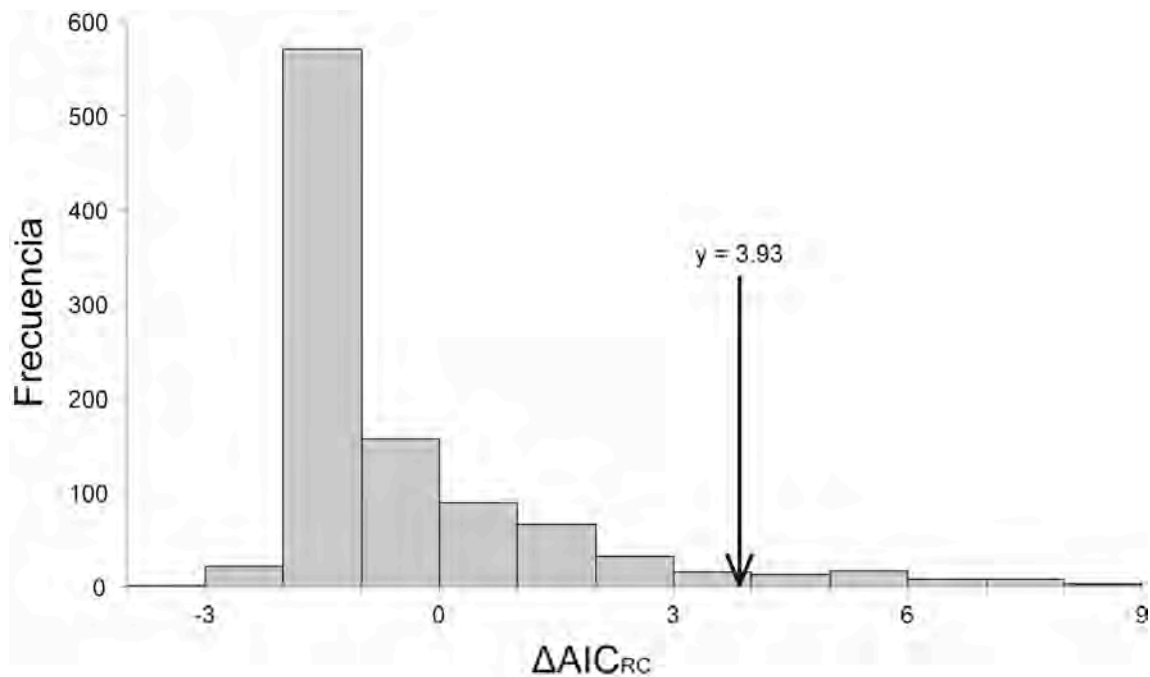
**Figura 4.2-43.** Resultado del test de Monte Carlo de tasas constantes. El histograma muestra la distribución nula del estadístico  $\gamma$  basada en 500 simulaciones de árboles incompletamente muestreados. El valor  $\gamma = -1.91$  obtenido para la filogenia de *Calomela* no es significativamente inferior al valor crítico  $\gamma = -2.53$  ( $P = 0.16$ ) no encontrando por tanto evidencias a favor de una aceleración temprana en la diversificación de *Calomela*.

El análisis del ajuste de los cinco modelos de diversificación considerados sobre el cronograma de las especies de *Calomela* resultó en la elección del modelo logístico dependiente de densidad como la mejor explicación al patrón empírico observado ( $\Delta AIC_{RC} = 3,938363$ ; Tabla 4.2-15). Sobre quince especies de *Calomela*, el valor de  $K$ , el parámetro logístico que determina la capacidad de carga en el modelo, fue 16,80919, lo que indica un estado actual muy próximo a la fase asintótica del mismo.

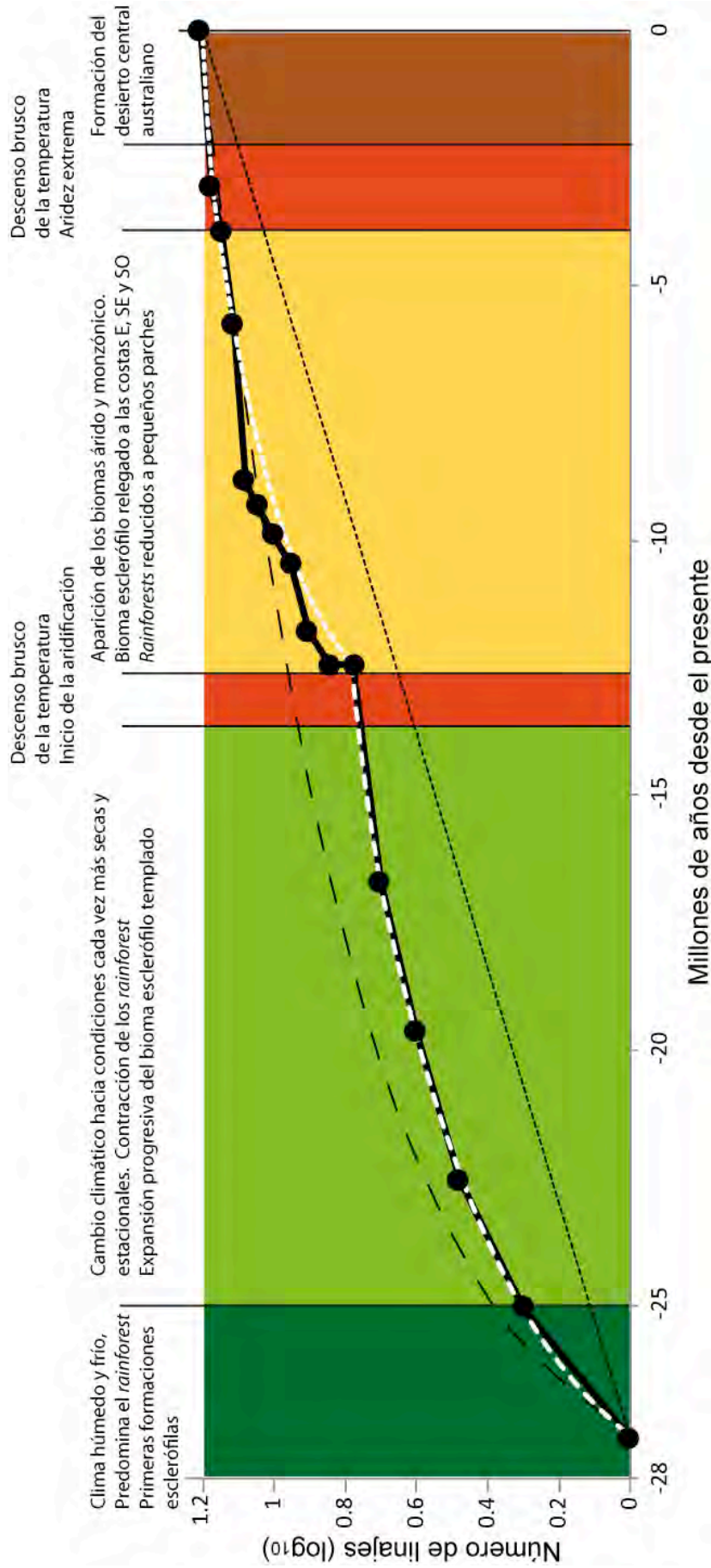
Modelo	np	Clase	Tasa(s)	log Verosim.	AIC	$\Delta$ AIC
nacimiento puro	1	TC	0.06160	-25.11985	52.23970	3.93836
nacimiento-muerte	2	TC	0.06160	-25.11985	54.23970	5.93836
<b>logístico densodependiente</b>	<b>2</b>	<b>TV</b>	<b>0.18024</b>	<b>-22.15067</b>	<b>48.30133</b>	<b>0</b>
exponencial densodependiente	2	TV	0.34576	-23.38255	50.76510	2.46377
Yule de dos tasas	3	TV	0.11131/0.02336	-21.52160	49.04320	0.74186
Yule de tres tasas	5	TV	0.07765/0.17425/0.02336	-20.63275	51.26551	2.96417
nacimiento puro	1	TC	0.07003	-11.714688	25.4293764	0.53368362
nacimiento-muerte	2	TC	0.07003	-11.714688	27.4293764	2.53368362
<b>logístico densodependiente</b>	<b>2</b>	<b>TV</b>	<b>0.27163</b>	<b>-10.447846</b>	<b>24.8956928</b>	<b>0</b>
exponencial densodependiente	2	TV	0.68401	-10.715173	25.4303451	0.5346523
Yule de dos tasas	3	TV	0.12349/0.04246	-11.01383	28.0276594	3.13196664
Yule de tres tasas	5	TV	0.15946/0.0756/0.03085	-10.734674	31.4693484	6.57365566
nacimiento puro	1	TC	0.08944	-15.62327	33.2465407	11.7905905
nacimiento-muerte	2	TC	0.08944	-15.62327	35.2465407	13.7905905
<b>logístico densodependiente</b>	<b>2</b>	<b>TV</b>	<b>0.66237</b>	<b>-8.7279751</b>	<b>21.4559502</b>	<b>0</b>
exponencial densodependiente	2	TV	21.11018	-8.8847221	21.7694442	0.31349401
Yule de dos tasas	3	TV	0.36011/0.03572	-10.018954	26.0379087	4.58195856
Yule de tres tasas	5	TV	16.77458/0.30117/0.03572	-7.0714395	24.1428791	2.6869289

**Tabla 4.2-15.** Resultados del ajuste de seis modelos de diversificación a la historia evolutiva de *Calomela* (filas superiores) y a dos tramos contiguos separados en el momento -12.4497 m.a. (filas centrales e inferiores). En negrita se muestran los resultados seleccionados en cada uno de los tres casos. Abreviaturas: np = número de parámetros considerados por el modelo; TC = tasa constante; TV = tasa variable.

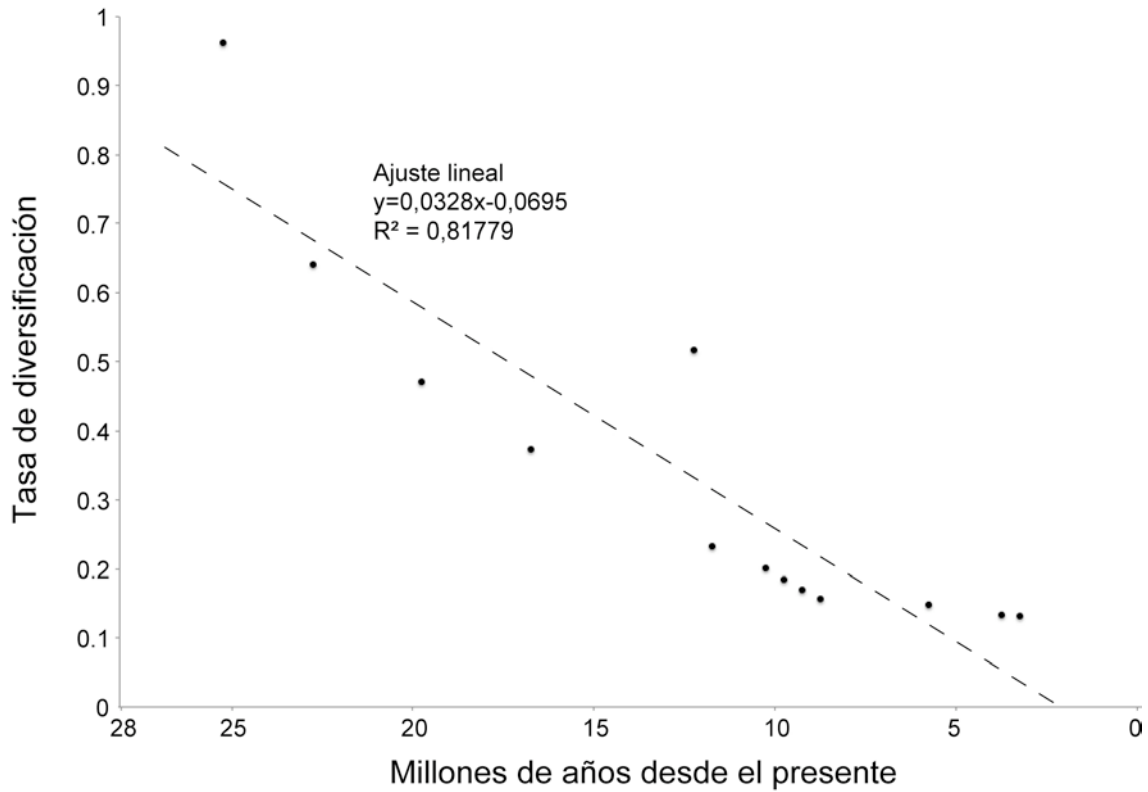
La distribución nula de los valores de  $\Delta AIC_{RC}$  basados en las simulaciones corroboró estadísticamente la existencia de variación en la tasa neta de diversificación en el tiempo ( $P = 0,047$ ) (Figura 4.2-44), y de hecho la gráfica LTT reveló la existencia de dos tramos con tasas de diversificación diferenciadas y correspondientes a los periodos anterior y posterior al momento -12,45 Ma (Figura 4.2-45). El ajuste de los cinco modelos de diversificación a cada uno de estos tramos resultó en la elección del modelo logístico dependiente de la densidad en los dos casos. Para el tramo más antiguo:  $\Delta AIC_{RC} = 0,53368$ , constante  $K = 6,69$  y tasa inicial  $r_1 = 0,27$ ; y para el tramo más reciente:  $\Delta AIC_{RC} = 11,79059$ ,  $K = 10,24$  y  $r_1 = 0,66$  (Tabla 4.2-15). La tasa de diversificación no constante y con tendencia decreciente también se puso de manifiesto en la gráfica RTT, donde además se pudo apreciar un repentino incremento de la tasa en el intervalo de tiempo comprendido entre hace 12,5 y 12 Ma (Figura 4.2-46).



**Figura 4.2-44.** Distribución nula de los valores de  $\Delta AIC_{RC}$  basada en 1000 simulaciones de topologías obtenidas al azar y podadas hasta contener el mismo número de especies que la muestra original. El valor de  $\Delta AIC_{RC}$  de 3.93 obtenido para *Calomela* es significativamente distinto de una distribución al azar ( $P = 0.047$ ), lo que corrobora la existencia de una variación temporal en la tasa de diversificación.



**Figura 4.2-45.** Gráfica de linajes a través del tiempo en *Calomela*. Los puntos negros indican el número logarítmico de especies en el tiempo. La curva discontinua de trazo negro se corresponde con el modelo logístico dependiente de la densidad. Las líneas discontinuas de color blanco representan los valores según el mismo modelo para cada uno de los dos tramos contiguos en los que se ha subdividido la historia evolutiva de *Calomela*. La recta de trazo discontinuo se corresponde con la predicción del modelo de nacimiento puro. Se indican los principales periodos climáticos y sus formaciones vegetales asociadas.



**Figura 4.2-46.** Representación gráfica de las tasas netas de diversificación a través del tiempo en *Calomela* estimadas en ventanas de medio millón de años. Se muestra la recta de regresión lineal (pendiente = 0.0328).

Finalmente, las pruebas del ajuste a los modelos de Rabosky y Lovette (2008b), que consideran tasas variables de especiación y/o de extinción, resultaron en la selección del modelo SPVAR, tanto para la historia evolutiva completa de *Calomela* como para cada uno de los dos tramos en los que se subdividió el cronograma (Tabla 4.2-16).

		Modelo	log Verosim.	AIC	$\Delta$ AIC
Rango temporal (m.a.)	Completo	<b>SPVAR</b>	<b>-23.87934</b>	<b>53.75867</b>	<b>0</b>
		EXVAR	-25.1449	56.2898	2.531128
		BOTHVAR	-23.87253	55.74505	1.986381
	Raíz- 12.45	<b>SPVAR</b>	<b>-12.57591</b>	<b>31.15182</b>	<b>0</b>
		EXVAR	-15.50351	37.00702	5.855203
		BOTHVAR	-12.57464	33.14929	1.997467
	12.45-0	<b>SPVAR</b>	<b>-11.27836</b>	<b>28.55672</b>	<b>0</b>
		EXVAR	-14.40784	34.81569	6.258971
		BOTHVAR	-11.27978	30.55957	2.002849

**Tabla 4.2-16.** Ajuste de tres modelos de diversificación (Rabosky y Lovette, 2008b) para detectar la tendencia de las tasas de especiación y de extinción.



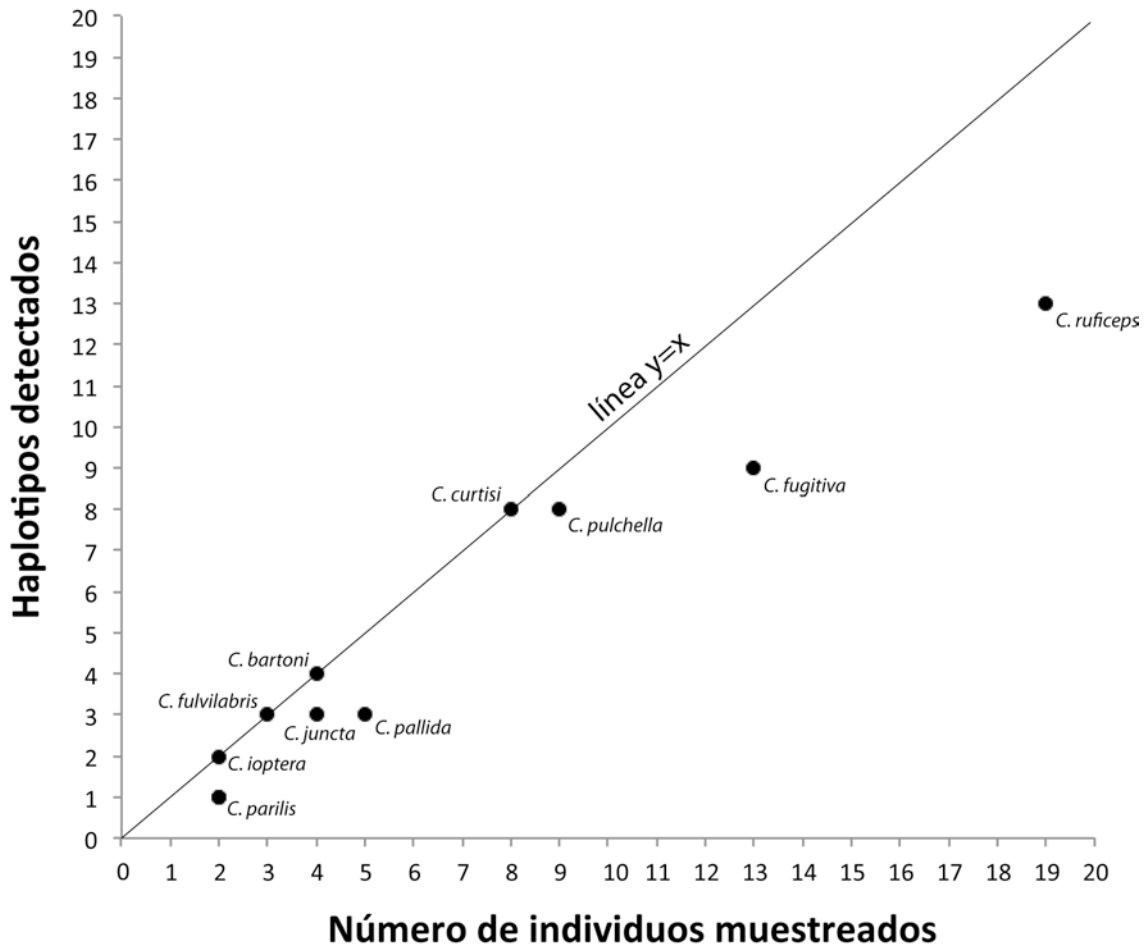
4.2.4.10.- *Diversidad genética en poblaciones de Calomela*

En total se analizaron 42 poblaciones pertenecientes a quince especies de *Calomela*. La tabla 4.2-17 muestra los índices de diversidad genética poblacional basados en las secuencias *cox1*. El número de haplotipos por especie, excluyendo las cinco especies representadas en el muestreo por un solo individuo (*i.e.*, *C. aff. acaciae*, *C. maculicollis*, *C. aff. tarsalis*, *C. satelles* y *C. vittata*), estuvo comprendido entre uno en *C. parilis* y 13 en las poblaciones de *C. ruficeps*. La diversidad haplotípica en las especies se situó en valores muy cercanos al máximo posible, y en los casos de *C. bartoni*, *C. curtisi* y *C. fulvilabris* se detectaron tantos haplotipos como individuos muestreados (Figura 4.2-46). En varias especies hubo haplotipos compartidos por distintas poblaciones. Fue el caso de los haplotipos H1, H3 y H5 de *C. fugitiva* presentes respectivamente en los pares de localidades relativamente cercanas de New England National Park con Armidale (77 km), Killungoondie (36 km) y Norman Jolly Forest Reserve (43 km). Lo mismo ocurrió con los haplotipos H1 de *C. pallida* y H4 de *C. ruficeps*, que coexisten respectivamente en los pares de poblaciones Armidale / Oxley Wild Rivers National Park (63 km) y Cumberland State Forest / Illawarra State Recreation Area (75 km). Algunos haplotipos compartidos pertenecieron a poblaciones separadas por distancias superiores, como sucedió con el haplotipo H1 de *C. parilis* en las poblaciones Vineyard y Warkworth (120 km) y el haplotipo H1 de *C. juncta* en las poblaciones de Black Mountain y Royal National Park (221 km). La diversidad haplotípica en las poblaciones con más de un individuo muestreado fue máxima ( $h = 1$ ) en nueve casos, destacando la muestra de *C. curtisi* procedente de Vineyard, donde para cada uno de los cuatro individuos se recuperó un haplotipo distinto. En el otro extremo se situaría el conjunto de ejemplares de *C. ruficeps* procedentes de Cumberland State Forest, compuesto por tres especímenes todos ellos con idénticos haplotipos ( $h = 0$ ). El resto de poblaciones mantuvieron un nivel moderadamente alto de diversidad haplotípica, con valores comprendidos entre 0,5 y 0,83. La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ; Nei y Li, 1979) fue baja en la mayoría de las poblaciones ( $\pi < 0,015$ ).

El test de neutralidad  $R_2$  de Ramos-Onsins y Rozas (2002) devolvió resultados no significativos en todos los casos excepto en las poblaciones de Vineyard de *C. curtisi* ( $R_2 = 0,272$ ,  $P < 0,01$ ) y de Barrington Tops de *C. ruficeps* ( $R_2 = 0,343$ ,  $P < 0,05$ ).

Especie	Localidad	Nº de individuos	Nº de haplotipos	Diversidad haplotípica ± DE	Diversidad nucleotídica x10 ± DE
<i>C. cf. acaciae</i>	Coolgardie	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
<i>C. bartoni</i>	Bulls Head	4	H1 (1) H2 (2) H3 (1)	0.833 ± 0.222	0.028 ± 0.008
<i>C. curtisi</i>	Dharawal Nature Reserve	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
	Mount Towac	1	H2 (1)	n.c.	n.c.
	Oxley Wild Rivers National Park	2	H3 (1) H4 (1)	1.000 ± 0.500	0.112 ± 0.123
	Vineyard	4	H5 (1) H6 (1) H7 (1) H8 (1)	1.000 ± 0.177	0.090 ± 0.065
<i>C. fugitiva</i>	Armidale	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
	Cascade	1	H2 (1)	n.c.	n.c.
	Killungoondie	1	H3 (1)	n.c.	n.c.
	Mount Warning	1	H4 (1)	n.c.	n.c.
	New England National Park	4	H1 (1) H3 (2) H5 (1)	0.833 ± 0.222	0.032 ± 0.009
	Norman Jolly Forest Reserve	3	H5 (1) H6 (1) H7 (1)	1.000 ± 0.272	0.055 ± 0.048
	Wingham Brush Nature Reserve	1	H8 (1)	n.c.	n.c.
	Woko National Park	1	H9 (1)	n.c.	n.c.
<i>C. fulvibris</i>	Jerry's Plains	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
	Leeton	2	H2 (1) H3 (1)	1.000 ± 0.500	0.149 ± 0.074
<i>C. ioptera</i>	Illawarra	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
	Oxley Wild Rivers National Park	1	H2 (1)	n.c.	n.c.
<i>C. juncta</i>	Black Mountain	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
	Blue Mountains	1	H2 (1)	n.c.	n.c.
	Royal National Park	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
	Mount Canobolas	1	H3 (1)	n.c.	n.c.
	Bulls Head	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
<i>C. maculicollis</i>	Bulls Head	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
	Armidale	3	H1 (1) H2 (2)	0.667 ± 0.314	0.087 ± 0.071
<i>C. pallida</i>	Oxley Wild Rivers National Park	2	H (1) H3 (1)	1.000 ± 0.500	0.120 ± 0.130
	Vineyard	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
<i>C. parviflora</i>	Vineyard	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
	Warkworth	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
<i>C. pulchella</i>	Cumberland State Forest	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
	Girard State Forest	1	H2 (1)	n.c.	n.c.
	Guy Fawkes River National Park	2	H3 (1) H4 (1)	1.000 ± 0.500	0.040 ± 0.047
	Vineyard	2	H5 (1) H6 (1)	1.000 ± 0.500	0.044 ± 0.051
	Windsor	3	H7 (2) H8 (1)	0.667 ± 0.314	0.010 ± 0.013
	Barrington Tops	3	H1 (1) H2 (1) H3 (1)	1.000 ± 0.272	0.077 ± 0.021
	Cumberland State Forest	3	H4 (3)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
<i>C. ruficeps</i>	Illawarra State Recreation Area	4	H5 (1) H6 (3)	0.500 ± 0.265	0.030 ± 0.016
	Long Point	3	H7 (1) H8 (1) H9 (1)	1.000 ± 0.272	0.076 ± 0.027
	Norman Jolly Forest Reserve	1	H10 (1)	n.c.	n.c.
	Sandy Hill	1	H11 (1)	n.c.	n.c.
	Stanwell Park	4	H12 (1) H13 (3)	0.500 ± 0.265	0.011 ± 0.006
<i>C. cf. tarsalis</i>	Coolgardie	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
<i>C. satelles</i>	Kalgoorlie	1	H1 (1)	n.c.	n.c.
<i>C. vittata</i>	Bulls Head	1	H1 (1)	n.c.	n.c.

**Tabla 4.2-17.** Número de especímenes de cada una de las especies de *Calomela* por localidad de colecta, haplotipos mitocondriales *cox1* y diversidades tanto haplotípica como nucleotídica con sus respectivas desviaciones estándar.



**Figura 4.2-46.** Relación entre el número de ejemplares muestreados por especie de *Calomela* y el número de haplotipos detectados.

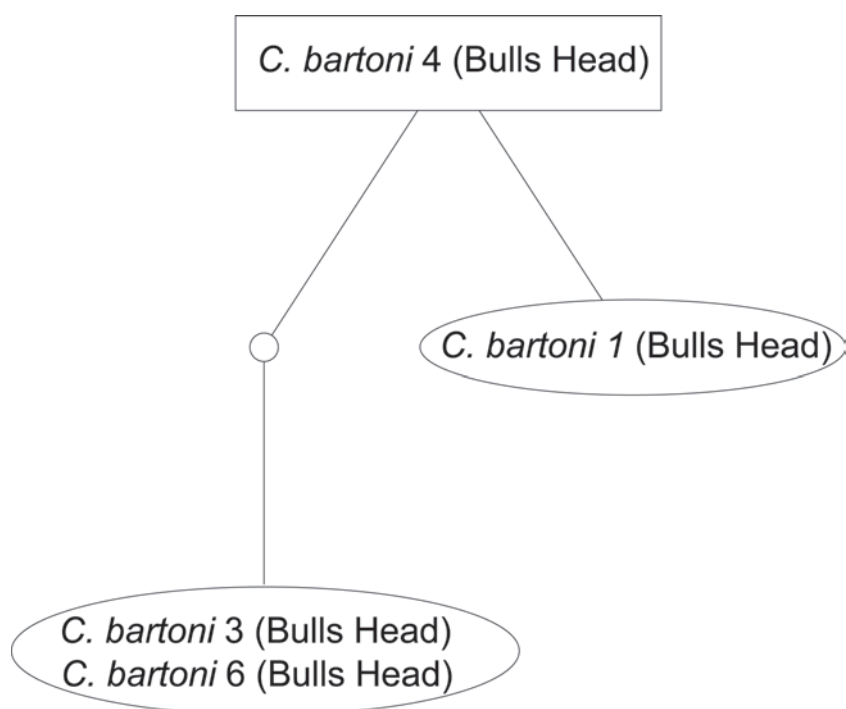
El test de Mantel (tabla 4.2-18) sugirió la existencia de aislamiento genético por distancia geográfica para las poblaciones de *C. pulchella* ( $r = 0,954470$ ;  $P < 0,01$ ), *C. fugitiva* ( $r = 0,783861$ ;  $P < 0,01$ ) y *C. ruficeps* ( $r = 0,924542$ ;  $P < 0,001$ ). En concordancia, los índices  $F_{ST}$  en estas mismas poblaciones fueron generalmente altos ( $F_{ST} = 0,54 - 0,92$ ), exceptuando los valores obtenidos entre poblaciones vecinas [viz., *C. pulchella* Vineyard vs. *C. pulchella* Windsor ( $F_{ST} = 0$ ; distancia geográfica = 3 km), *C. fugitiva* New England National Park vs. *C. fugitiva* Norman Jolly Forest Reserve ( $F_{ST} = 0,19$ ; distancia geográfica = 43 km), o *C. ruficeps* Illawarra vs. *C. ruficeps* Stanwell Park ( $F_{ST} = 0$ ; distancia geográfica = 23 km)].

Las redes de haplotipos *cox1* obtenidas mediante parsimonia estadística para las especies de *Calomela* con más de un individuo estudiado se muestran en las figuras 4.2-47 a 4.2-55. En todos los diagramas se obtuvieron nodos vacíos correspondientes a haplotipos no recuperados en nuestro muestreo. Las especies *C. fugitiva* y *C. ruficeps* mostraron haplotipos separados del resto por un elevado número

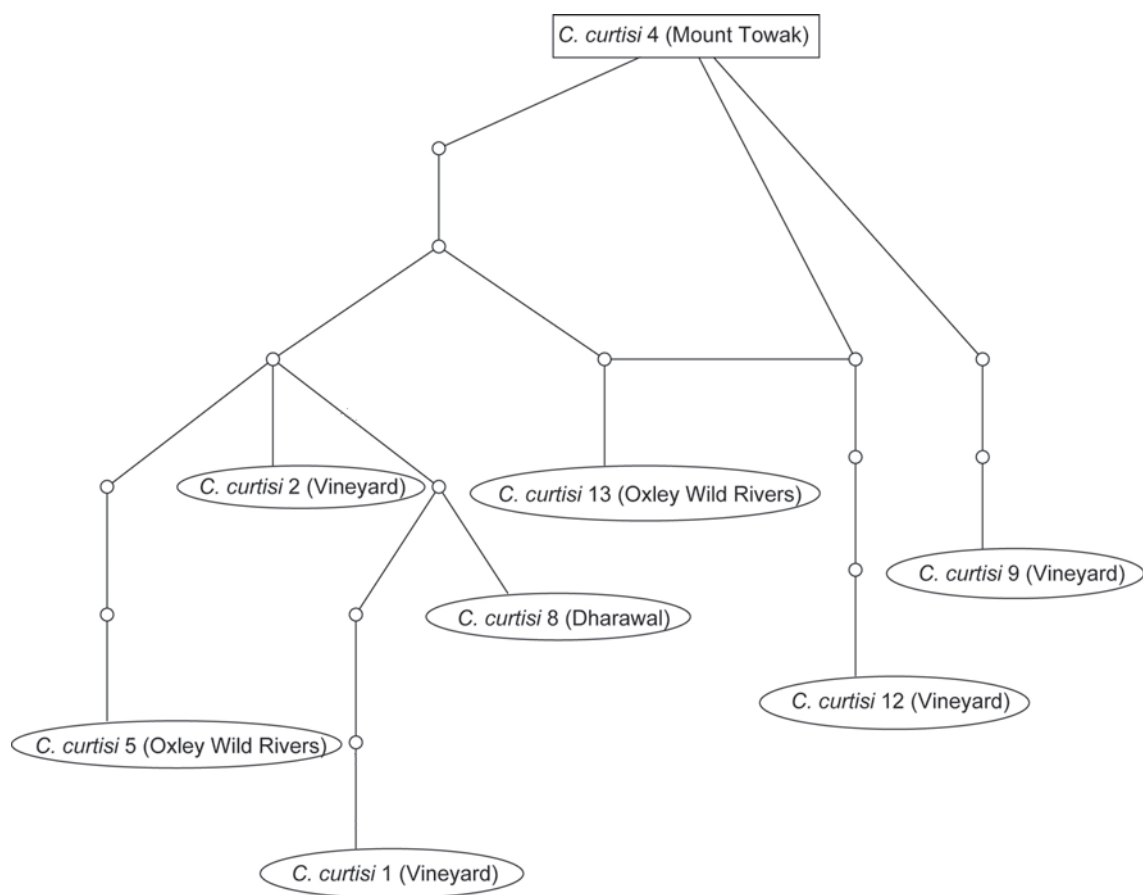
de pasos mutacionales (20 y 18, respectivamente), lo que concuerda con los resultados anteriores.

	Correlación (r)	Significación estadística (p)
<i>C. curtisi</i>	0.003689	0.6734
<i>C. fugitiva</i>	0.783861	0.0047*
<i>C. juncta</i>	-0.713123	0.6618
<i>C. pulchella</i>	0.954470	0.008333*
<i>C. ruficeps</i>	0.924542	0.000595*

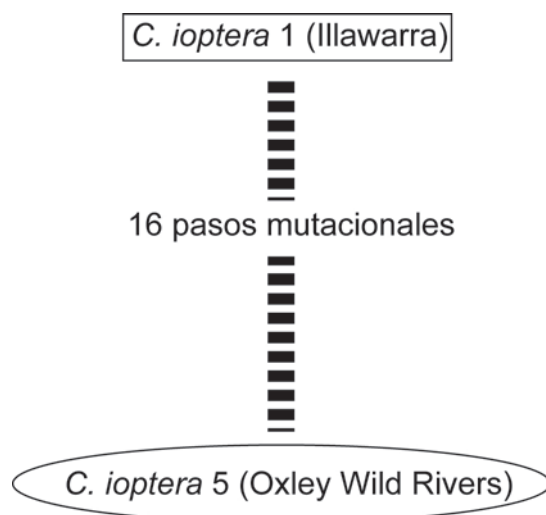
**Tabla 4.2-18.** Resultados del test de Mantel para testar la existencia de aislamiento genético por distancia geográfica en las especies con tres o más ejemplares muestreados. Los valores estadísticamente significativos se indican con un asterisco.



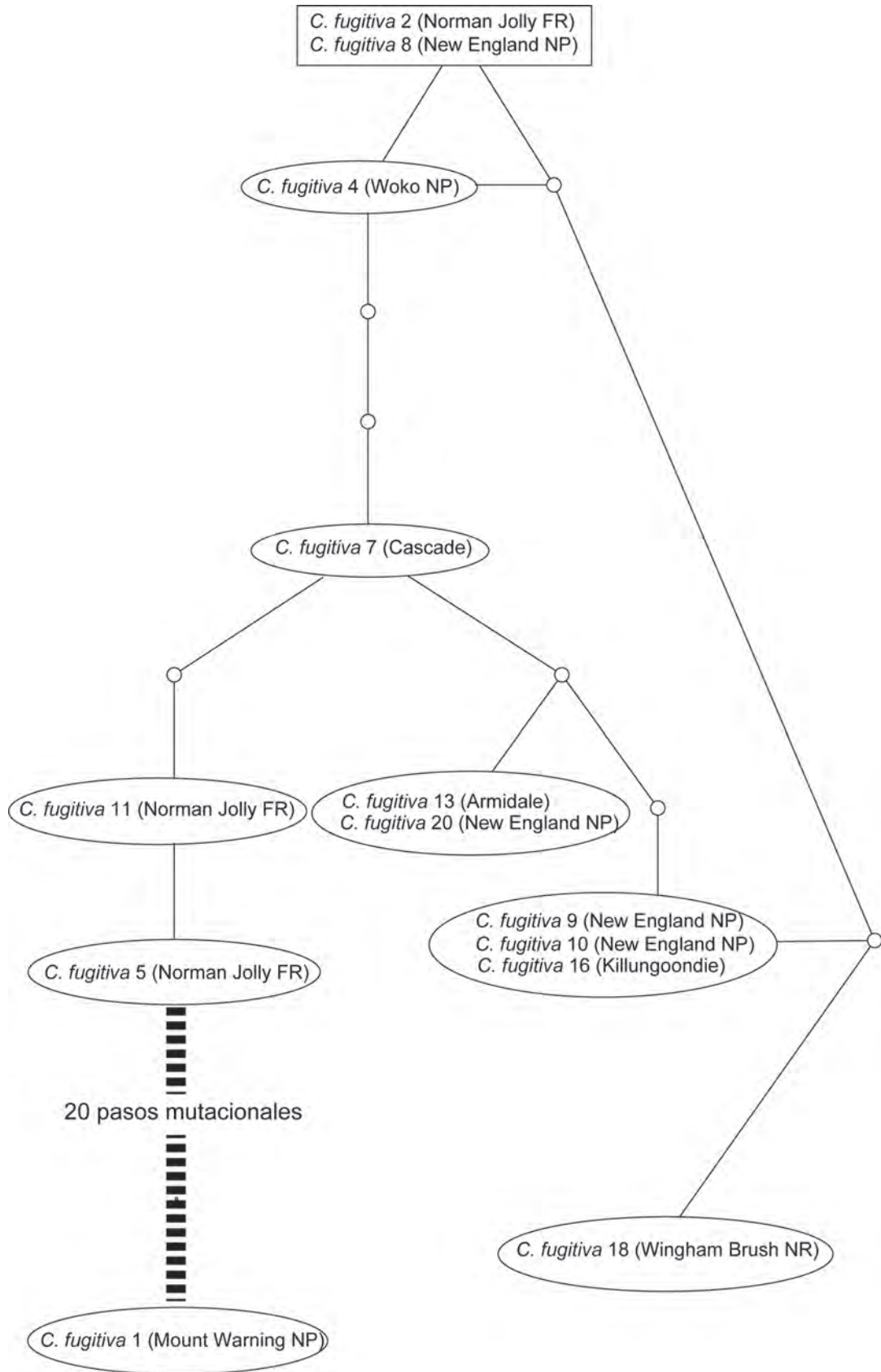
**Figura 4.2-47.** Red de haplotipos TCS obtenida a partir de las secuencias *cox1* para los individuos de *Calomela bartoni*. El recuadro indica el individuo con mayor probabilidad de poseer el haplotipo ancestral.



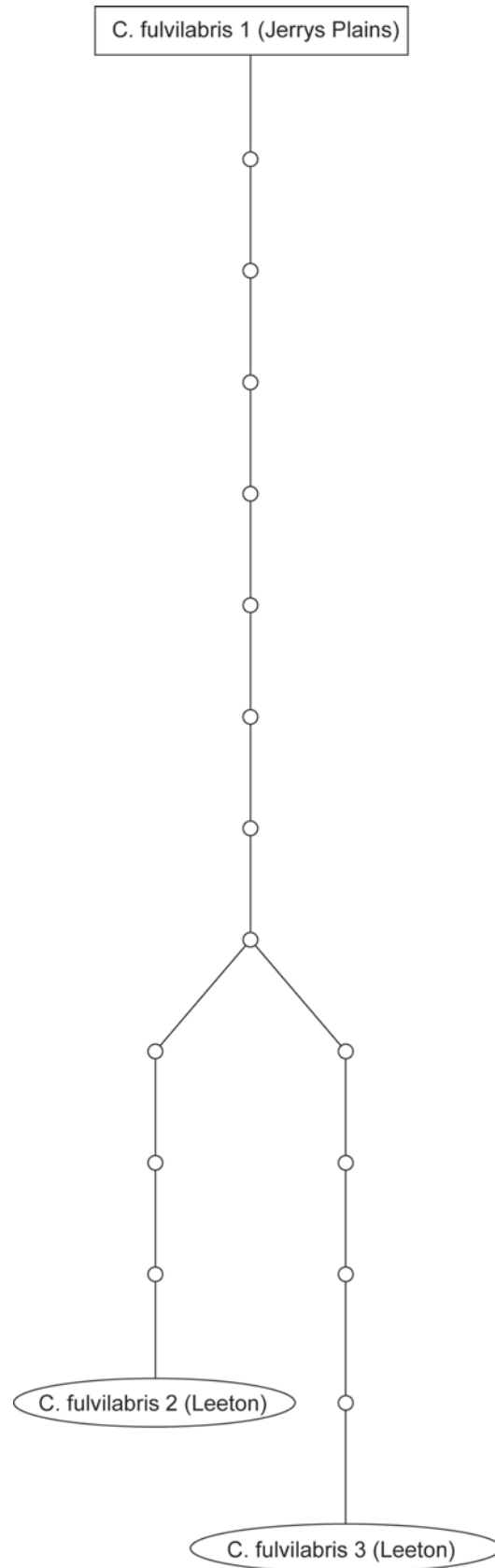
**Figura 4.2-48.** Red de haplotipos TCS obtenida a partir de las secuencias *cox1* para los individuos de *Calomela curtisi*. El recuadro indica el individuo con mayor probabilidad de poseer el haplotipo ancestral.



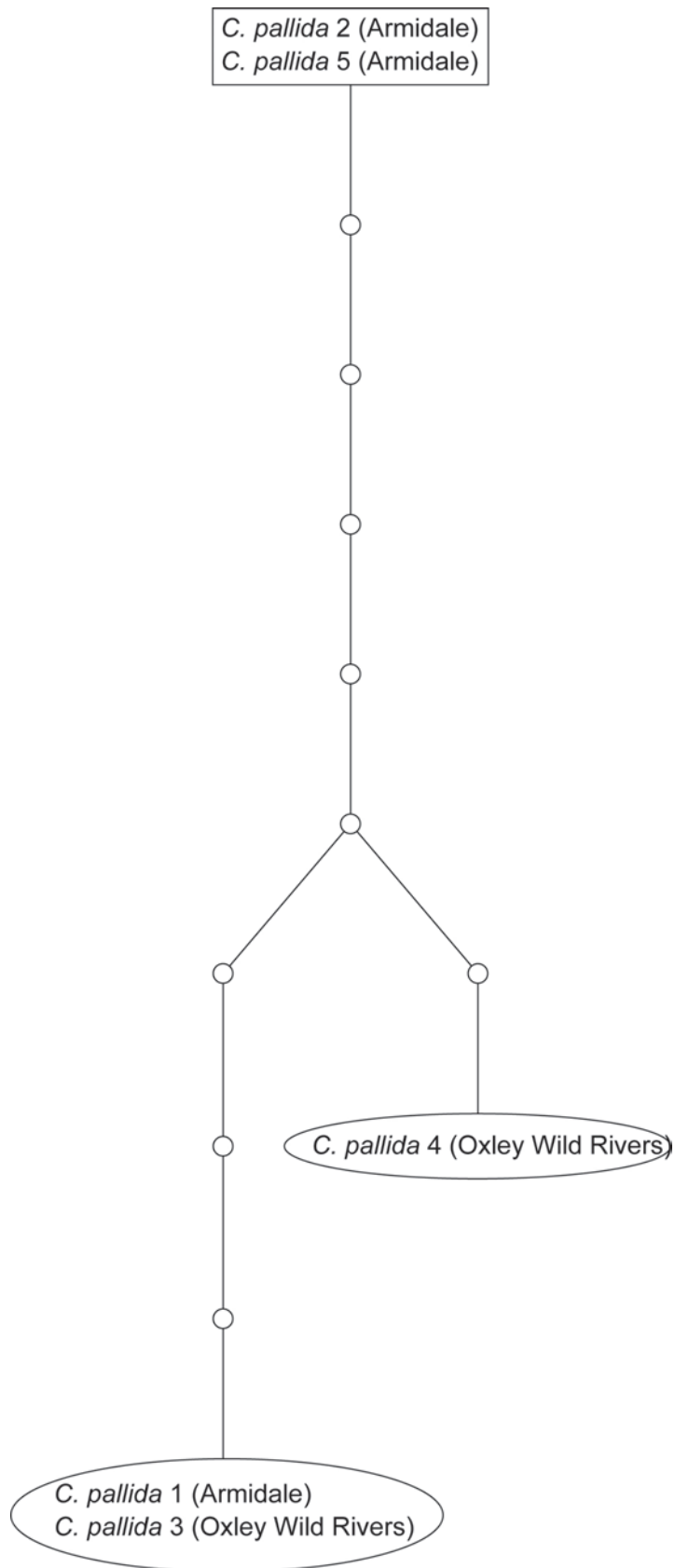
**Figura 4.2-49.** Red de haplotipos TCS obtenida a partir de las secuencias *cox1* para los individuos de *Calomela ioptera*. El recuadro indica el individuo con mayor probabilidad de poseer el haplotipo ancestral.



**Figura 4.2-50.** Red de haplotipos TCS obtenida a partir de las secuencias *cox1* para los individuos de *Calomela fugitiva*. El recuadro indica los individuos con mayor probabilidad de poseer el haplotipo ancestral.

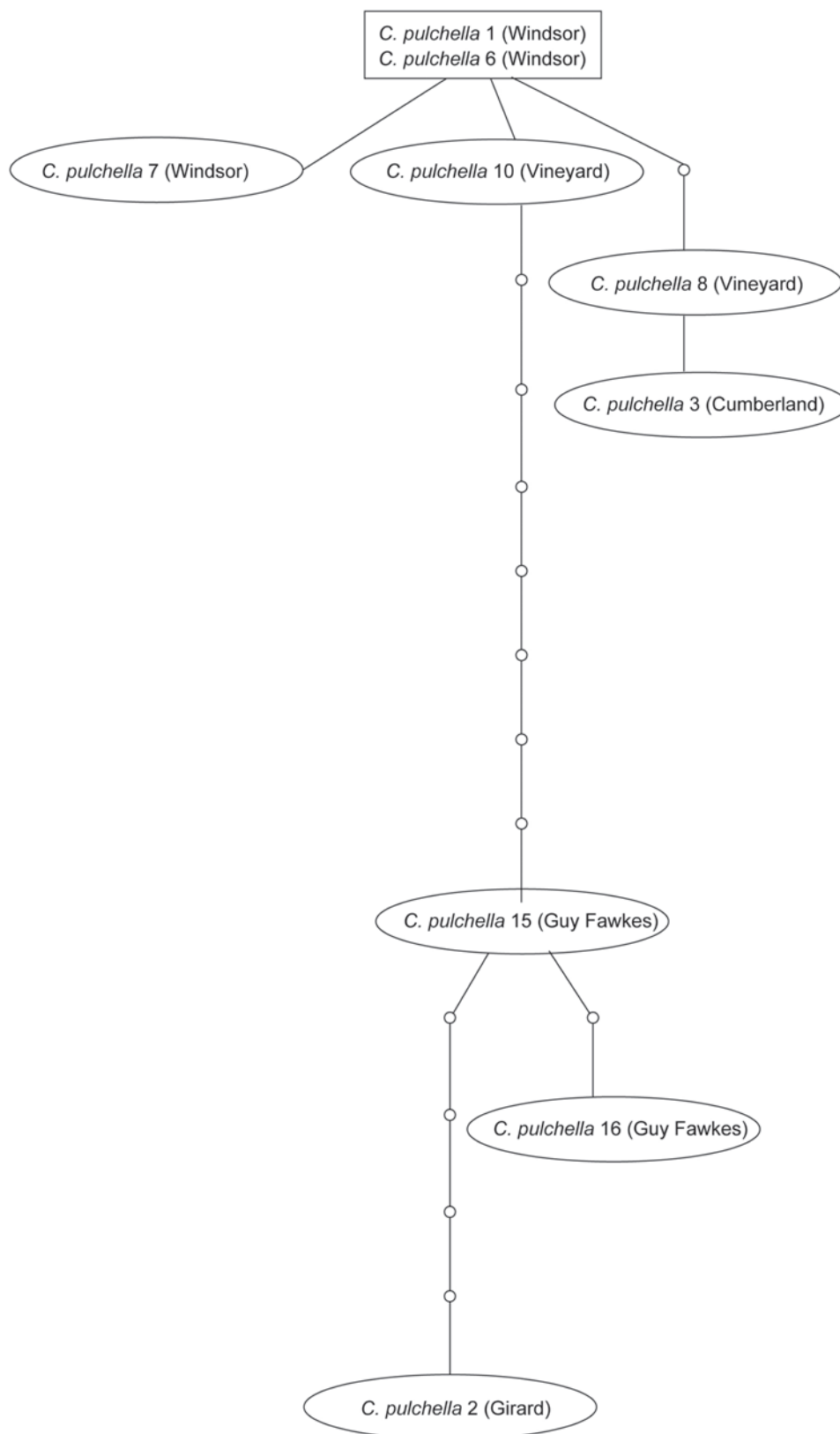


**Figura 4.2-51.** Red de haplotipos TCS obtenida a partir de las secuencias *cox1* para los individuos de *Calomela fulvilabris*. El recuadro indica el individuo con mayor probabilidad de poseer el haplotipo ancestral.

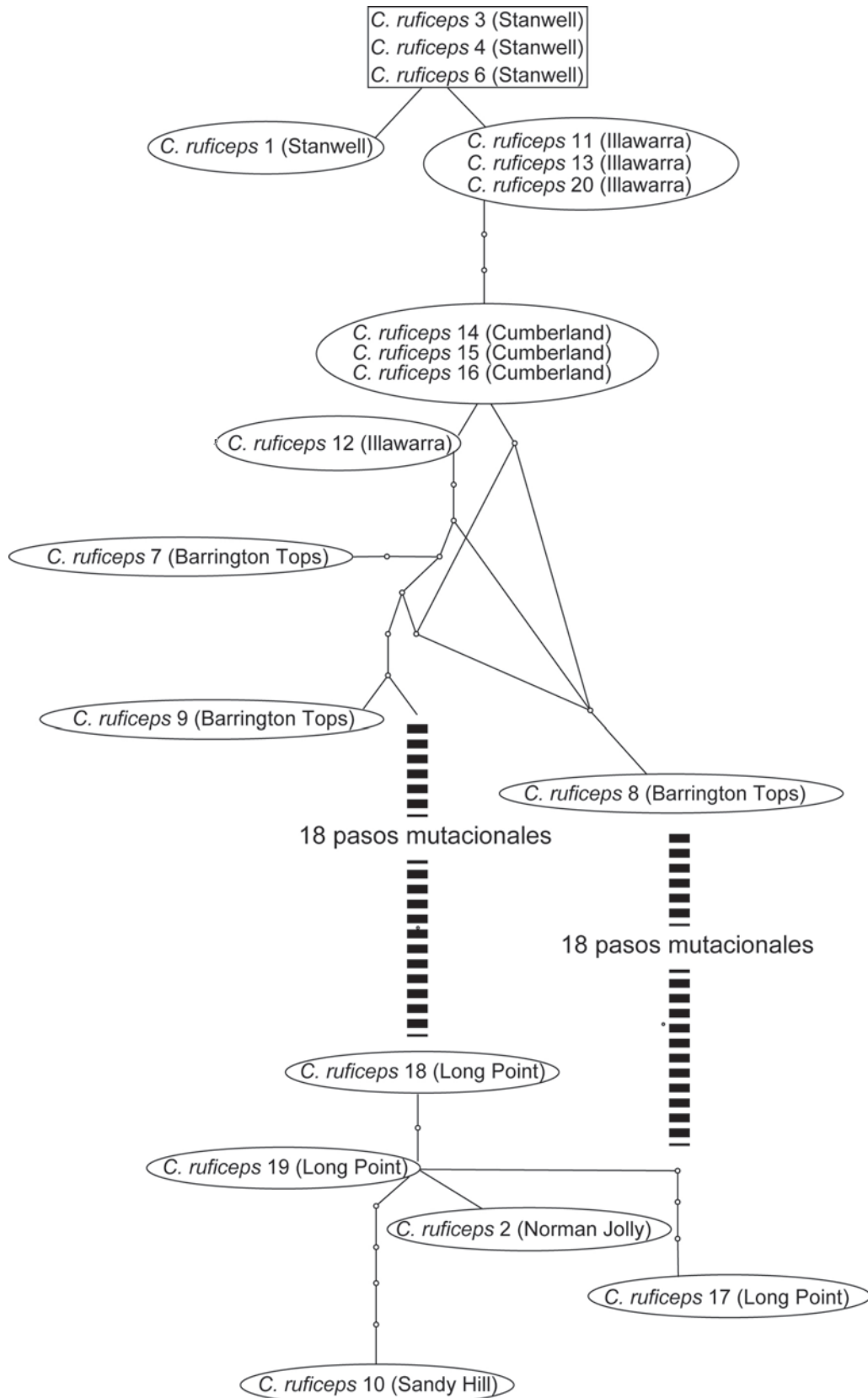


**Figura 4.2-52.** Red de haplotipos TCS obtenida a partir de las secuencias *cox1* para los individuos de *Calomela pallida*. El recuadro indica los individuos con mayor probabilidad de poseer el haplotipo ancestral.

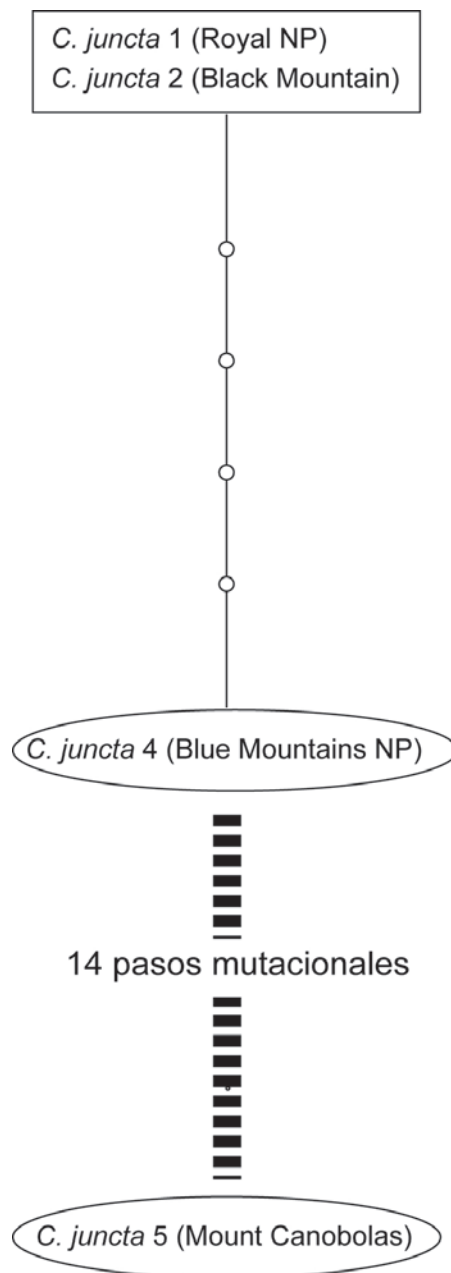




**Figura 4.2-53.** Red de haplotipos TCS obtenida a partir de las secuencias *cox1* para los individuos de *Calomela pulchella*. El recuadro indica los individuos con mayor probabilidad de poseer el haplotipo ancestral.



**Figura 4.2-54.** Red de haplotipos TCS obtenida a partir de las secuencias *cox1* para los individuos de *Calomela ruficeps*. El recuadro indica los individuos con mayor probabilidad de poseer el haplotipo ancestral.



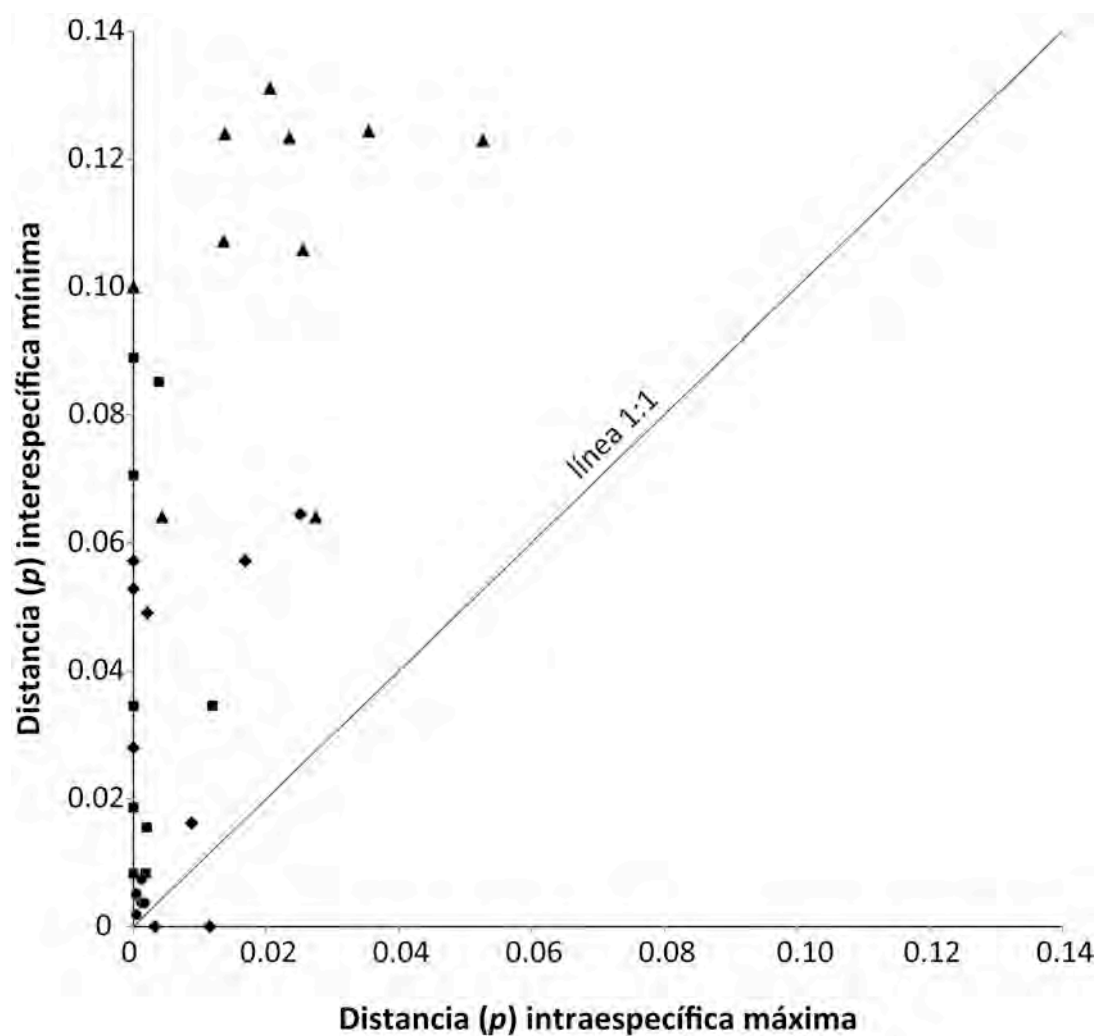
**Figura 4.2-55.** Red de haplotipos TCS obtenida a partir de las secuencias *cox1* para los individuos de *Calomela juncta*. El recuadro indica los individuos con mayor probabilidad de poseer el haplotipo ancestral.

## 4.2.4.11.- Utilidad de los marcadores moleculares en la identificación de especies

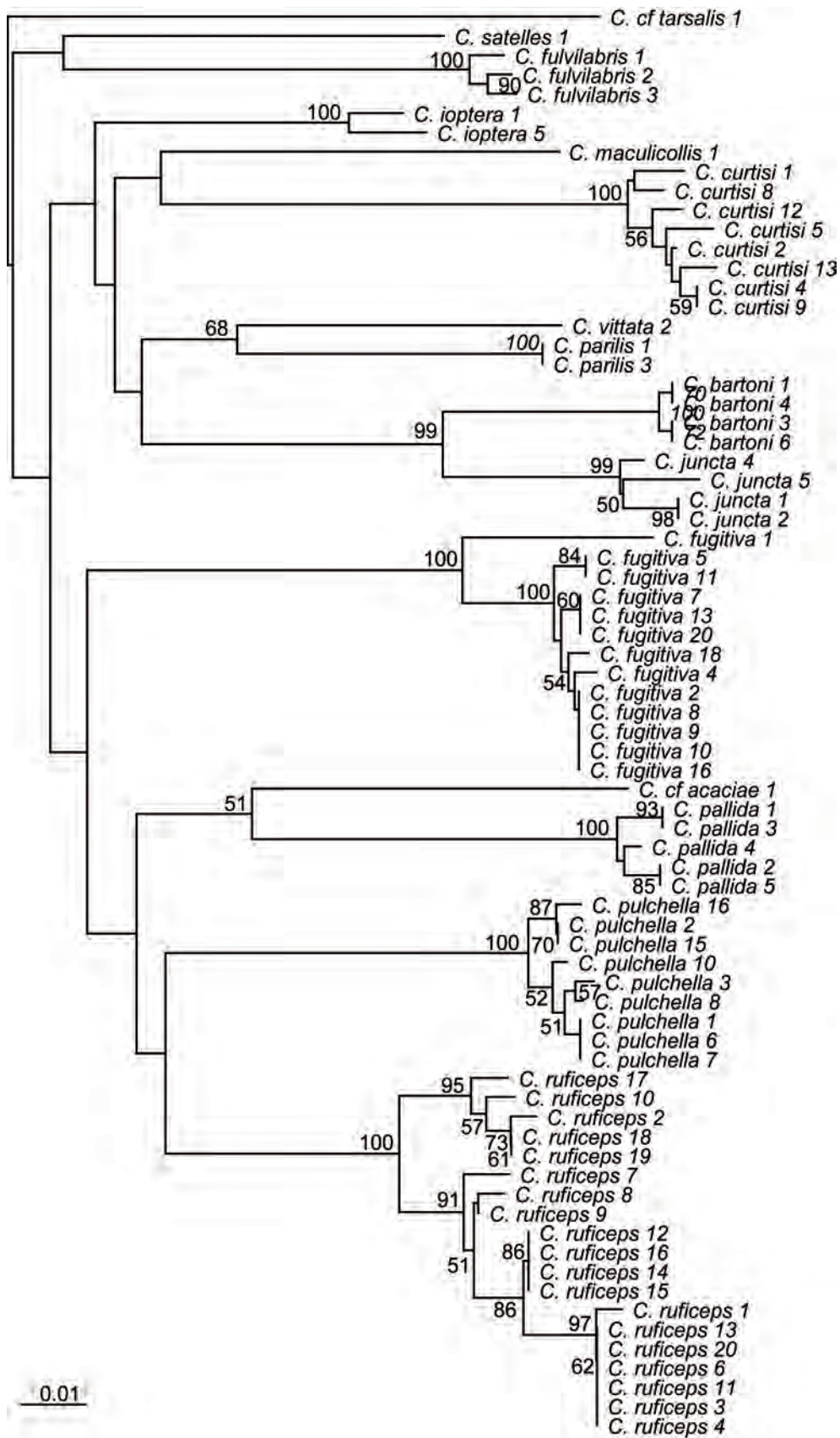
La mayoría de comparaciones (89,5%) entre distancias genéticas interespecíficas mínimas e intraespecíficas máximas para cada especie y marcador molecular en *Calomela* confirmó que  $d_{\min\_inter} > d_{\max\_intra}$ , demostrándose la existencia de un *barcoding gap* cuyas dimensiones fueron variables en función del marcador molecular analizado (Figura 4.2-56). Para *cox1*, la media del cociente  $d_{\min\_inter} / d_{\max\_intra}$  fue de 4,92 (desv. est. = 1,61), es decir, que el *barcoding gap* para dicho marcador en *Calomela* es en promedio 4,92 veces la  $d_{\max\_intra}$ . Las secuencias ITS2 mostraron una razón  $d_{\min\_inter} / d_{\max\_intra}$  de 18,67 (desv. est. = 8,38). En CAD esta misma relación fue de 4,81 (desv. est. = 3,40), mientras que en LSU el valor fue 6,51 (desv. est. = 3,56). Tan sólo se detectaron dos casos en los que  $d_{\min\_inter} < d_{\max\_intra}$ , que se correspondieron con las secuencias CAD de las especies *C. bartoni* y *C. juncta*. Todos los individuos de estas mismas especies presentaron además idénticas secuencias LSU, por lo que sus divergencias intra e interespecíficas para este marcador fueron siempre nulas.

Los árboles NJ (Figuras 4.2-57 a 4.2-60) mostraron que en la práctica totalidad de los casos las secuencias de las especies con más de un individuo secuenciado formaban agrupaciones muy bien diferenciadas y estadísticamente soportadas que permitían una identificación inequívoca. Las excepciones se refirieron exclusivamente a las especies *C. bartoni* y *C. juncta*, que compartían secuencias idénticas para CAD y LSU.

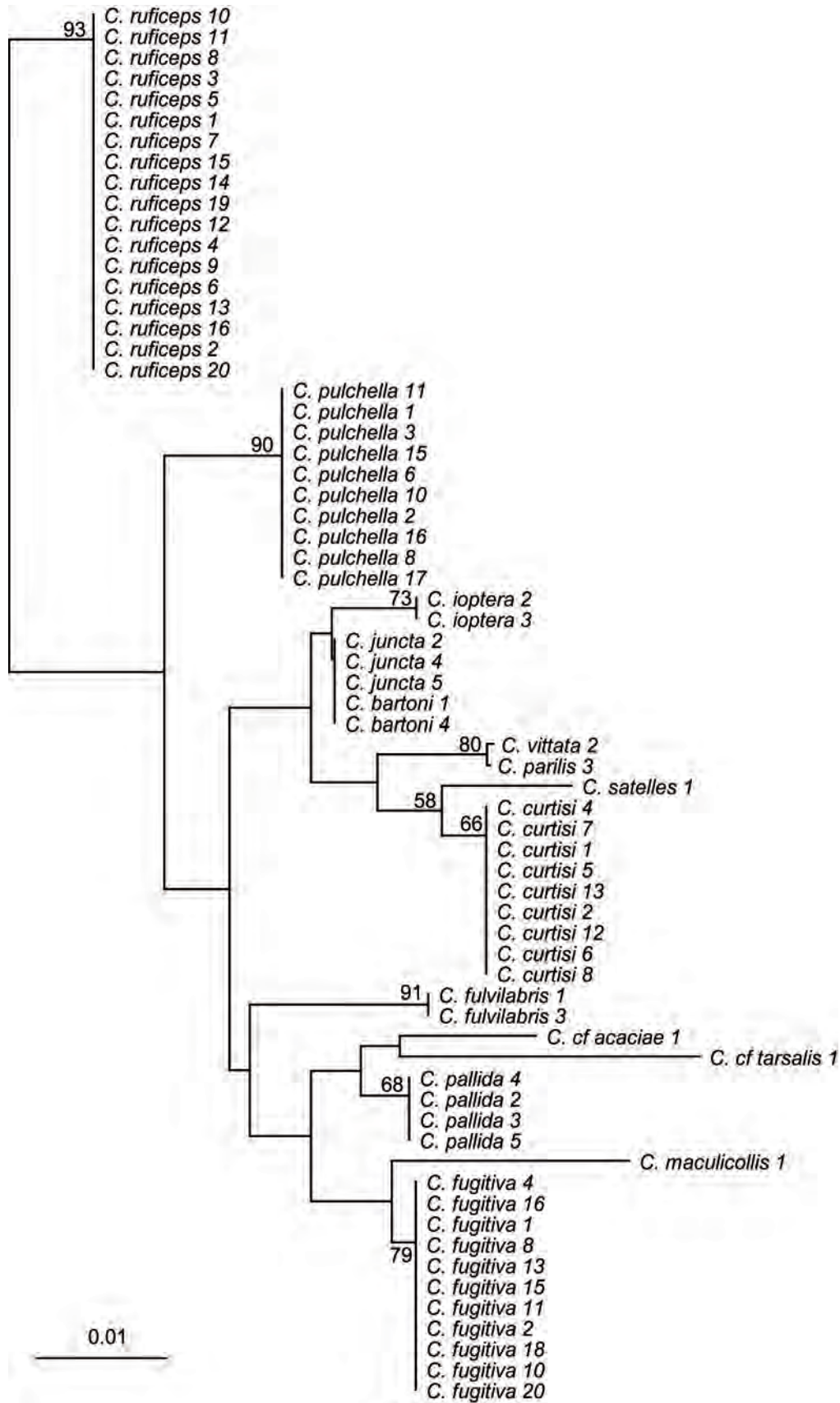
Los análisis EMD a partir de secuencias recodificadas resaltaron el grado de similitud relativa entre secuencias de las diferentes especies en función de su disposición en el plano (Figuras 4.2-61 a 4.2-64). Las secuencias pertenecientes a una misma especie mostraron un alto grado de cohesión en sus distribuciones espaciales, formando agregaciones discretas muy bien diferenciadas a nivel interespecífico. Las únicas excepciones fueron *C. bartoni* y *C. juncta* para los marcadores CAD y LSU, en sintonía con los resultados de los análisis anteriores.



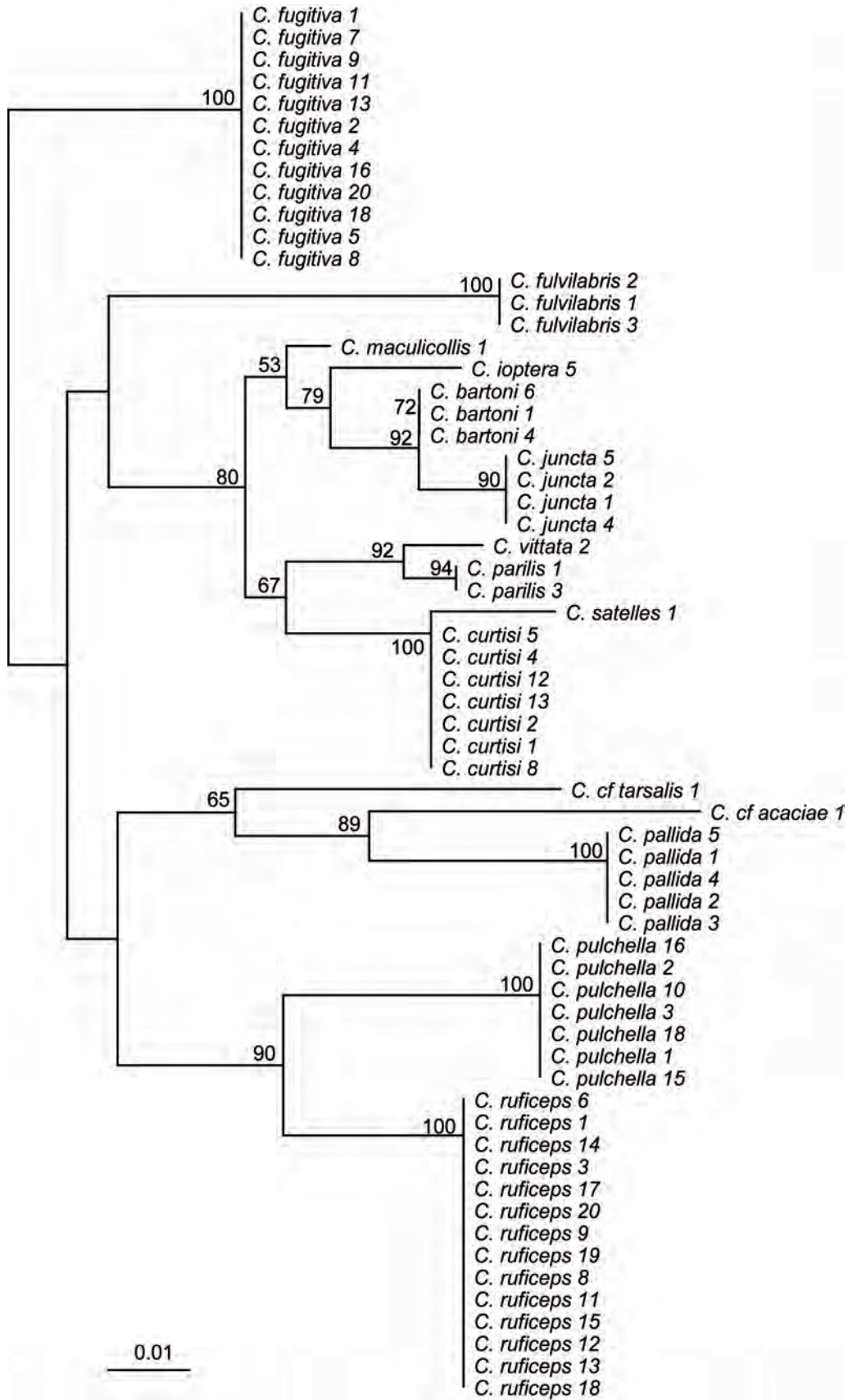
**Figura 4.2-56.** Resultado estadístico del comportamiento de cada marcador molecular como región barcoding en las especies de *Calomela*. Las figuras geométricas indican los valores para las comparaciones entre especies con dos o más individuos secuenciados para un mismo marcador molecular. Los valores que aparecen a la izquierda de la línea 1:1 satisfacen el criterio del “barcoding gap”. Triángulos = *cox1*, cuadrados = *ITS2*, rombos = *CAD*, círculos = *LSU*.



**Figura 4.2-57.** Árbol de Neigbor-Joining basado en la distancia p obtenidos en MEGA a partir de la matriz alineada de secuencias *cox1*. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de *bootstrap*. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con *bootstrap*  $\geq$  50.

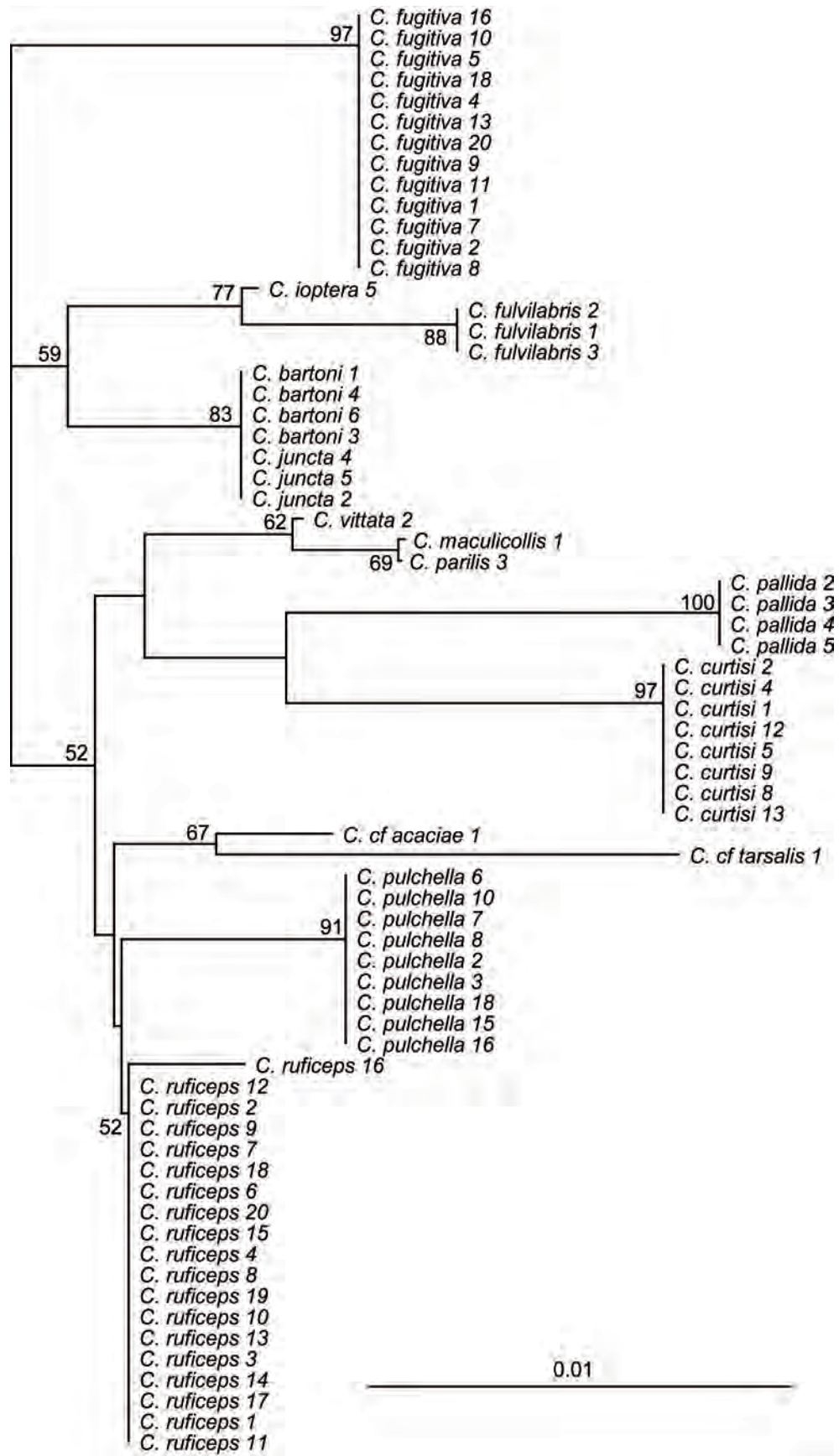


**Figura 4.2-58.** Árbol de Neigbor-Joining basado en la distancia p obtenidos en MEGA a partir de la matriz alineada de secuencias CAD. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de *bootstrap*. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con *bootstrap*  $\geq$  50.

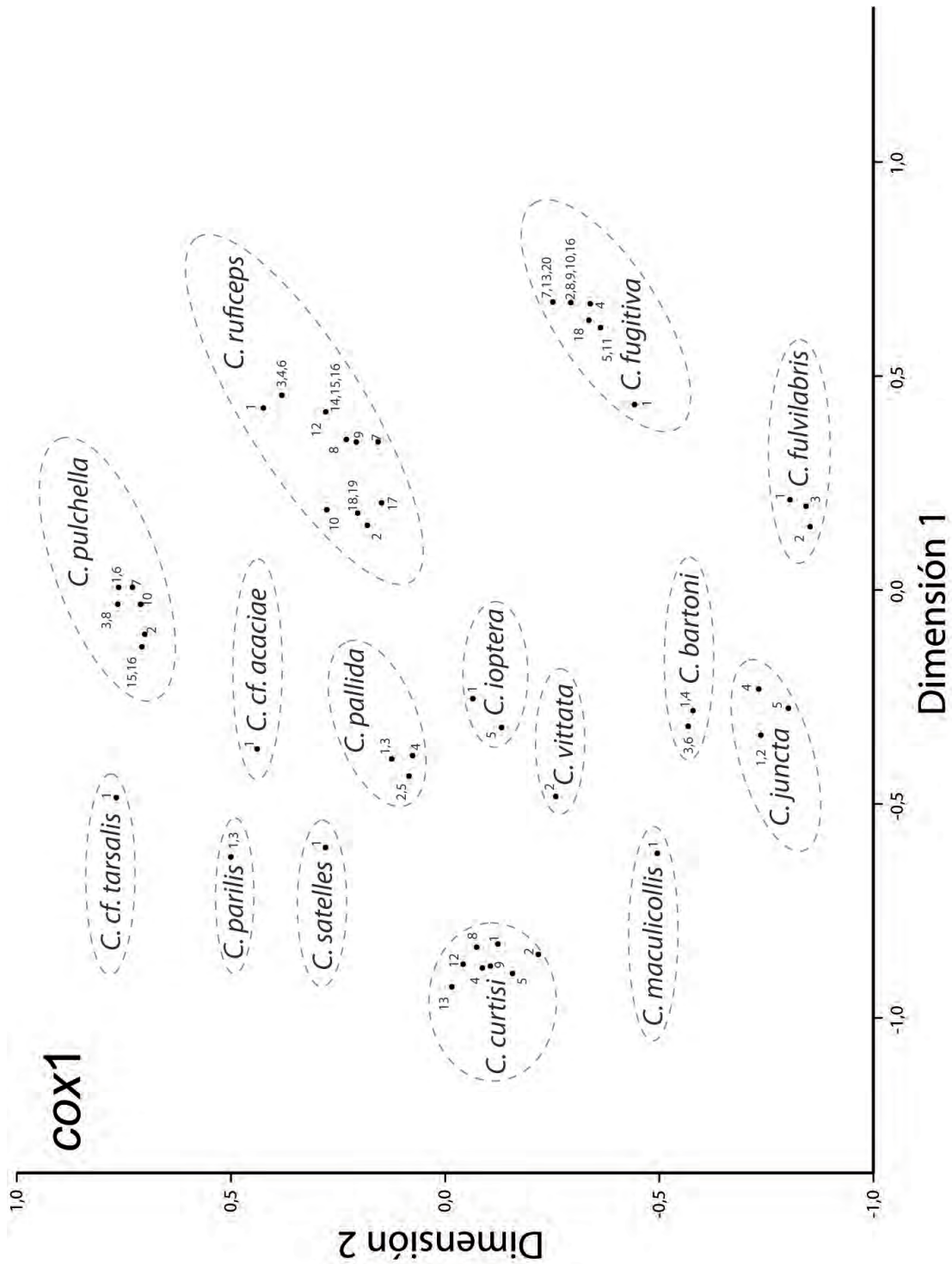


**Figura 4.2-59.** Árbol de Neigbor-Joining basado en la distancia p obtenidos en MEGA a partir de la matriz alineada de secuencias ITS2 reducida con Gblocks. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de *bootstrap*. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con *bootstrap*  $\geq$  50.

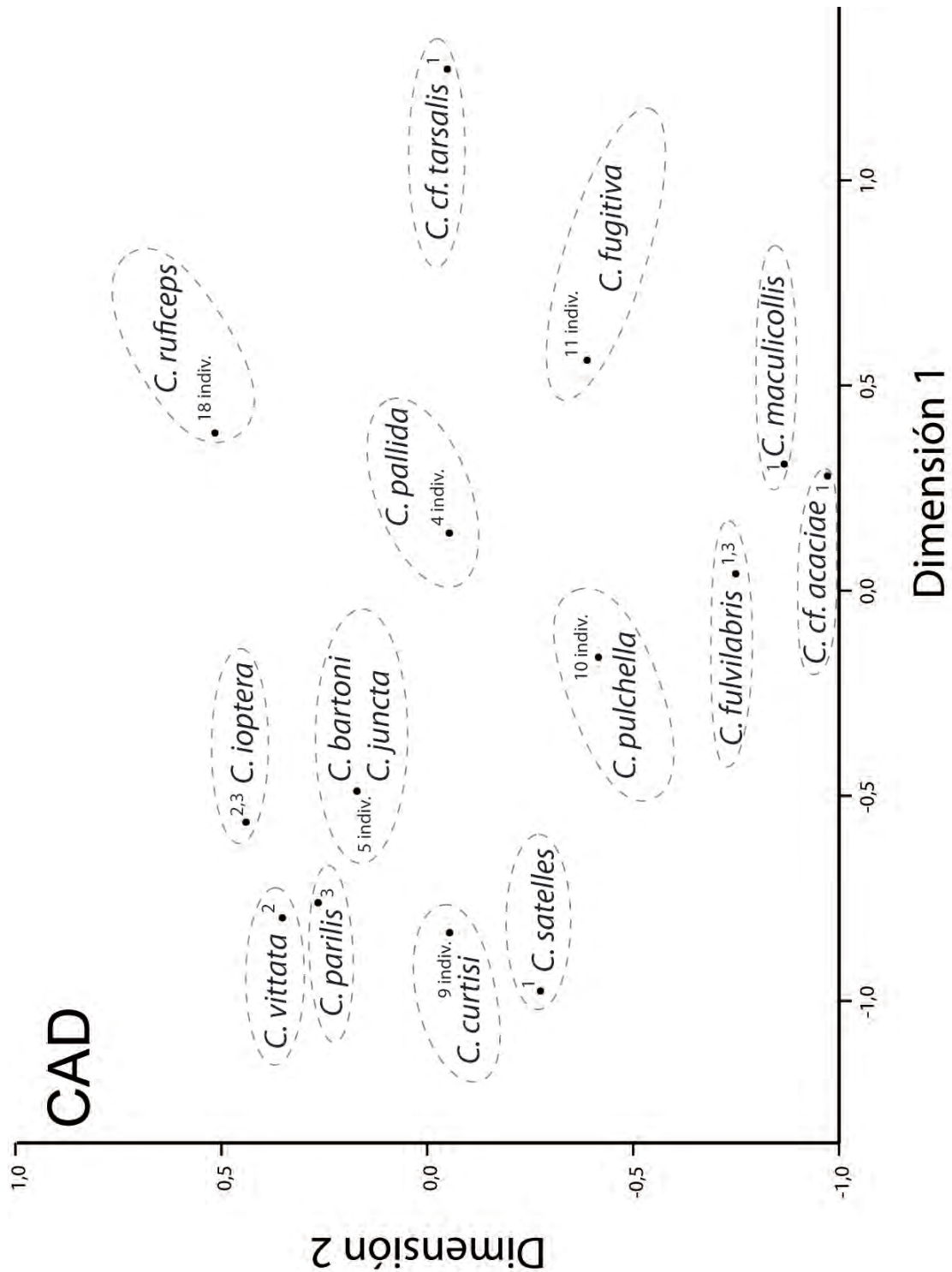




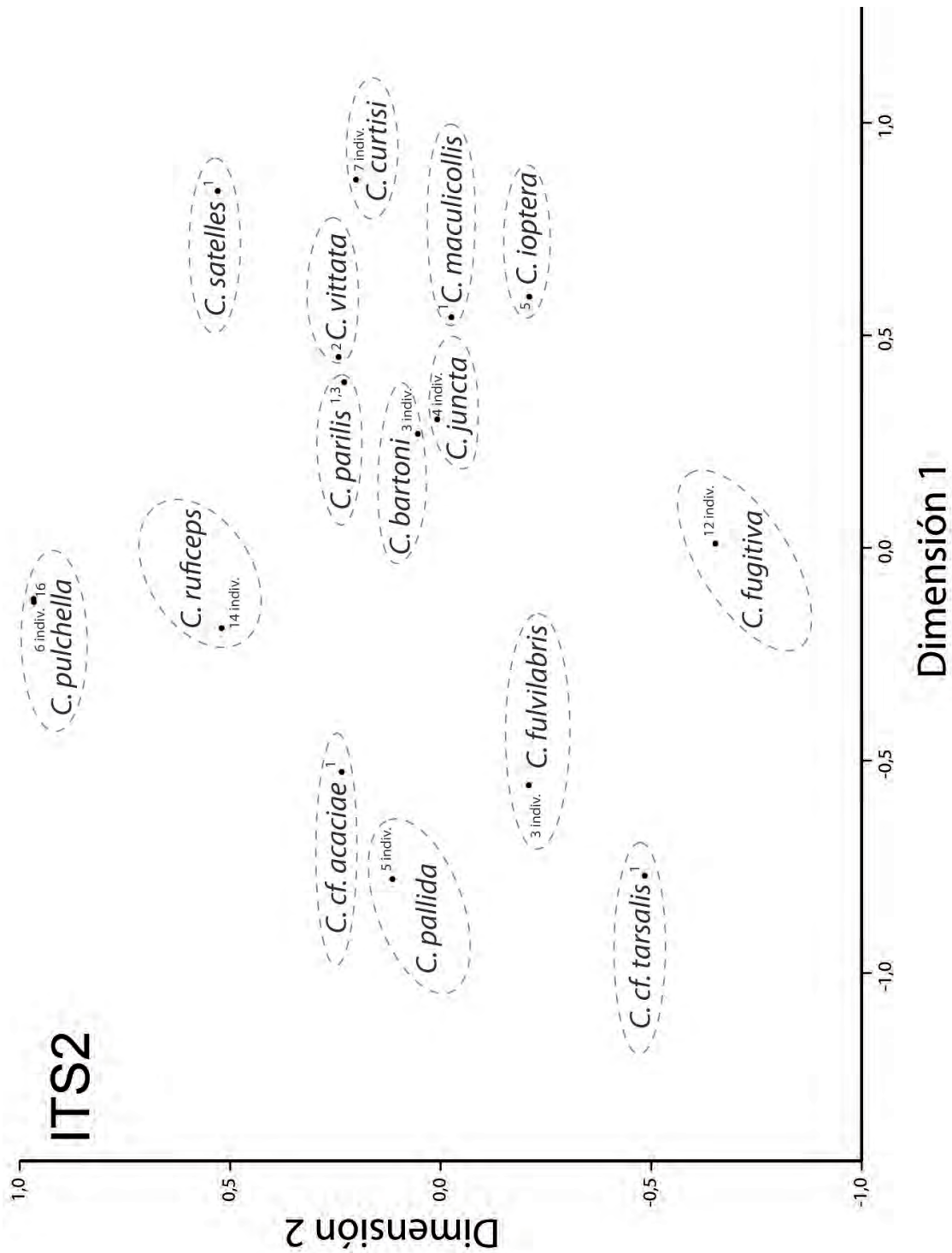
**Figura 4.2-60.** Árbol de Neigbor-Joining basado en la distancia p obtenidos en MEGA a partir de la matriz alineada de secuencias LSU. Los valores numéricos próximos a los nodos se corresponden con sus respectivos valores de *bootstrap*. Tan sólo se muestran los soportes de aquellos nodos con *bootstrap* ≥ 50.



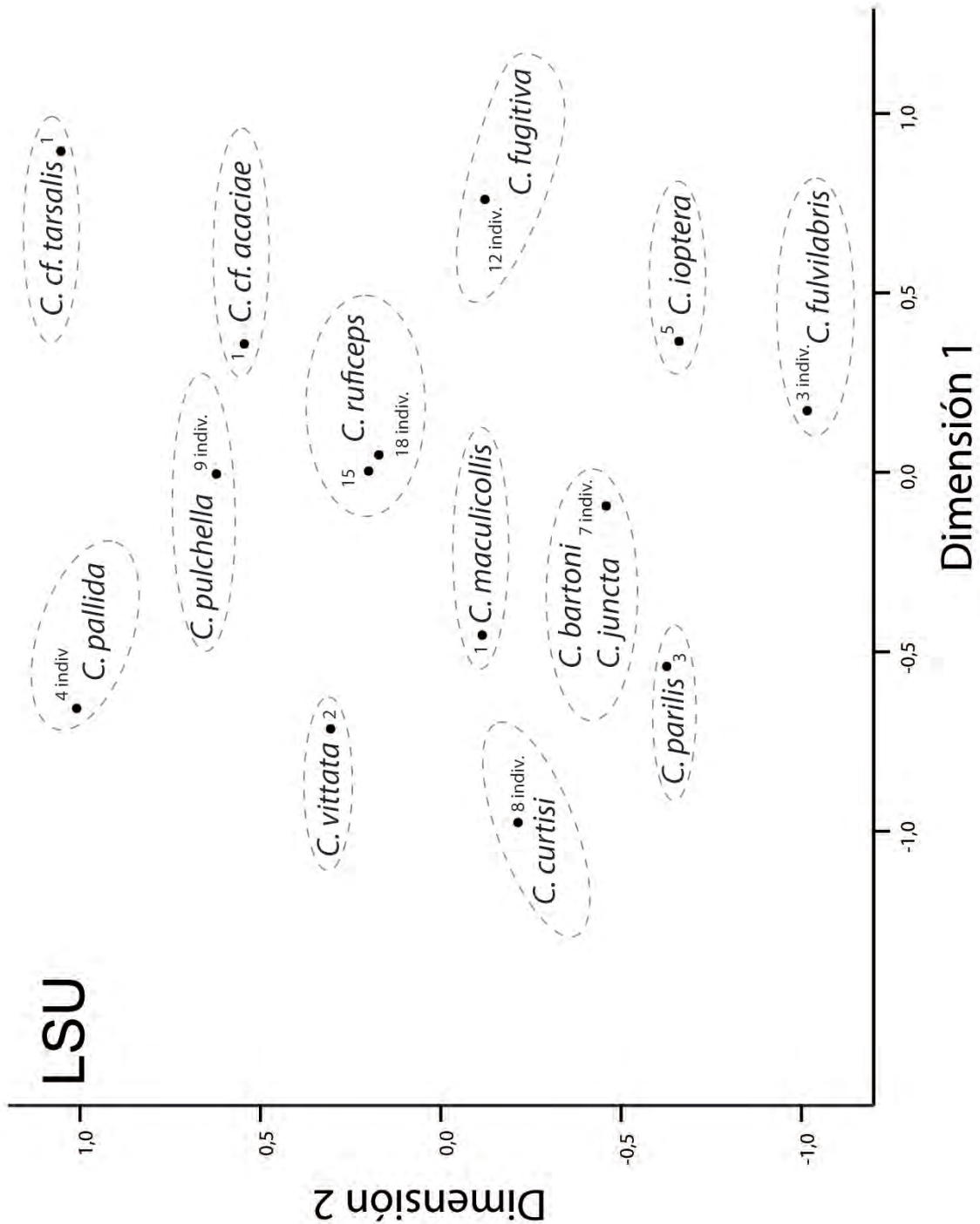
**Figura 4.2-61.** Análisis multidimensional escalado mostrando el grado de similitud relativa entre las secuencias *cox1*. Los puntos negros indican la posición en el espacio euclídeo de cada uno de las secuencias. Los números junto a los puntos identifican el ejemplar concreto al que pertenece. Para facilitar la interpretación visual de los resultados los puntos de una misma especie se han delimitado por óvalos de trazo discontinuo.



**Figura 4.2-62.** Análisis multidimensional escalado mostrando el grado de similitud relativa entre las secuencias CAD. Los puntos negros indican la posición en el espacio euclídeo de cada uno de las secuencias. Los números junto a los puntos identifican el ejemplar concreto al que pertenece. Para facilitar la interpretación visual de los resultados los puntos de una misma especie se han delimitado por óvalos de trazo discontinuo.



**Figura 4.2-63.** Análisis multidimensional escalado mostrando el grado de similitud relativa entre las secuencias ITS2 reducidas con Gblocks. Los puntos negros indican la posición en el espacio euclídeo de cada uno de las secuencias. Los números junto a los puntos identifican el ejemplar concreto al que pertenece. Para facilitar la interpretación visual de los resultados los puntos de una misma especie se han delimitado por óvalos de trazo discontinuo.

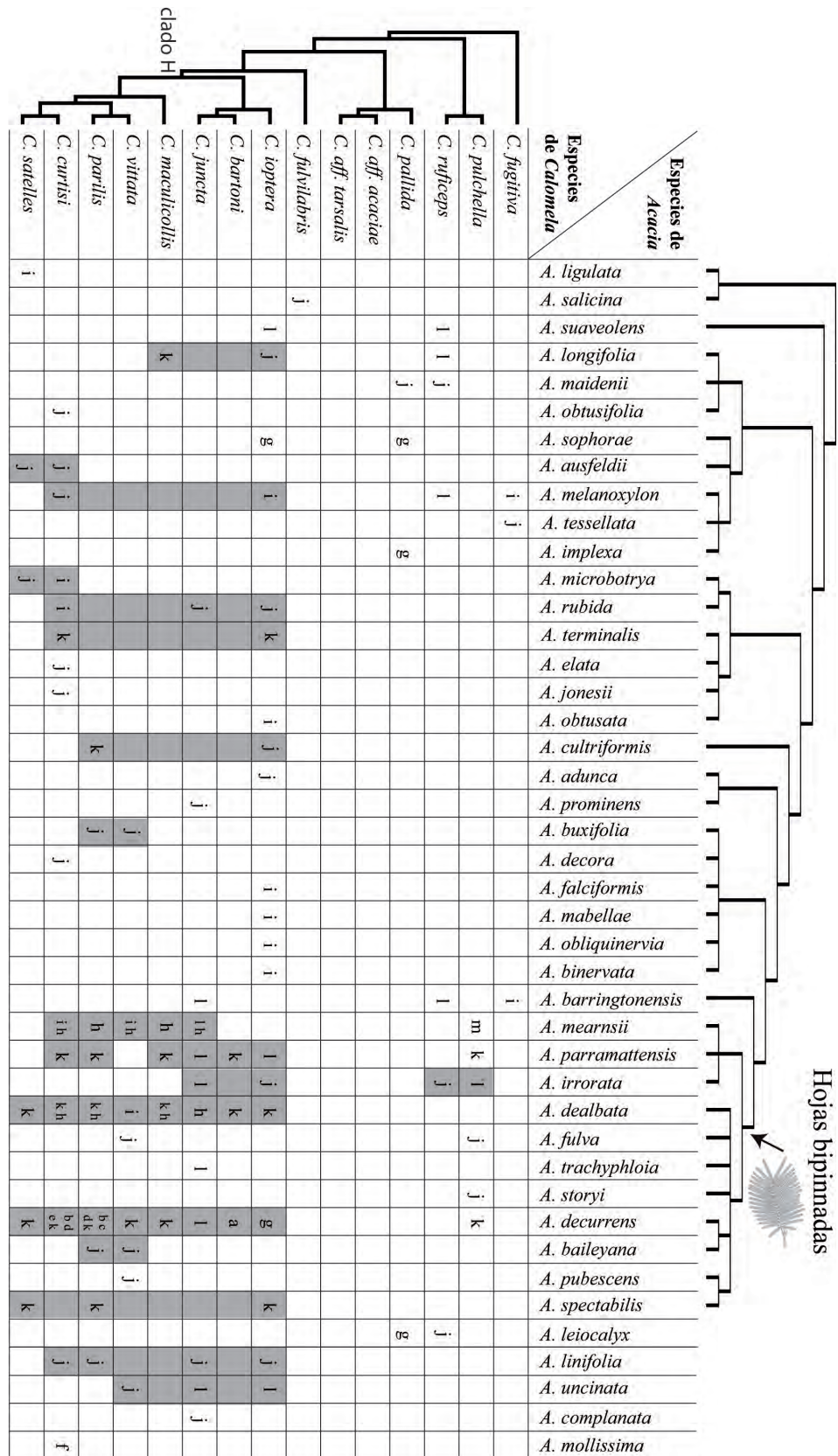


**Figura 4.2-64.** Análisis multidimensional escalado mostrando el grado de similitud relativa entre las secuencias LSU reducidas con Gblocks. Los puntos negros indican la posición en el espacio euclídeo de cada uno de las secuencias. Los números junto a los puntos identifican el ejemplar concreto al que pertenece. Para facilitar la interpretación visual de los resultados los puntos de una misma especie se han delimitado por óvalos de trazo discontinuo.

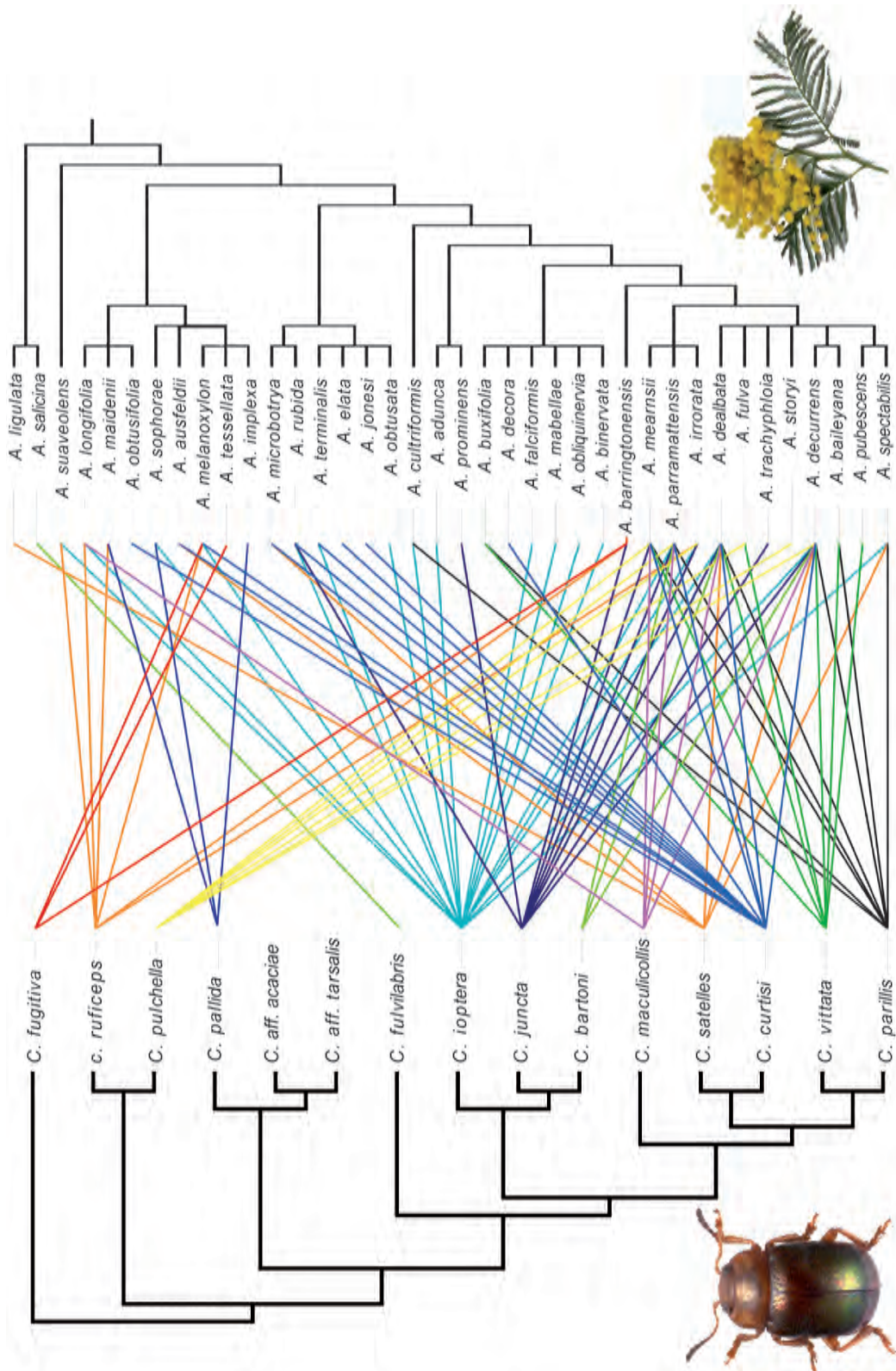
## 4.2.4.12.- Asociaciones con plantas hospedadoras

La información recopilada sobre plantas nutricias proporcionó 99 registros tróficos para 13 de las 15 especies de *Calomela* incluidas en el presente estudio (Figura 4.2-65). Las únicas especies para las que no se encontraron datos de asociaciones con hospedadores fueron las dos que aún no se han descrito y referidas como *C. aff. acaciae* y *C. aff. tarsalis*. Estos vínculos tróficos reflejaron una variación en amplitud del espectro alimenticio de las especies, cuyos registros oscilaron entre una única especie hospedadora en el caso de *C. fulvilabris*, y 20 especies de *Acacia* sobre las que puede desarrollar su ciclo vital *C. ioptera* (Figura 4.2-66). La intensidad en el muestreo de las asociaciones tróficas es, en cualquier caso, un factor importante a tener en cuenta. Es probable que para las especies más comunes exista más información ecológica, mientras que para especies más crípticas los registros resulten escasos. En todo caso, las asociaciones tróficas de *Calomela* mostrarían una tendencia generalista dentro del género *Acacia*, si bien se detectó una elevada concentración de vínculos tróficos (44 asociaciones, 44,4%) con un reducido grupo de especies emparentadas de acacia de hoja bipinnada. Se trata concretamente de los miembros del clado H de *Calomela* (Figura 4.2-40) y las especies emparentadas de acacias *A. dealbata*, *A. decurrens*, *A. mearnsii* y *A. parramattensis*.

La matriz binaria de asociaciones herbívoro-hospedador contuvo 17 caracteres informativos y su análisis basado en parsimonia halló 108 árboles óptimos, cada uno con un coste de 54 pasos. Su árbol consenso estricto presentó al mismo grupo de especies de *Calomela* mencionado en el párrafo anterior (Figura 4.2-40-clado H) como monofilético debido a su preferencia compartida por aquéllas cuatro especies de acacia (figura 4.2-67).

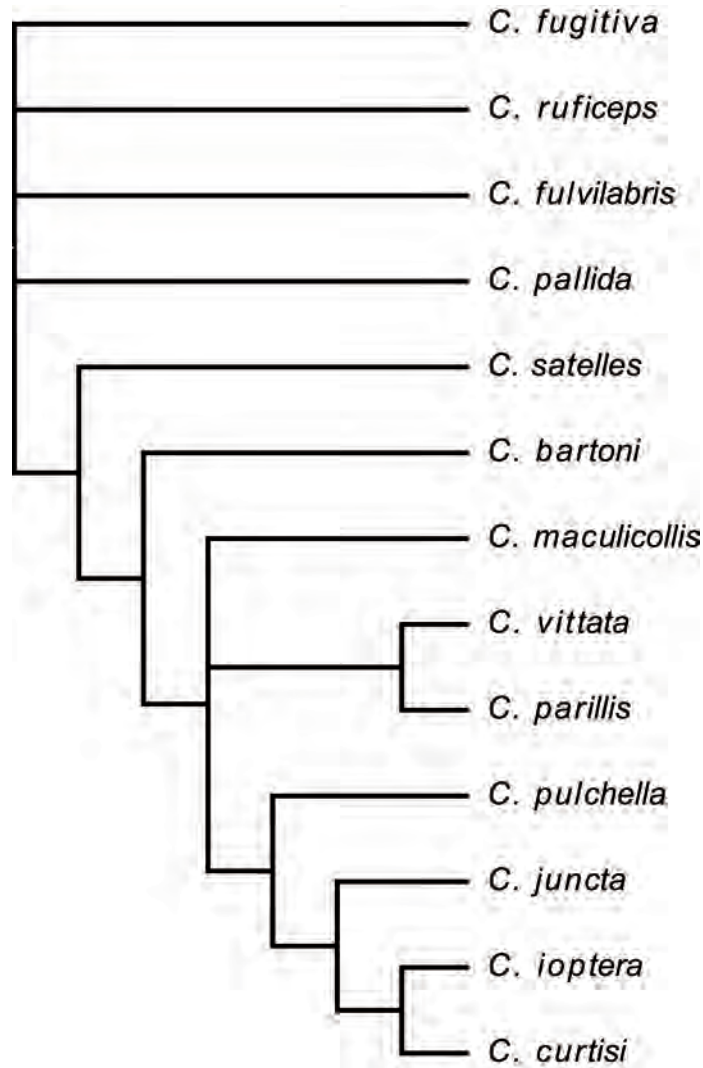


**Figura 4.2-65.** Resumen de los registros de hospedadores disponibles para las 15 especies de *Calomela* estudiadas. Las interacciones marcadas en color gris identifican especies próximas de *Calomela* que se alimentan de una misma especie de acacia. Fuentes de información: (a) Froggatt (1893), (b) Froggatt (1902), (c) Froggatt (1907), (d) Froggatt (1923), (e) Gallard (1916), (f) Grove (2010), (g) Hawkeswood & Monaghan (2007), (h) Hunt et al. (1996), (i) Reid (1989), (j) Reid (person. com.), (k) Selman (1979), (l) Selman (1989), (m) Van den Berg (1982).



**Figura 4.2-66.** Árboles filogenéticos enfrentados de las especies de *Calomela* y sus acacia hospedadoras mostrando las conexiones tróficas. *C. aff. acaciae* y *C. aff. tarsalis* son dos especies no descritas que carecen de registros de alimenticios en la literatura. La filogenia de *Acacia* ha sido reconstruida a partir de la información publicada en Maslin (2001), Murphy *et al.* (2010) y Miller *et al.* (2011).





**Figura 4.2-67.** Árbol consenso estricto de máxima parsimonia obtenido en PAUP a partir de la matriz de asociaciones tróficas *Calomela-Acacia*.

#### 4.2.4.13.- Estructura filogenética de caracteres morfológicos

Los 20 caracteres morfológicos analizados y sus estados de carácter en las 15 especies de *Calomela* y el grupo externo *Callidemum parryi* se muestran en la tabla 4.2-19. La potencial estructura filogenética de estos caracteres se evaluó contrastando su variación sobre la filogenia molecular de *Calomela* con un escenario de evolución al azar generado a partir de la aleatorización de los datos (Tabla 4.2-20). La distribución de once de los caracteres no fue significativamente diferente de una distribución generada al azar, entre los que se contaron la presencia de cresta genal (C1), la prominencia ocular (C2), la dentición del surco hipomeral (T1), la distribución de la puntuación metanepisternal (T2), la existencia de estriación elitral (E1), la morfología

**Lista de caracteres:**

- C1, cresta genal: ausente (0), presente (1)
- C2, prominencia ocular: ausente (0), presente (1)
- T1, surco hipomeral: ausente (0), simple (1), dentado (2)
- T2, puntuación metaepimeral: toda la superficie (0), restringida al margen externo (1), intermedia (2)
- T3, puntuación pronotal: puntuación fina (0), puntuación gruesa (1), puntuación tanto fina y como gruesa (2)
- T4, coloración pronotal: metálica (0), no metálica (1)
- T5, forma pronotal hacia el margen anterior: expandido (0), estrechado (1), invariable (2)
- E1, estriación elitral: ausente (0), presente (1)
- E2, coloración elitral: metálica (0), amarilla (1), banda metalizada (2), banda metalizada con puntuaciones metalizadas (3)
- E3, superficie elitral en la zona postnumeral: plana (0), profundamente deprimida (1)
- E4, ápice epipleural: simple (0), engrosado y retorcido (1)
- P1, uñas: simples (0), bifidas (1), apendiculadas (2), bifidas y apendiculadas (3)
- A1, superficie del último ventrito del macho: simple (0), depresión sedosa (1), depresión glabra (2), depresión ligeramente sedosa (3)
- A2, terminación del último ventrito del macho: simple (0), prominente (1)
- A3, dentición del último ventrito del macho: sin dientes (0), dos dientes (1), cuatro dientes (2)
- A4, terminación del último ventrito de la hembra: simple (0), prominente (1)
- A5, dentición del último ventrito de la hembra: sin dientes (0), dos dientes (1)
- A6, lados de los ventritos medios: levemente crestados (0), crestados (1), muy crestados (2)
- G1, flagelo del edeago: ausente (0), presente (1)
- H1, forma corporal [carácter continuo]: relación entre la anchura del margen posterior pronotal y la longitud desde el margen anterior pronotal hasta el ápice elitral

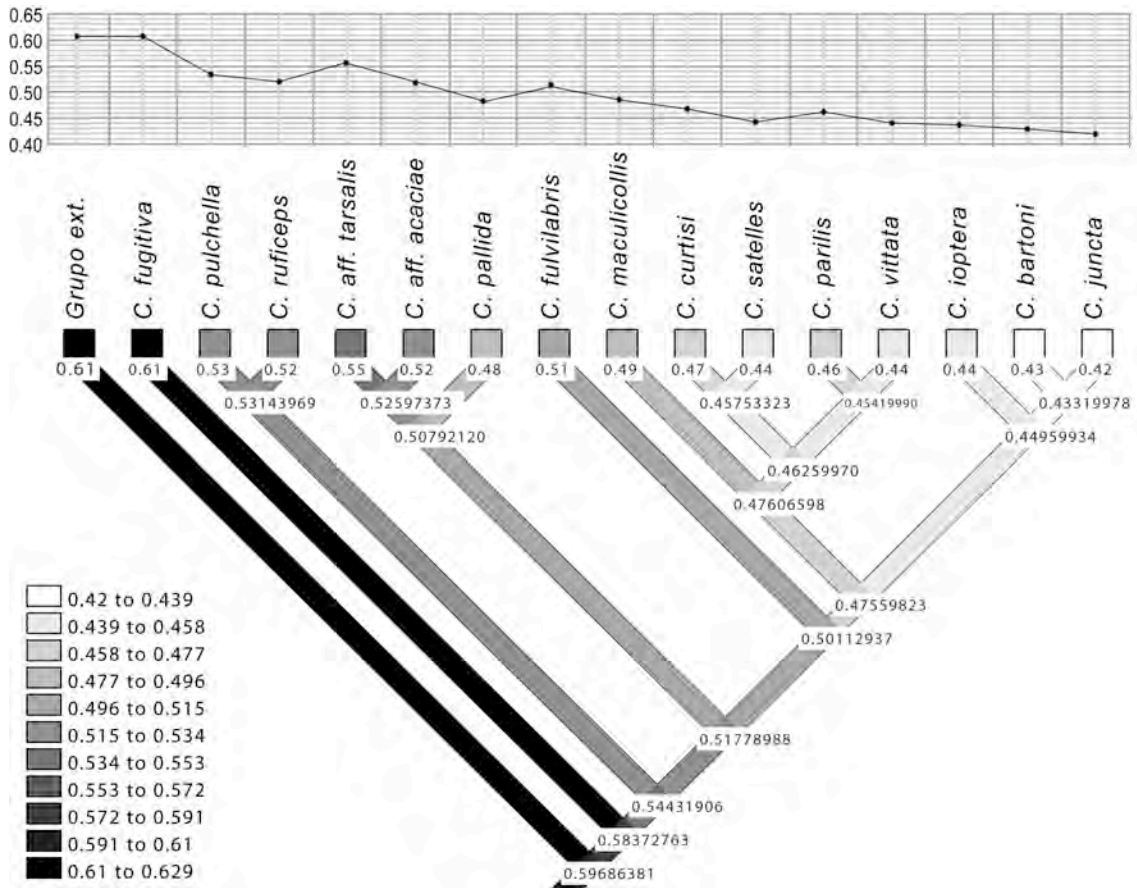
Especie	Estado de carácter																				
	C1	C2	T1	T2	T3	T4	T5	E1	E2	E3	E4	P1	A1	A2	A3	A4	A5	A6	G1	H1	
<i>C. aff. acaciae</i>	1	1	2	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.52
<i>C. aff. tarsalis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0.55
<i>C. bartoni</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	2	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0.43
<i>C. curtisi</i>	1	1	1	0	0	1	0	0	2	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0.47
<i>C. fugitiva</i>	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	2	1	1	2	0	1	0.61
<i>C. fuviiabris</i>	1	0	1	1	2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0.51
<i>C. toptera</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	3	0	1	2	0	1	1	1	1	1	1	1	0.44
<i>C. juncta</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	2	0	1	1	3	1	1	1	1	0	1	1	0.42
<i>C. maculicollis</i>	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0.49
<i>C. pallida</i>	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	3	0	1	1	1	1	1	0	1	0.48
<i>C. parilis</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	2	0	1	1	3	1	1	1	1	0	1	1	0.46
<i>C. pulchella</i>	0	1	1	1	0	0	2	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	2	0	0	0.53
<i>C. ruficeps</i>	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	2	1	0	1	0	2	0	0	0.52
<i>C. safelles</i>	1	1	1	2	1	1	0	0	3	0	1	2	1	1	0	0	0	1	1	1	0.44
<i>C. vittata</i>	1	1	1	1	1	1	0	0	2	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0.44
<i>Callidernum parryi</i>	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0.61

**Tabla 4.2-19.** Caracteres morfológicos analizados y sus respectivos estados de carácter en las especies de *Calomela*.

angular (P1), la prominencia (A2) y dentición (A3) del último ventrito abdominal visible en el macho, la prominencia (A4) y dentición (A5) del último ventrito en la hembra, el relieve lateral de los ventritos medios (A6) y la presencia de flagelo en el edeago (G1). Por el contrario, siete caracteres mostraron una estructuración significativa en el árbol. Concretamente se trató de los caracteres relativos a la puntuación (T3), coloración (T4) y forma pronotal (T5), la coloración elitral (E2), el relieve de la superficie elitral en la zona posthumeral (E3), la forma del ápice epipleural (E4) y la superficie del último ventrito del macho (A1). El carácter de tipo continuo que evaluaba la forma corporal (H1) también mostró una distribución correlacionada con la estructura filogenética del árbol (Figura 4.2-68).

Carácter <sup>a</sup>	IC	IR	pasos	P
<b>C1 (2/16)</b>	0.50	0.00	2	1.000 [1-2]
<b>C2 (1/16)</b>	1.00	0.00	1	1.000 [1-1]
<b>T1 (1/16), (2/16)</b>	0.67	0.00	3	1.000 [2-3]
<b>T2 (1/16), (4/16)</b>	0.40	0.00	5	1.000 [2-5]
<b>T3 (1/16), (5/16)</b>	0.67	0.75	3	0.009 [2-6]
<b>T4 (5/16)</b>	0.50	0.75	2	0.007 [1-5]
<b>T5 (1/16), (7/16)</b>	1.00	1.00	2	<0.001 [2-8]
<b>E1 (4/16)</b>	0.33	0.33	3	0.297 [1-4]
<b>E2 (2/16), (3/16), (5/16)</b>	0.60	0.71	5	0.001 [5-10]
<b>E3 (4/16)</b>	1.00	1.00	1	<0.001 [1-4]
<b>E4 (4/16)</b>	1.00	1.00	1	<0.001 [1-4]
<b>P1 (1/16), (2/16), (3/16)</b>	0.50	0.00	6	1.000 [3-6]
<b>A1 (1/16), (2/16), (5/16)</b>	0.60	0.60	5	0.028 [4-8]
<b>A2 (1/16)</b>	1.00	0.00	1	1.000 [1-1]
<b>A3 (1/16), (7/16)</b>	0.40	0.50	5	0.208 [2-8]
<b>A4 (5/16)</b>	0.20	0.00	5	1.000 [1-5]
<b>A5 (8/16)</b>	0.20	0.43	5	0.420 [1-8]
<b>A6 (3/16), (4/16)</b>	0.40	0.40	5	0.104 [3-7]
<b>G1 (5/16)</b>	0.33	0.50	3	0.091 [1-5]

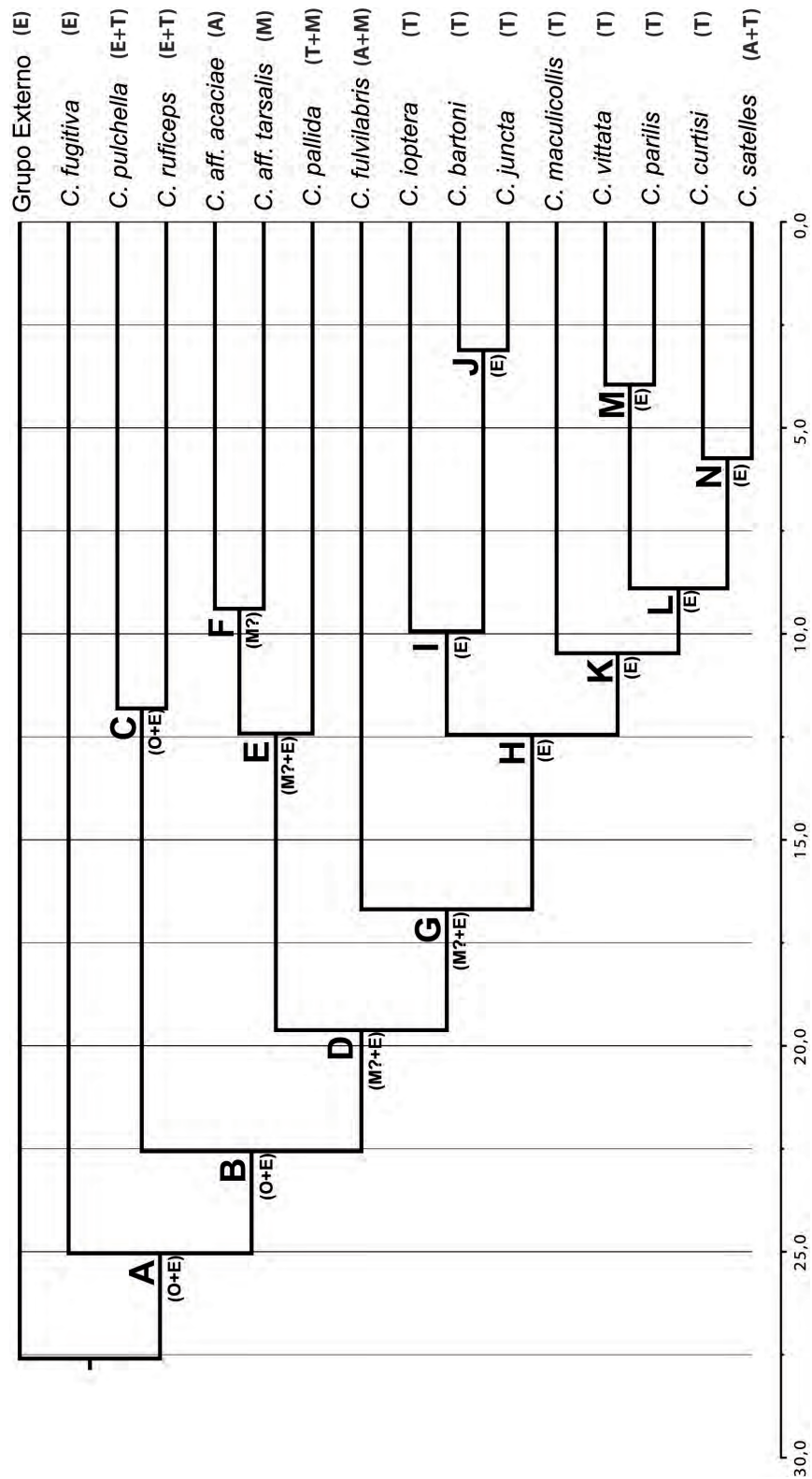
**Tabla 4.2-20.** Ajuste de los caracteres morfológicos a la filogenia molecular y resultados de las pruebas de permutación aleatoria de caracteres (el rango de la distribución nula se muestra entre corchetes). a = La proporción de los taxones con el estado de carácter menos frecuente se muestra como una indicación del umbral máximo para el número de pasos para dicho carácter en el árbol. La comparación entre este umbral teórico y el número de pasos reales del carácter en el árbol es indicativo de la potencial estructura jerárquica).



**Figura 4.2-68.** Transformación del la forma corporal de las especies de *Calomela* y del grupo externo *Callidemum parryi* sobre la filogenia molecular y reconstrucción de los estados ancestrales del carácter mediante el método de parsimonia.

4.2.4.14.- *Reconstrucción de las asociaciones ancestrales con los biomas australianos.*

El ancestro común más reciente de todas las especies de *Calomela* se recuperó vinculado a los biomas ombroclima húmedo y esclerófilo templado (Figura 4.2-69 nodo A), del mismo modo que ocurrió para los nodos B y C. Los nodos D, E, y G mostraron una clara asociación ancestral con el bioma esclerófilo templado, además de una posible relación con el bioma monzónico que también se recuperó para el nodo F. Por otro lado, todos los ancestros incluidos en el clado definido por el nodo H se recuperaron claramente relacionados con el bioma esclerófilo templado.

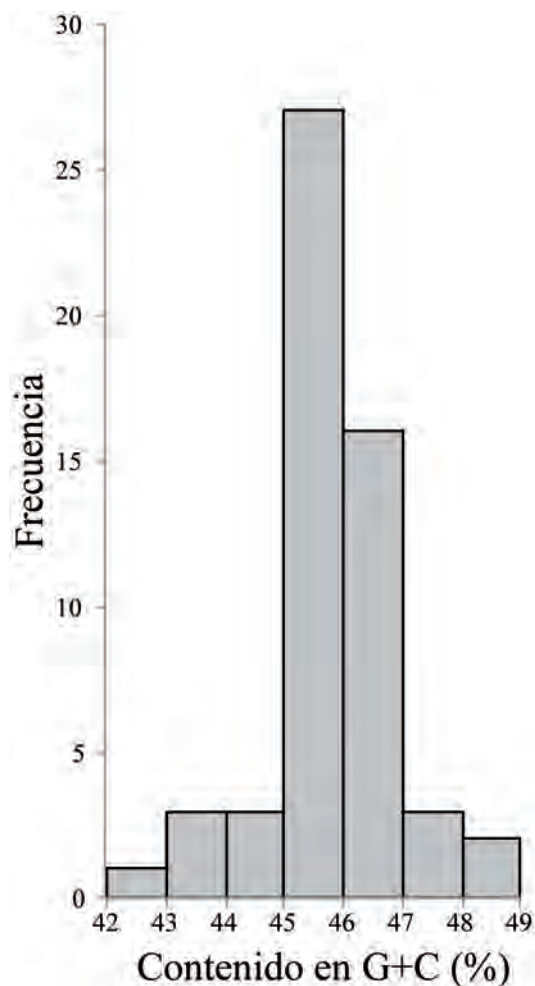


**Figura 4.2-69.** Reconstrucción ancestral de las asociaciones con los biomas australianos mapeadas sobre el árbol filogenético datado de las especies estudiadas de *Calomela*.

#### 4.2.5.- Discusión

##### 4.2.5.1.- Secuencias ribosomales: copias funcionales, estructura secundaria y alineamiento

El carácter pseudogénico de las secuencias ITS2 ha sido un importante objeto de debate en el ámbito de la filogenia molecular (Feliner y Rosselló, 2007). Buckler *et al.* (1997) sugirieron que en las copias pseudogénicas de las secuencias ITS2 cabría detectar alteraciones estructurales debidas a la acumulación de mutaciones. En nuestro caso, todas las estructuras secundarias ITS2 fueron muy consistentes con un patrón de plegamiento donde cuatro dominios o hélices surgen de un núcleo central conservado. Este patrón es comparable con las estructuras generales modeladas para otros organismos eucariotas (Joseph *et al.*, 1999; Coleman, 2007) y también descrito en especies de géneros cercanos pertenecientes a la misma subfamilia de escarabajos crisomélidos (Gómez-Zurita *et al.*, 2000), al igual que con otros grupos diferentes de coleópteros (e.g. Trizzino *et al.*, 2009). Este elevado nivel de consistencia estructural sugiere que las secuencias ITS2 de *Calomela* son copias funcionales, una idea que se ve además reforzada por el hecho de que todas ellas mostraron idénticas regiones flanqueantes 5,8S y LSU con un correcto patrón de hibridación (Harpke y Peterson, 2008). Otra evidencia a favor de que las secuencias ITS2 de *Calomela* no son pseudogenes está relacionada con la presencia del fragmento conservado de 14 nt (5'-UCGUCGUGUCCGAG-3'), idéntico al que poseen el resto de especies de coleópteros del suborden Polyphaga que se han estudiado (Figura 4.2-7), y cuyo papel biológico estaría relacionado con su posible función como diana de corte durante el procesamiento del ARN (Veldman *et al.*, 1981; Van Nues *et al.*, 1995; Hung *et al.*, 1999). El análisis del contenido en G+C también se ha propuesto como un método para la detección de secuencias pseudogénicas, en las cuales cabría esperar una reducción en G+C a costa de un incremento en la proporción A+T por procesos de desaminación (Buckler *et al.*, 1997). El contenido G+C de las secuencias ITS2 de *Calomela* se agrupó en torno a una media de 45,92% (desv. est. = 1,13%) sin que ninguna secuencia mostrase desviaciones importantes con respecto a esta tendencia central (Figura 4.2-70), y es un valor muy similar al 46,7% detectado por Gómez-Zurita *et al.* (2000) para este mismo marcador molecular en otros miembros de la misma subfamilia de Chrysomelidae.



**Figura 4.2-70.** Histograma de frecuencias del contenido en G+C en las secuencias ITS2 de *Calomela*.

En cuanto a las secuencias LSU, las estructuras secundarias inferidas exhiben un patrón de plegamiento con un alto grado de similitud entre sí, y con el de linajes mucho más distantes entre sí como son Archaea, Bacteria, Eucarya y los orgánulos plastídicos, todos ellos coincidentes en sus patrones generales de plegamiento (De Rijk *et al.*, 1998). La divergencia global del 0,7% observada en el alineamiento LSU sugiere un elevado grado de conservación nucleotídica entre las 15 especies de *Calomela* analizadas. Esta elevada homogeneidad contribuye, como antes, a reforzar la hipótesis de que se trata de secuencias funcionales también en el caso de LSU. Además, el contenido medio en G+C fue del 55,9% (desv. est. = 0,67%), valor similar al 58% detectado en otros grupos de coleópteros para este mismo marcador (Kim *et al.*, 2000).

El alineamiento de secuencias exónicas de genes codificantes para proteína es sencillo en la mayoría de los casos, sin embargo en genes no codificantes e intrones el

establecimiento de las homologías no es tan directo. De hecho, los problemas de alineamiento de las secuencias ribosomales son una crítica habitual a su uso en filogenia. Este problema se ha intentado minimizar gracias al empleo de las estructuras secundarias de las propias secuencias como criterio adicional para el correcto establecimiento de la homología posicional (Kjer *et al.*, 1994; Kjer, 1995; Coleman, 2007). Aquí empleamos un método reciente de alineamiento múltiple y especialmente desarrollado para aprovechar esta información estructural. A nivel posicional, el alineamiento se ve reforzado por la existencia de CBCs entre las secuencias que lo integran.

#### 4.2.5.2.- Filogenia y sistemática molecular de *Calomela*

La monofilia de las especies de *Calomela* para las cuáles se ha analizado más de un individuo queda demostrada en los análisis derivados de la matriz de marcadores combinados, exceptuando a la especie *C. ioptera* en el análisis de máxima verosimilitud. Se ha demostrado que los métodos basados en máxima verosimilitud pueden generar topologías incorrectas cuando las matrices analizadas contienen posiciones indeterminadas no distribuidas al azar a lo largo de todas las particiones del alineamiento, y que además los análisis bayesianos son mucho más robustos ante estos artefactos que los de máxima verosimilitud (Simmons, 2012). Este problema podría afectar a los cuatro ejemplares claramente pertenecientes a *C. ioptera* siguiendo criterios morfológicos, pues para el ejemplar 1 de *C. ioptera* únicamente se obtuvo la secuencia *cox1*, para los ejemplares 2 y 3 tan sólo se logró secuenciar el gen CAD, y para el espécimen 5, que fue el más completo, se obtuvieron las secuencias *cox1*, ITS2 y LSU. Las pruebas estadísticas para evaluar topologías alternativas demostraron que la mejor ubicación filogenética de estos ejemplares es considerarlos como un clado y hermano del de *C. bartoni* y *C. juncta*, lo cual coincide con el resultado obtenido en el análisis bayesiano de marcadores concatenados.

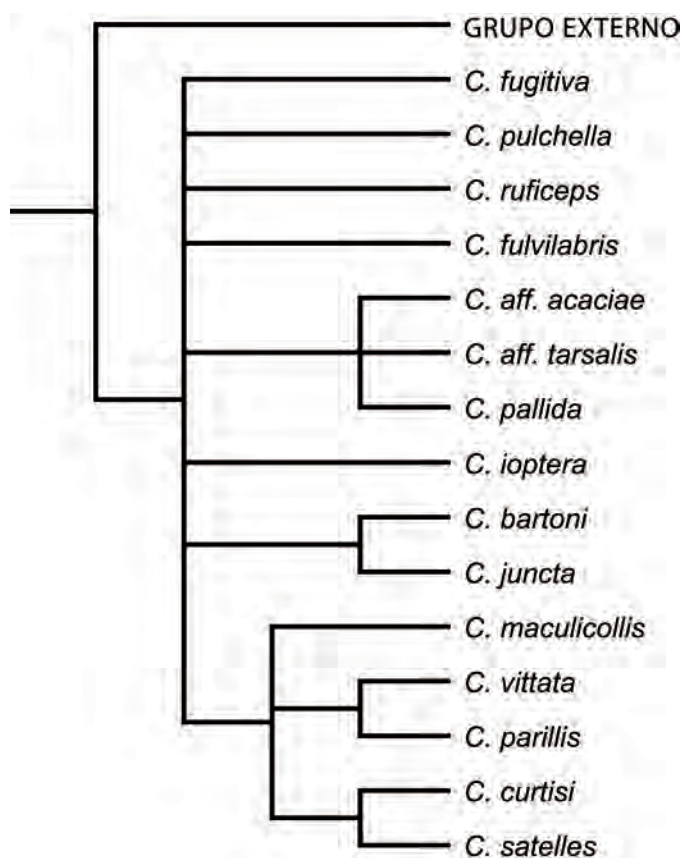
En cuanto a las relaciones entre especies, la topología obtenida a partir de los datos combinados está bien resuelta y soportada para once de sus 14 nodos, incluyendo las relaciones basales de las 15 especies de *Calomela* estudiadas. El árbol recuperado es además compatible con la topología presentada en el capítulo anterior a partir de una combinación diferente de marcadores moleculares (*cox1*, *rrnL*, LSU, EF1a y CAD), y las edades medias estimadas para los linajes de especies son también muy similares en ambos análisis. Los tres nodos donde la capacidad



resolutiva de los marcadores resultó insuficiente (Figura 4.2-40 nodos F, I y K) dibujan una situación muy similar a la recuperada en la filogenia del capítulo anterior, con la salvedad de que en este último análisis la posición de *C. ioptera* (nodo I) se recuperó soportada ( $pp = 0,96$ ) como hermana del par de especies monofiléticas *C. bartoni* y *C. juncta*. La falta de resolución filogenética se atribuye típicamente a episodios cladogenéticos muy cercanos en el tiempo (e.g., Rokas *et al.*, 2005), aunque también se deben considerar otros factores de carácter sistemático como son un muestreo taxonómico inapropiado o la incorrecta elección de modelos evolutivos (Baurain *et al.*, 2007). En el caso que nos ocupa, la elección de los modelos evolutivos se ha realizado siguiendo una metodología objetiva ampliamente aceptada y utilizada por la comunidad filogenética, si bien es cierto que sería interesante diseñar un estudio específico dirigido a evaluar la repercusión de los modelos subóptimos en la filogenia de *Calomela*. En cuanto al muestreo taxonómico, nuestro estudio contempla una fracción del total de especies descritas en el género (15 de 45), lo que podría estar condicionando el nivel de resolución de la filogenia. Es posible por tanto que un muestreo más inclusivo pudiese contribuir a la resolución filogenética de los nodos F y K.

Algunos estudios han utilizado SSRs como caracteres filogenéticos (e.g., Xu *et al.*, 2004; Nishikawa *et al.* 2005; Ulloa *et al.*, 2013). Sin embargo esta práctica ha sido objeto de crítica, principalmente debido a que se trata de secuencias que con frecuencia carecen de homología estructural interna a consecuencia de reorganizaciones rápidas (Hancock y Vogler 2000; Swain y Taylor, 2003). Hancock y Vogler (2000) describieron como las SSRs de la región V4 del gen SSU en *Cicindela* podían evolucionar de modo paralelo en linajes diferentes. Según los autores, el mecanismo de mutación, conocido como deslizamiento compensatorio (*compensatory slippage*), es el que genera las SSRs durante el proceso de replicación del ADN, y esto hace que la homología detectada en estas zonas pueda deberse al propio efecto de dicho mecanismo más que a las relaciones filogenéticas entre las secuencias. En el caso del conjunto de datos ITS2 de *Calomela* es posible identificar el carácter homólogo u homoplásico de las SSRs en función de su distribución sobre filogenias moleculares obtenidas con otros genes diferentes a ITS2. Algunos ejemplos de SSRs homoplásicas serían la repetición (UC)<sub>2</sub> de la posición 14 del dominio A compartida por *C. fugitiva* y *C. fulvilabris*, la SSR (AAUU)<sub>2</sub> de la posición 20 del mismo dominio que es común a *C. fugitiva* y a determinados miembros de *C. ruficeps*, o la secuencia (UG)<sub>2</sub> propia de la posición 490 del dominio D en *C. fugitiva*, *C. pallida* y *C. pulchella*. Y ejemplos de las que consideramos homólogas serían la posición 23 (UA)<sub>2</sub> (dominio A)

entre *C. parilis* y *C. vittata*, o las posiciones 108 [(CGU)<sub>4</sub>, dominio B], 125 [(UC)<sub>2</sub>, dominio B] y 146 [(GCG)<sub>2</sub>, dominio B] entre *C. curtisi* y *C. satelles*, o para linajes más profundos en la filogenia, la posición 227 [(ACGA)<sub>2</sub>, dominios B' y C] propia del clado H de la filogenia en la figura 4.2-40 (Figuras 4.2-10 a 4.2-13; Figura 4.2-16; Tabla 4.2-4). En todo caso, el análisis de parsimonia sobre los datos de ITS2 de *Calomela* (Figura 4.2-71.) pone de manifiesto la existencia de señal filogenética altamente informativa en la matriz SSR, como así lo demuestra la congruencia detectada entre los clados de especies recuperados con este método y los obtenidos mediante los análisis filogenéticos de *cox1*, CAD, LSU, y la matriz combinada de marcadores. En relación al marcador LSU, de las nueve SSRs exclusivas de grupos de especies o especies concretas tan sólo dos son congruentes con determinadas agrupaciones taxonómicas reflejadas en la filogenia recuperada en este trabajo: *C. aff. acaciae*, *C. aff. tarsalis* y *C. pallida* [D2-h3-2, posición 563, (AUG)<sub>2</sub>]; y *C. bartoni* y *C. juncta* [D2-h3-2, posición 601, (CG)<sub>2</sub>]. El resto de repeticiones siguen un patrón que no es congruente con los clados recuperados en la filogenia, lo cual pone de manifiesto la escasa utilidad filogenética de las SSRs de las secuencias LSU.



**Figura 4.2-71.** Árbol consenso estricto de máxima parsimonia obtenido en PAUP a partir de la matriz de repeticiones simples de secuencia en la matriz ITS2 de *Calomela*.

La filogenia molecular de *Calomela* es gran medida congruente con la información ecológica y morfológica disponible. En relación con ello cabe señalar que la especie *C. fugitiva*, la cual está restringida a un primitivo hábitat australiano hoy día representado por bosques pluviales templados pertenecientes al bioma ombroclima húmedo, es el linaje hermano al resto de especies estudiadas (Figura 4.2-40). Entre éstas últimas, la filogenia discrimina dos grupos monofiléticos bien diferenciados. Por un lado se distinguen dos especies de rango un tanto más amplio pero igualmente ligadas a los hábitats de tipo *rainforest*, *C. pulchella* y *C. ruficeps*, y por el otro están el resto de especies, cuya distribuciones están asociadas a los biomas esclerófilo (la mayoría de las especies), árido y monzónico (clados C y D). Uno de los clados de este último linaje es el de *C. aff. acaciae*, *C. aff. tarsalis* y *C. pallida*, tres especies propias de zonas secas caracterizadas por la ausencia de integumento metalizado y que típicamente adquieren una tonalidad pálida tras la desecación (clado E). *C. fulvilabris* es hermana de las especies restantes, y se trata de una especie genuinamente monófaga y con una distribución particular relegada a los cursos fluviales de las planicies del oeste del *Great Dividing Range*. El clado H está integrado por un grupo de especies propias del bioma esclerófilo templado de las costas este y sureste de Australia, entre las cuales el par *C. bartoni* y *C. juncta* representa el proceso de especiación más reciente, y define a dos taxones estrechamente emparentados cuya proximidad taxonómica ya ha sido sugerida previamente en base a la similitud de las genitalias tanto de los machos como de las hembras (Selman, 1979).

La utilidad de la filogenia molecular de *Calomela* como una representación de su evolución también se pone en parte de manifiesto por el hecho de que la distribución de los estados de siete caracteres morfológicos presenta estructura jerárquica. Tres de estos caracteres están relacionados con la morfología pronotal (T3, T4 y T5), otros tres lo están con la elitral (E2, E3 y E4), y el restante tiene que ver con la superficie del último ventrito abdominal en el macho (A1) (Figuras 4.2-72 a 4.2-78). Se trata por tanto de un grupo de caracteres con potencial utilidad sistemática, pues permiten la identificación de linajes monofiléticos a niveles profundos en la filogenia de *Calomela*. En relación con la morfología elitral, resultan especialmente interesantes los caracteres identificados con la superficie de la región posthumeral (carácter E3) y con la morfología del ápice epipleural (E4), ya que ambos delimitan perfectamente a las especies típicas del bioma ombroclima húmedo (*rainforests*) del resto de especies que están adaptadas a sistemas más secos (clado D). Concretamente las especies propias de *rainforest* (*C. fugitiva*, *C. pulchella* y *C. ruficeps*) exhiben para dichos caracteres estados compartidos con el grupo externo (plesiomórficos), y que consisten en tener

una región elitral posthumeral muy deprimida y el ápice epipleural simple, mientras que el resto de especies muestran los estados sinapomórficos asociados a una región elitral posthumeral plana y el ápice epipleural engrosado y retorcido (Figuras 4.2-76 y 4.2-77). La separación entre tales linajes de *Calomela* también está soportada por dos caracteres pronotales: la coloración del pronoto (carácter T4) y del tamaño de su puntuación (carácter T3), y que tan sólo revierten en las especies *C. fulvilabris* y *C. curtisi* (Figuras 4.2-72 y 4.2-73). En este caso los estados primitivos de carácter compartidos con el grupo externo se corresponden con una coloración pronotal metalizada acompañada de puntuaciones finas, mientras que los estados derivados se vinculan a una coloración no metalizada asociada a una puntuación gruesa. Este patrón metalizado se debe a la presencia de reflectores multicapa en el tegumento (Seago *et al.*, 2009), cuya función principal en coleópteros se relaciona con la capacidad de camuflaje entre el follaje al confundirse los escarabajos con gotas de agua (Crowson, 1981; Jackson, 1986; Jackson y Hallas, 1986; Vulinec, 1997; Parker, 1998; Doucet y Meadows, 2009). Se trata de una estrategia particularmente efectiva en ambientes de *rainforest* (Crowson, 1981; Thomas *et al.*, 2007) donde precisamente habitan las especies de *Calomela* con este estado de carácter. Si bien no se dispone de evidencias empíricas, cabría la posibilidad de que la reducción en el grado de metalización corporal en las especies de ambientes esclerófilos estuviese relacionada con la mayor exposición solar y visual a la que están sometidas estas especies, comparada con las condiciones imperantes en el hábitat densamente poblado de vegetación, sombrío y húmedo que caracteriza a los *rainforests*. El tercer carácter pronotal con estructura jerárquica en la filogenia describe la forma del pronoto en su porción anterior, que está expandido en las especies del clado H, mientras que está estrechado o sus márgenes son paralelos en el resto de especies (Figura 4.2-74). Se trata de un carácter taxonómicamente muy útil en *Calomela* que tiene la capacidad de identificar un linaje monofilético de especies a un nivel filogenético profundo.

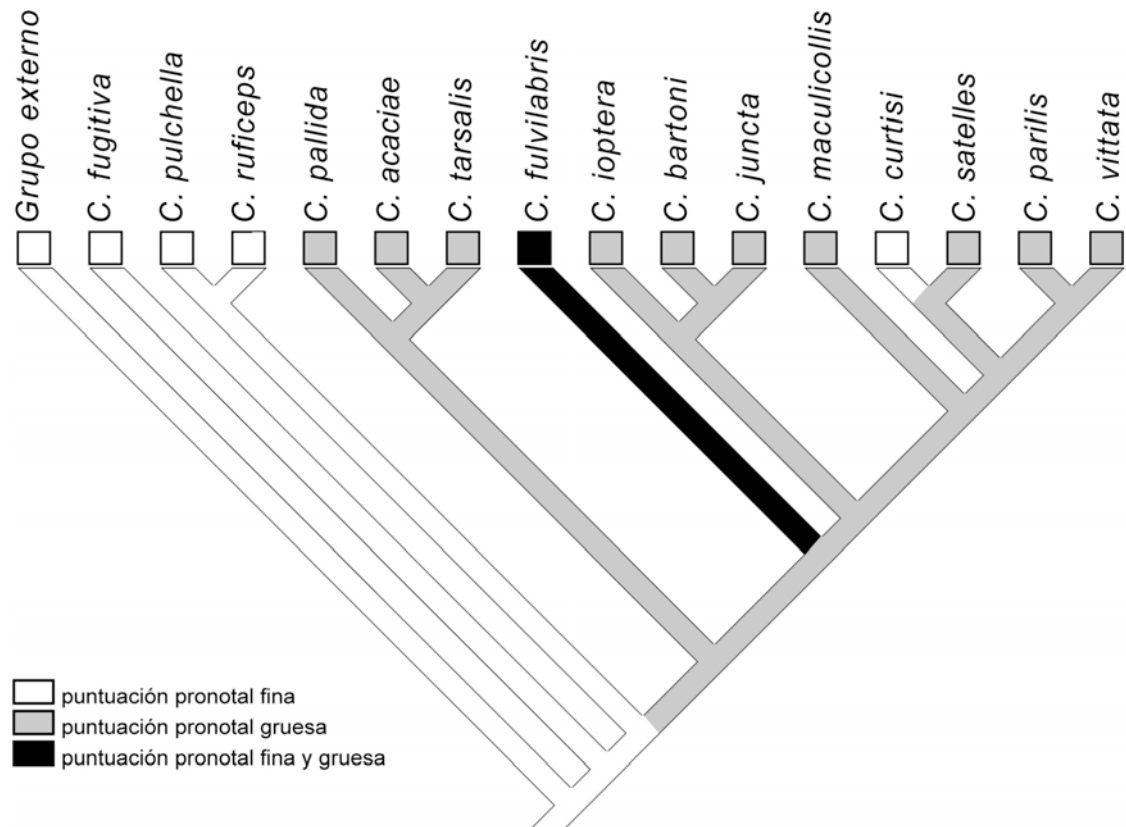


Figura 4.2-72. Transformación del carácter "puntuación pronotal" sobre la filogenia molecular.

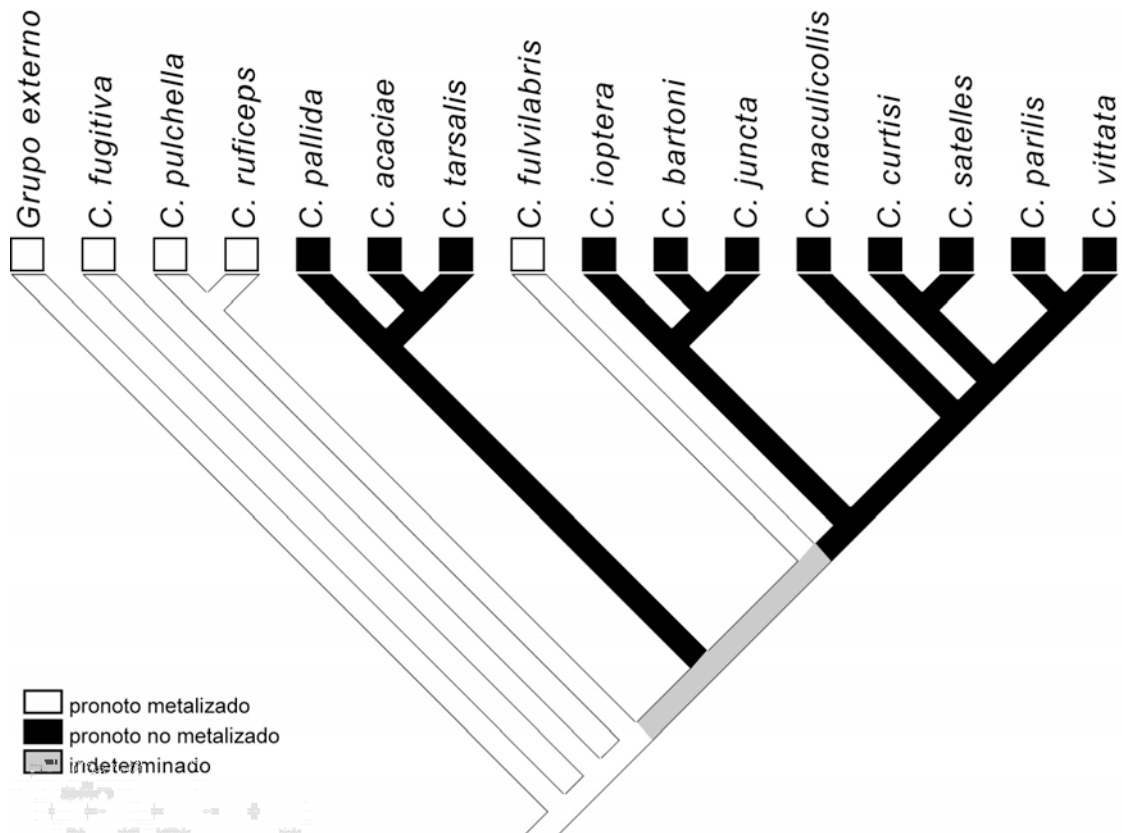


Figura 4.2-73. Transformación del carácter "coloración pronotal" sobre la filogenia molecular.

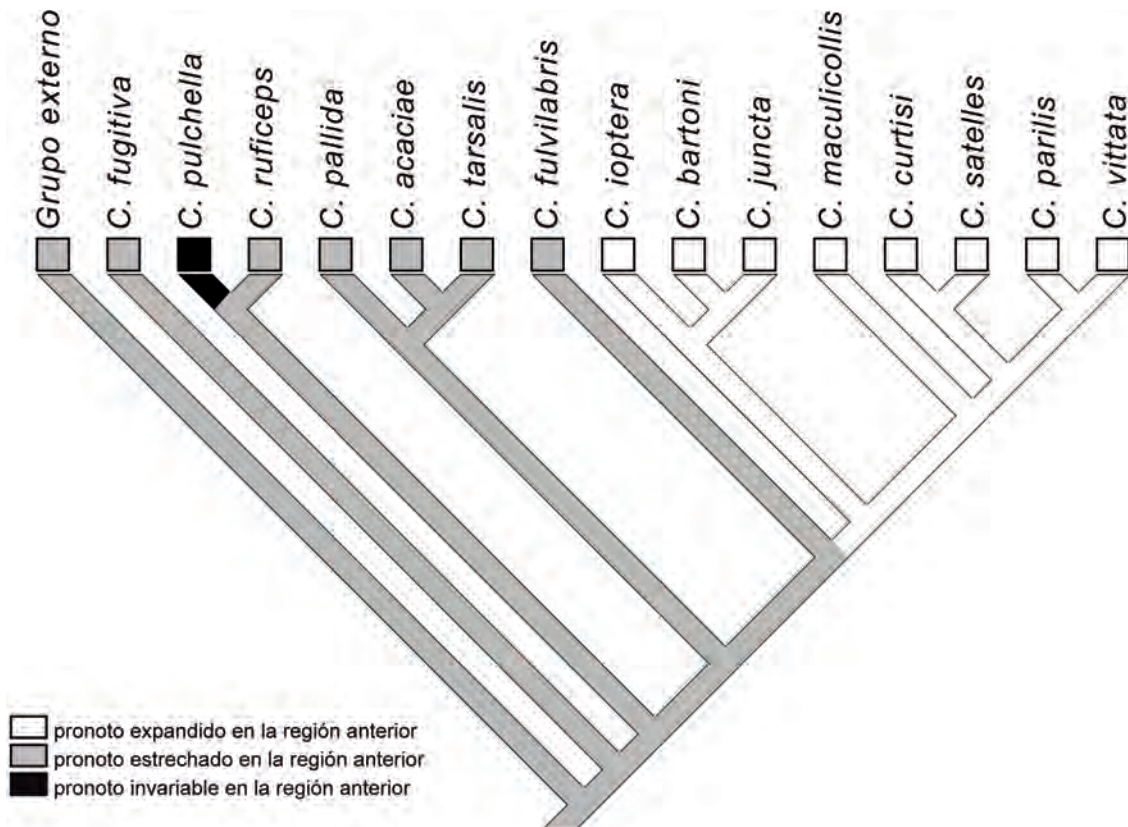


Figura 4.2-74. Transformación del carácter "forma pronotal" sobre la filogenia molecular.

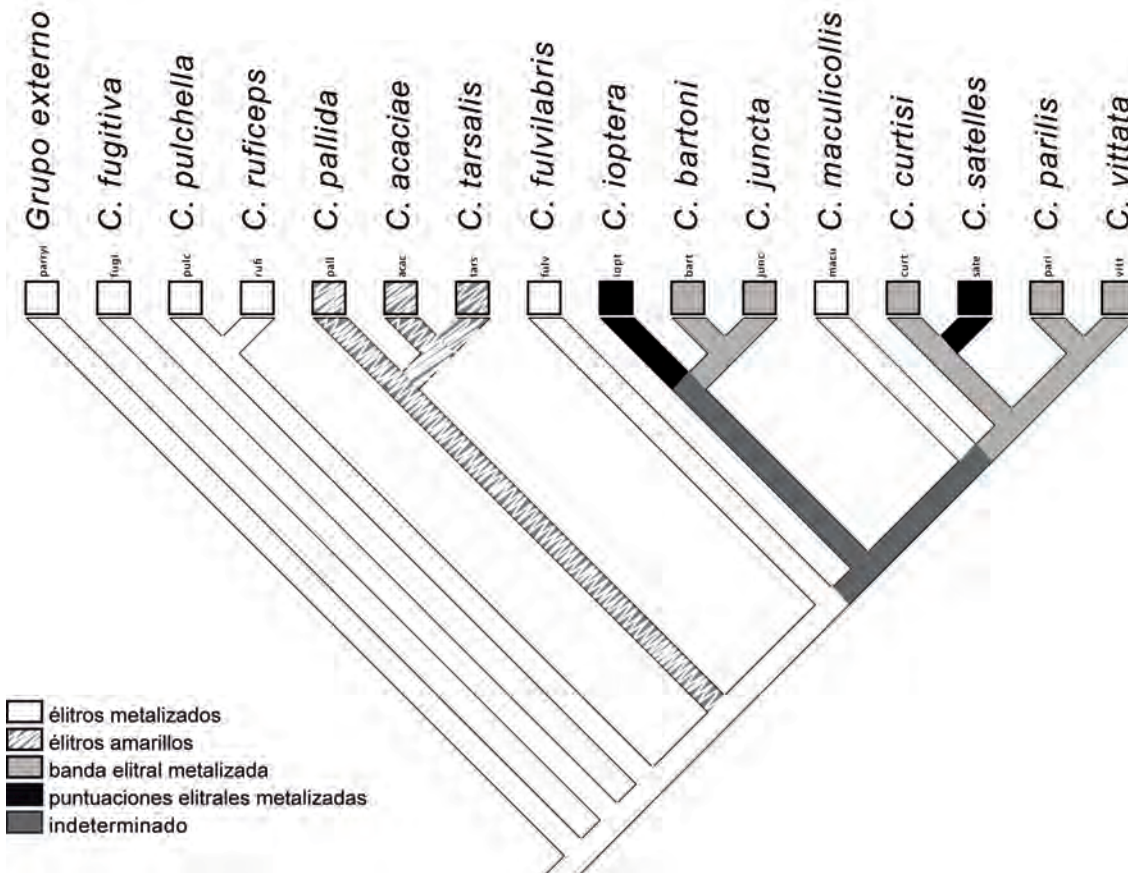


Figura 4.2-75. Transformación del carácter "coloración elitral" sobre la filogenia molecular.

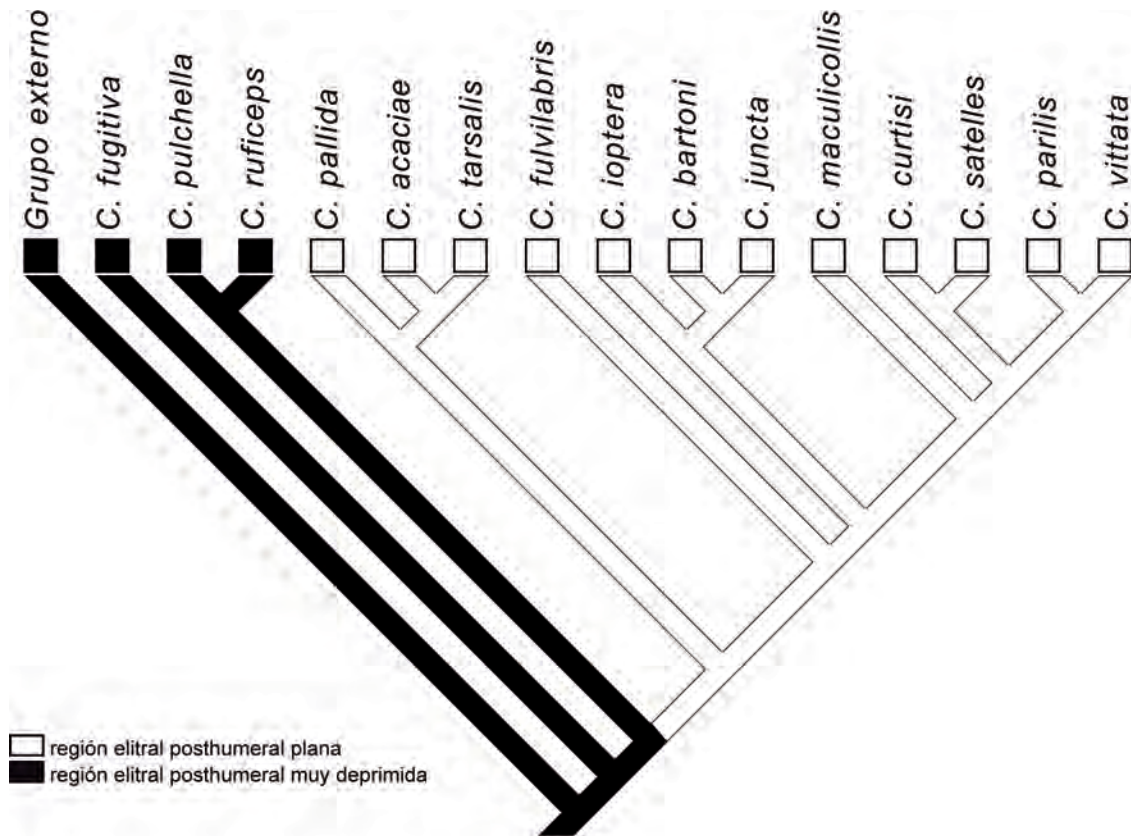


Figura 4.2-76. Transformación del carácter "superficie eltral en la zona posthumeral" sobre la filogenia molecular.

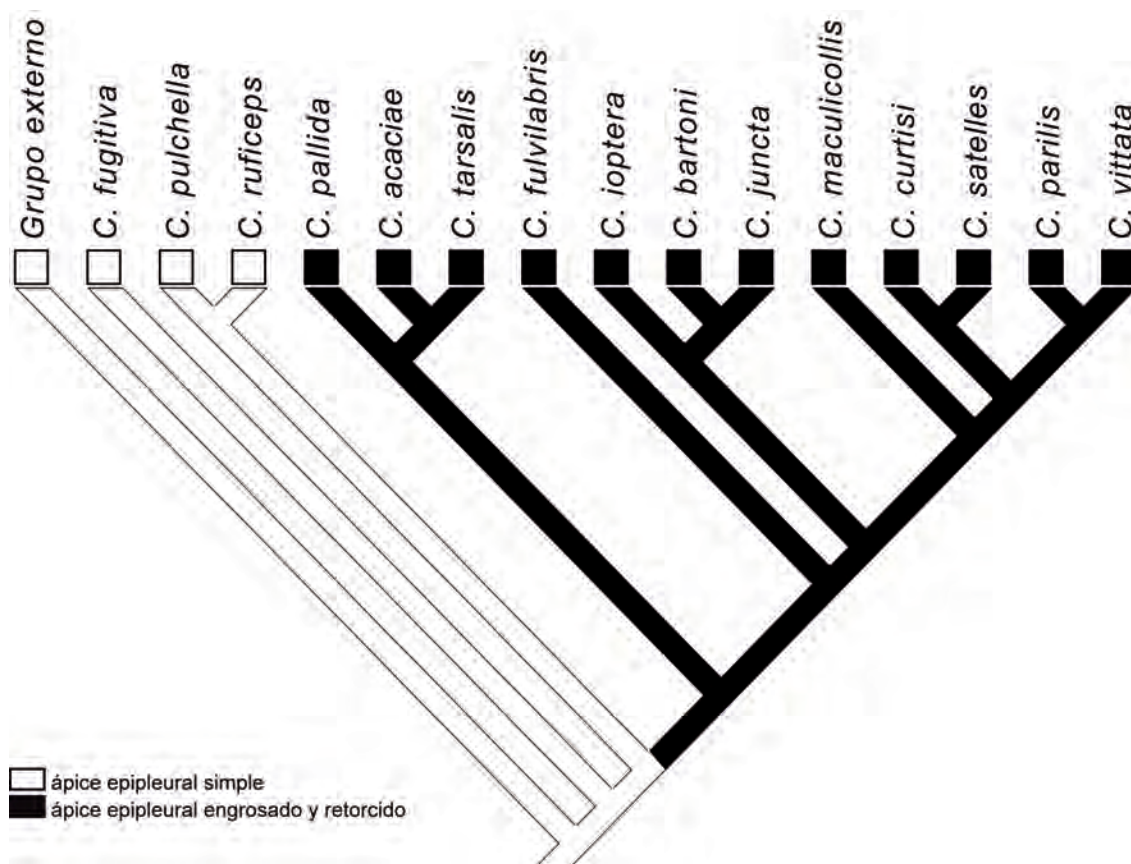
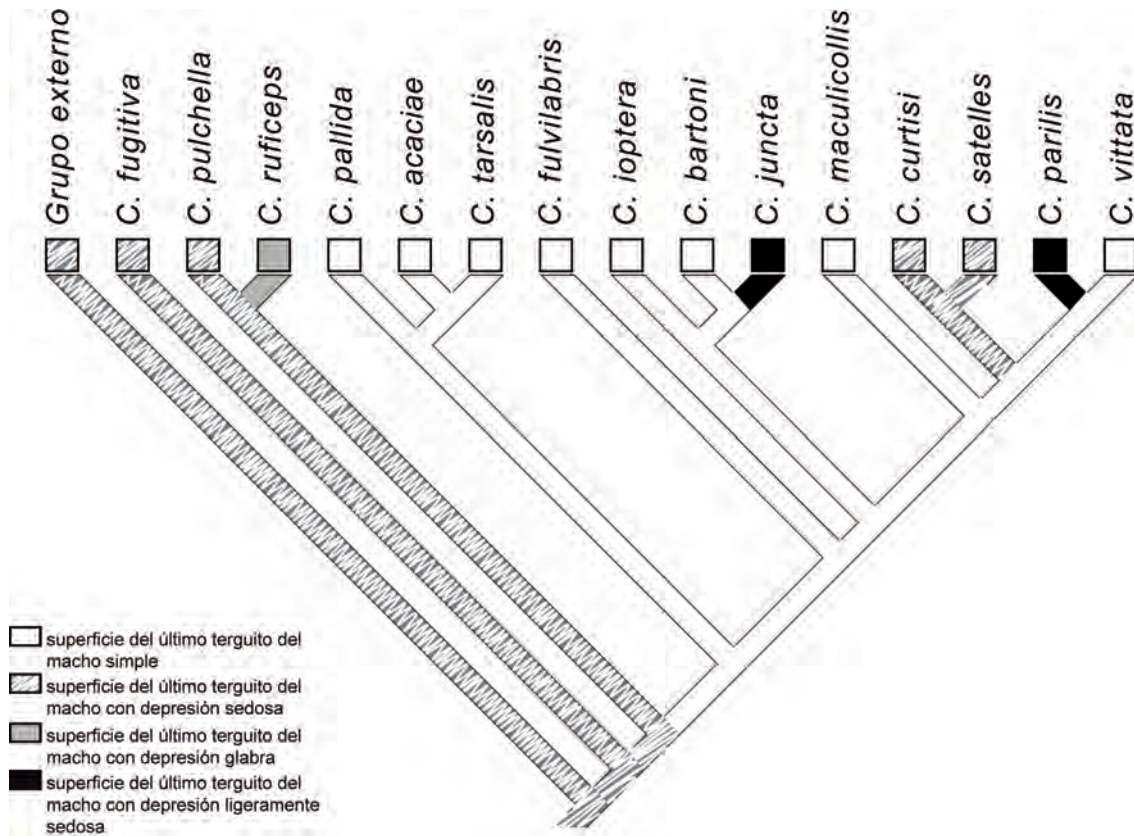


Figura 4.2-77. Transformación del carácter "ápice epiplaural" sobre la filogenia molecular.



**Figura 4.2-78** Transformación del carácter "superficie del último terguito del macho" sobre la filogenia molecular.

Además de estos caracteres categóricos, también se ha analizado un carácter cuantitativo cuya distribución ha resultado estar correlacionada con la filogenia molecular. Se trata de la forma corporal de las especies entendida como la relación entre la anchura del pronoto en su margen posterior y la longitud del cuerpo desde el margen anterior del pronoto hasta el ápice de los élitros (carácter H1). En otras palabras, cómo de redondeadas o de alargadas son las distintas especies de *Calomela*. La figura 4.2-68 muestra los estados actuales del carácter en las diferentes especies y la reconstrucción de sus estados ancestrales bajo el criterio de parsimonia. Puede observarse como la evolución de *Calomela* va acompañada de un gradiente progresivo que tiende a la generación de formas corporales cada vez más alargadas a partir de formas plesiomórficas redondeadas compartidas con el grupo externo. El solapamiento de los estados del carácter entre grandes clados es mínimo, por lo que en muchos casos la forma corporal podría ser utilizada para determinar grupos monofiléticos de especies e identificar su ubicación sistemática. La principal excepción a este patrón se corresponde con la especie *C. aff. tarsalis*, que presenta una forma corporal inusualmente redondeada con relación a las demás especies de su clado. En general, parece que las especies de *Calomela* propias de los bosques pluviales exhiben formas corporales más redondeadas, mientras que las especies de ambientes



más secos, tienden a ser alargadas. En este sentido pueden plantearse múltiples explicaciones todas ellas de carácter especulativo ya que no se dispone de evidencias empíricas que las sustenten. Como se ha discutido líneas arriba, las especies de *rainforest* típicamente son metalizadas, lo que combinado con una forma corporal convexa conferiría una mayor capacidad críptica en un entorno vegetal permanentemente cubierto por gotas de agua. Otra de las posibles explicaciones hipotéticas estaría relacionada con el comportamiento volador y la fisiografía del hábitat, que en las especies de *Calomela* redondeadas consiste en la realización de vuelos cortos entre árboles cercanos en el ambiente umbrío del *rainforest*, mientras que las especies alargadas de los ambientes esclerófilos realizan vuelos mucho más largos en condiciones expuestas (CAM Reid, comunicación personal). En este sentido, se sabe que las formaciones esclerófilas de *Acacia* donde habitan las especies de *Calomela* requieren y promueven los incendios forestales (Jackson, 1968), lo que supone un escenario evolutivo en el que las adaptaciones al vuelo de los insectos adquieren mucha más relevancia (Wikars, 1997). Por otro lado, nuestros análisis poblacionales ponen de manifiesto un patrón de correlación entre la distancia a la que se han encontrado haplotipos idénticos de una misma especie y la forma corporal de dicha especie (redondeada o alargada). Las especies *C. juncta* y *C. parilis* presentan haplotipos compartidos entre poblaciones muy distantes (221 y 120 Km, respectivamente), al tiempo que se encuentran entre las especies con menores índices de anchura/longitud (0,42 y 0,46, respectivamente). Por el contrario, las especies *C. fugitiva*, *C. pallida* y *C. ruficeps*, con haplotipos compartidos separados respectivamente por 33-77, 63 y 75 Km, presentan formas más redondeadas (índices: 0,61, 0,48 y 0,52). Otra evidencia adicional en este sentido está representada por los resultados significativos obtenidos en el test de Mantel, que demuestran la existencia de aislamiento genético por distancia geográfica entre determinadas poblaciones de tres de las especies más redondeadas de nuestro conjunto muestral: *C. fugitiva*, *C. pulchella* y *C. ruficeps*. Tal ausencia de flujo génico aparece igualmente reflejada en los valores de las distancias  $F_{ST}$  entre las poblaciones, que se sitúan en el rango 0,54 - 0,92, muy superior al valor nulo que cabría obtener en un escenario de panmixia y también por encima del umbral establecido de 0,25 por encima del cual se pueden asumir niveles de aislamiento (Gupta, 2007).

Nuestro análisis morfológico revela además que determinados caracteres clásicamente empleados en la sistemática de *Calomela* no presentan estructura filogenética (Tabla 4.2-20). Entre estos caracteres se incluye la morfología de las uñas, que en *Calomela* pueden ser simples, bífidas, dentadas o apendiculadas, y que fue

utilizada tanto por Selman (1975, 1976, 1977, 1979) como por Daccordi (1994) para segregarse las especies en varios géneros. Uno de estos es *Strycea*, representado en la hipótesis filogenética molecular por las especies *C. aff. acaciae* y *C. fulvilabris*, y cuyas relaciones filogenéticas revelan la naturaleza polifilética del carácter que las agrupaba. La filogenia molecular de *Calomela* refuerza por tanto la decisión de Reid (2006) de sinonimizar *Strycea* (y los otros géneros propuestos por Selman y Daccordi) con *Calomela*.

#### 4.2.5.3. - Taxonomía molecular de *Calomela*

Actualmente existen dos aproximaciones diferentes de cara a la identificación molecular de organismos a partir de secuencias de ADN: la taxonomía basada en secuencias de ADN (*DNA taxonomy*; Tautz *et al.*, 2003) y el sistema de códigos de barras de secuencias de ADN (*DNA barcoding*; Hebert *et al.*, 2003). La primera de ellas establece la identidad de los taxones estudiados a partir de la ubicación sistemática de sus respectivas secuencias en el contexto de un análisis filogenético, mientras que la segunda hace lo propio a partir de comparaciones típicamente fenéticas entre la secuencia problema y una base de datos de secuencias de taxonomía conocida.

Desde el punto de vista de la taxonomía basada en secuencias de ADN, el carácter taxonómico diagnóstico de los marcadores secuenciados en las especies de *Calomela* puede ser explorado contrastando los árboles filogenéticos obtenidos frente a la taxonomía clásica basada en caracteres morfológicos. Así, en el caso de *cox1*, se puede comprobar que todas las especies con más de un individuo estudiado se recuperaron formando clados monofiléticos discretos muy bien soportados, y que además mostraron unos niveles de divergencia elevados ( $d_{\min\_inter} / d_{\max\_intra}$  promedio de 4,9). Estos resultados denotan la capacidad del marcador *cox1* para establecer de forma clara e inequívoca la identificación taxonómica de secuencias en *Calomela* en un contexto filogenético. Además, *cox1* presenta la ventaja de que, al tratarse de un marcador codificante para proteína, el alineamiento previo al análisis filogenético es directo, lo que sumado al elevado éxito obtenido en las fases de amplificación por PCR y secuenciación le confieren un atractivo aún mayor en este sentido. CAD muestra niveles de divergencia similares a los de *cox1*, y la resolución y el soporte de los árboles filogenéticos permite igualmente la identificación de las especies con más de un individuo analizado, salvo en el caso de las especies hermanas *C. bartoni* y *C.*

*juncta* donde se detectaron secuencias compartidas. Esto pone de relieve la incapacidad resolutoria de CAD en casos de especies poco divergentes, al menos en el marco de la taxonomía actual de *Calomela*. Por su parte, el análisis filogenético de las secuencias ITS2 también permite la recuperación inequívoca de los clados monofiléticos de todas las especies morfológicas de *Calomela*. Esto está relacionado con el elevado grado de conservación detectado en sus secuencias a nivel intraespecífico, y con los altos niveles de divergencia interespecífica, que se traducen en una razón  $d_{\text{min\_inter}} / d_{\text{max\_intra}}$  que cuadruplica a la obtenida para *cox1*. Sin embargo, la utilización de secuencias ITS2 también conlleva desventajas. Entre las más destacadas se citan la posibilidad de incluir en los análisis copias pseudogénicas y la dificultad que entraña su correcto alineamiento. Existen evidencias suficientes para considerar que las secuencias de ITS2 usadas aquí son funcionales, por lo que la primera objeción no es muy preocupante respecto a su potencial utilidad en la identificación molecular de especies en *Calomela*. Con relación al alineamiento de estas secuencias, el empleo de técnicas basadas en sus estructuras secundarias le otorga bastante fiabilidad, además de objetividad (Mai y Coleman, 1997; Coleman, 2003; Schultz y Wolf, 2009). Otra característica desfavorable de ITS2 en estudios taxonómicos de *Calomela* alude al porcentaje relativamente bajo de éxito en las etapas de amplificación por PCR y secuenciación (79%). Esta no parece ser la regla en otros organismos (*e.g.*, Mtambo *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010), por lo que es posible que exista un problema de baja especificidad de los cebadores universales al usarlos con *Calomela*. El diseño de cebadores específicos a partir de las secuencias de *Calomela* ya obtenidas debería aumentar el éxito en las fases de amplificación y secuenciación de ITS2 en estas especies. Por otro lado, los árboles filogenéticos obtenidos a partir del marcador LSU posibilitan la identificación de clados monofiléticos de especies, si bien para algunas de ellas carece de capacidad resolutoria (*C. bartoni*, *C. juncta*, *C. ruficeps*), lo que limita mucho su utilización. Finalmente, el análisis filogenético combinado de los cuatro marcadores permite la asignación taxonómica inequívoca de las especies de *Calomela* con más de un ejemplar estudiado, a excepción de *C. ioptera* cuya monofilia no se recupera en el análisis de máxima verosimilitud y que ya se discutió en el anterior apartado. En resumen, podemos concluir que el análisis de los cuatro marcadores combinados es una estrategia efectiva para la identificación taxonómica molecular de especies de *Calomela*.

A partir de nuestros datos también es posible la exploración de una aproximación de tipo fenético comparable a la utilizada en el ámbito del *DNA barcoding*, como sistema de identificación molecular específico para el género

*Calomela*. Conviene tener en cuenta que, al carecer de una base de datos previa de secuencias de ADN de *Calomela* para estos mismos marcadores, cualquiera de las consideraciones que aquí se presentan se basan en una representación parcial del número total de especies conocidas, de modo que cabría la posibilidad de que la adición de nuevas especies alterase el carácter diagnóstico de los marcadores seleccionados, o dicho de otro modo, que las firmas moleculares aquí descritas no sean exclusivas de las especies incluidas en el presente estudio. Analizados bajo esta aproximación, nuestros datos demuestran que cada marcador estudiado posee unas características diferenciales que condicionan su idoneidad (Tabla 4.2-21).

	éxito en PCR y secuenciación	alineamiento	$d_{\max\_intra}$ promedio ( $\pm$ desv. est.)	$d_{\min\_inter}$ promedio ( $\pm$ desv. est.)	<i>barcoding gap</i> promedio ( $\pm$ desv. est.)	secuencias compartidas entre especies
<i>cox1</i>	0.89	directo	0.0217 ( $\pm$ 0.0153)	0.1067 ( $\pm$ 0.0246)	4.9 ( $\pm$ 1.6083)	no
ITS2	0.79	indels	0.0022 ( $\pm$ 0.0039)	0.0405 ( $\pm$ 0.0326)	18.7 ( $\pm$ 8.3796)	no
CAD	0.81	directo	0.0075 ( $\pm$ 0.0089)	0.0361 ( $\pm$ 0.0255)	4.8 ( $\pm$ 3.3986)	si
LSU	0.82	indels	0.0006 ( $\pm$ 0.0009)	0.0039 ( $\pm$ 0.0031)	6.5 ( $\pm$ 3.5638)	si

**Tabla 4.2-21.** Análisis de las características de cada marcador molecular de cara a su empleo en la identificación molecular de especies en *Calomela*. Abreviaturas:  $d_{\max\_intra}$ : divergencia máxima intraespecífica;  $d_{\min\_inter}$ : Divergencia mínima interespecífica.

En relación al fragmento de *cox1* estudiado, los resultados obtenidos demuestran que es muy útil para la identificación de especies en *Calomela*. Su divergencia exhibe un *barcoding gap* claro entre especies definidas *a priori* sin existir secuencias compartidas entre especies (Figura 4.2-61; Figura 4.2-56; Figura 4.2-57). La utilidad de este marcador molecular en la identificación de especies está ampliamente demostrada ya que se trata del gen establecido por el *Consortium for the Barcode of Life* como marcador *barcoding* estándar en animales (Hanner, 2009), si bien en nuestro caso hemos secuenciado una región diferente y no solapante (extremo 3'), comúnmente utilizada en estudios filogenéticos de escarabajos del suborden Polyphaga (Hunt *et al.*, 2007), y que ha demostrado tener unas propiedades como marcador *barcoding* que no son inferiores a las de la región estándar (Roe y Sperling, 2007). Por lo que se refiere a la región CAD, una de sus características más interesantes se relaciona con su bajo nivel de divergencia intraespecífica, que en algunas especies incluso llega a ser nula (*C. fulvilabris*, *C. ioptera* o *C. pulchella*). Además su  $d_{\min\_inter}$  es relativamente alta en todas las comparaciones, lo que como se ha discutido líneas arriba, favorece la existencia de un *barcoding gap* de dimensiones muy similares a las detectadas en *cox1* (Figura 4.2-56). Esto hace que se puedan

asignar secuencias CAD a una especie concreta de *Calomela* con un elevado grado de fiabilidad (Figura 4.2-58; Figura 4.2-62). Sin embargo, la existencia de secuencias CAD compartidas por *C. bartoni* y *C. juncta* sugiere que debería ser utilizado en todo caso como marcador complementario pero nunca como única región a explorar. En cuanto al marcador ITS2, su utilidad en la identificación molecular de especies ha sido demostrada en un amplio grupo de organismos, incluyendo animales (Prasad *et al.*, 2009; Wiemers *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010), plantas (Chen *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010; Pang *et al.*, 2010) y especialmente hongos (Seifert, 2009). Entre las propiedades útiles de este marcador para discriminar especies de *Calomela* cabe destacar el elevado grado de similitud de las secuencias a nivel intraespecífico, máximo para cinco de las especies (*C. bartoni*, *C. fugitiva*, *C. pallida*, *C. parilis* y *C. pulchella*), y que puede atribuirse a la evolución concertada de estas secuencias en el genoma (Walsh y Stephan, 2001). Esta particularidad, combinada con una divergencia interespecífica relativamente elevada, determina un *barcoding gap* muy amplio, como ya se ha mencionado (Figura 4.2-56; Figura 4.2-59; Figura 4.2-63). Así, la utilidad de ITS2 para discriminar especies de *Calomela* se pone de manifiesto en su capacidad para detectar diferencias entre el par de especies menos divergente incluido en nuestro análisis, *C. bartoni* y *C. juncta*, distanciadas entre sí por una divergencia interespecífica mínima de 0,83%. En lo que respecta a las repeticiones simples de secuencias en ITS2, su rápida evolución y su dinámica de degradación y homogeneización hace posible su utilización como marcadores diagnósticos de especie (Trizzino *et al.*, 2009). En *Calomela* se han detectado 17 firmas moleculares exclusivas de determinadas especies. Además, en todos estos casos, las SSRs diagnósticas están compartidas por la totalidad de los ejemplares estudiados. Se ha demostrado que los cambios de base compensatorios, y en particular los que se observan en regiones ITS, son también una herramienta muy útil a la hora de identificar especies separadas por incompatibilidad sexual (Coleman 2000, 2003, 2009; Coleman y Vacquier, 2002, Müller *et al.*, 2007, Ruhl *et al.*, 2010), probablemente debido a la correlación existente entre las tasas mutacionales de los genes que controlan las interacciones gaméticas y los CBCs en las regiones conservadas de los dominios C y D<sub>1</sub> en ITS2 (Coleman 2000, 2009). Los CBCs asociados a tales regiones en las secuencias ITS2 de *Calomela* (Tabla 4.2-6) corroboran la separación taxonómica basada en criterios morfológicos de las especies del género. De todos modos, la ausencia de CBCs entre dos taxones de *Calomela* no necesariamente indica que ambos representen una misma especie, pues existen datos empíricos que demuestran que este tipo de mutaciones tan sólo ocurre en tres de cada cuatro ocasiones (Müller *et al.*, 2007). De hecho, hay casos en los que la distancia partrística

entre dos especies de *Calomela* es máxima y sin embargo no se detecta ningún CBC entre ellas (e.g., *C. curtisi* vs. *C. aff. tarsalis*). Sin embargo, la detección de CBCs compartidos entre estructuras secundarias depende en gran medida del grado de divergencia entre las mismas y de la longitud de las secuencias que las integran, es decir, si se dispone de la secuencia completa o de un fragmento de la misma (Müller *et al.*, 2007). Esto último podría explicar el bajo número de CBCs que se han recuperado en las comparaciones que implicaban a las especies *C. ioptera* y *C. maculicollis*, pues para éstas no se consiguió secuenciar una porción del extremo 5' de ITS2, imposibilitando la inferencia del plegamiento estructural de sus respectivos dominios D<sub>1</sub>. A pesar de ello, los resultados obtenidos permiten establecer una correlación positiva significativa entre el número de CBCs y la divergencia evolutiva de las especies de *Calomela* (Figura 4.2-15), corroborando el patrón descrito por Müller *et al.* (2007) a niveles taxonómicos superiores. Todo lo anterior sitúa al marcador ITS2 como una región a tener en cuenta para la identificación molecular de especies de *Calomela*. Por su parte, LSU es el marcador filogenéticamente menos informativo de los cuatro incluidos en nuestro estudio, aunque sin embargo su región D1-D2 está considerada como una fracción del genoma con gran potencial discriminatorio en el ámbito de la identificación molecular de especies (Sonnenberg *et al.*, 2007). Esta propiedad está muy relacionada con el proceso de evolución concertada aludido líneas arriba para ITS2 y al que también están sometidas las secuencias LSU, lo que significa que las diferencias mutacionales en las secuencias LSU podrían considerarse como un carácter informativo capaz de delinear nuevos grupos (Sonnenberg *et al.*, 2007). No obstante, a diferencia de ITS2, las repeticiones simples de secuencias en LSU fijadas en especies de *Calomela* son muy escasas, de modo que su valor diagnóstico es muy reducido. En nuestro conjunto de datos LSU se han observado 35 posiciones que varían, 17 de las cuales representan mutaciones diagnósticas de especies de *Calomela* (Tabla 4.2-7). Se trata de mutaciones fijadas en la especie, y que en muchos casos tendrían repercusión a nivel molecular. Todas menos dos están implicadas en CBCs o hemi-CBCs, llegando en algunos casos incluso a provocar alteraciones estructurales en el patrón de plegamiento secundario (Figura 4.2-18). La exclusividad de los cambios mutacionales a nivel específico es tal que permite asociar correctamente a cualquiera de los ejemplares analizados en el estudio con una especie concreta de *Calomela*. Esto está promovido por la existencia en nuestros datos de una reducida divergencia intraespecífica (prácticamente del 0%), acompañada de un distanciamiento mínimo interespecífico comparativamente elevado. Dicha situación favorece la existencia de un *barcoding gap* con un valor promedio de 6,5, por encima del recuperado para *cox1* y CAD. Esta propiedad de las secuencias

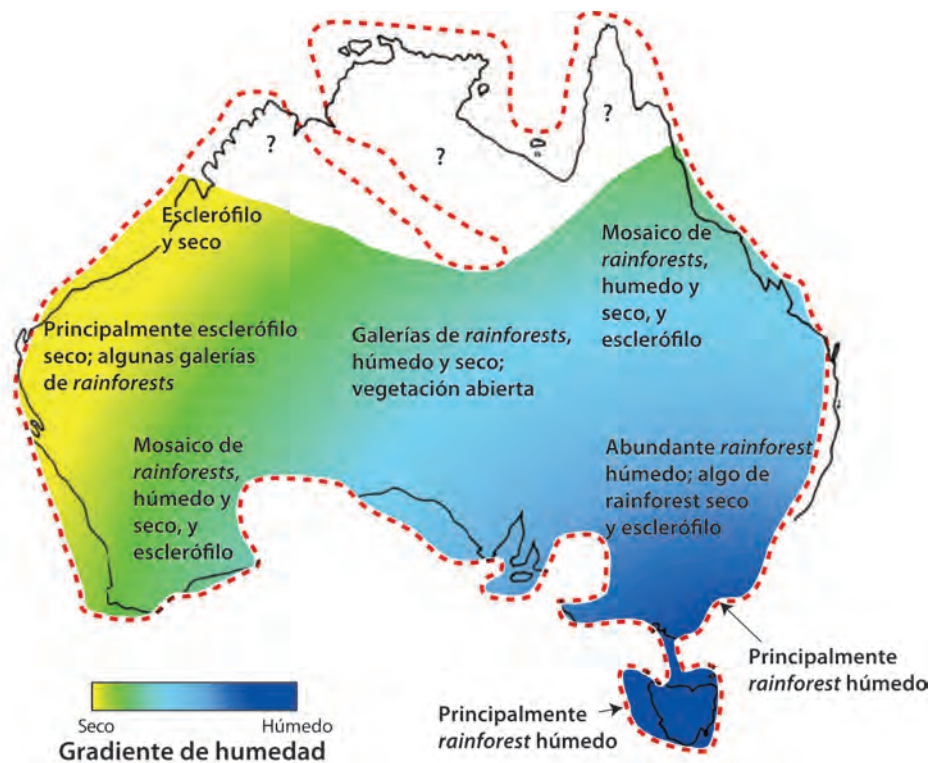
LSU se refleja en las figuras 4.2-56, 4.2-60 y 4.2-64. No obstante, y al igual que sucede para el marcador CAD, especies que han divergido muy recientemente (como el caso de *C. bartoni* y *C. juncta*) no pueden diagnosticarse con LSU, lo cual representa una limitación de la utilidad de este marcador como región *barcoding*. En todo caso, lo que parece claro es que la existencia de variación sustancial entre secuencias LSU es indicativa de separación entre especies, mientras que la ausencia de divergencia no necesariamente ha de ser sinónima de pertenencia a una misma especie. Por todo ello, y siguiendo la línea de discusión de Sonnenberg *et al.* (2007), podemos establecer que las secuencias LSU son de gran utilidad en la identificación molecular de especies en el género *Calomela*, recomendándose su empleo como marcador complementario a otras regiones.

#### 4.2.5.4.- Evolución de *Calomela*

Manteniendo siempre un cierto grado de cautela debido a la parcialidad del muestreo disponible, los valores no significativos obtenidos en las pruebas  $\chi^2$  y MCCR sugieren que no existen evidencias a favor de una aceleración temprana en la tasa de diversificación en *Calomela*. Sin embargo, los datos no se ajustan tampoco a una tasa de diversificación de tipo constante (Pybus y Harvey, 2000), en parte quizás por la elevada sensibilidad del estadístico y respecto a las tasas de diversificación recientes, y a su potencial incapacidad a la hora de detectar episodios tempranos de diversificación (Fordyce, 2010). La variación temporal en la tasa de diversificación de *Calomela* se pone de manifiesto en la gráfica de linajes a través del tiempo, donde la curva obtenida puede segmentarse en dos tramos consecutivos con sendos modelos de diversificación dependiente de la densidad, cada uno de ellos con sus propios parámetros (Figura 4.2-45).

El modelo logístico dependiente de la densidad asume que la tasa de especiación es inversamente proporcional al número de especies existentes en cualquier momento, hasta alcanzar un límite  $K$  en cuanto a número de linajes análogo al parámetro “capacidad de carga” utilizado en el área de la ecología de poblaciones (Rabosky, 2006b). Este patrón de diversificación rápida inicial seguida de una desaceleración de la tasa en el tiempo representa uno de los procesos más comúnmente detectados (Harmon *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2003; Rabosky y Lovette, 2008b), y se han propuesto dos posibles causas ecológicas para explicarlo (Rabosky y Lovette, 2008a). Una de las explicaciones tiene que ver con la oportunidad ecológica

que brindaría una abundancia inicial de recursos en ausencia de especies competidoras, lo que facilitaría una rápida diversificación inicial que se iría desacelerando con el tiempo a medida que el nicho ecológico se fuera saturando (Walker y Valentine, 1984; Nee *et al.*, 1992; Phillimore y Price, 2008). La segunda causa estaría relacionada con un incremento de las tasas de extinción durante las radiaciones evolutivas (Ricklefs y Cox, 1972). Se trata de dos procesos difíciles de distinguir a partir de datos filogenéticos, ya que la tasa neta de diversificación es la diferencia entre las tasas de especiación y de extinción, de modo que un incremento en la tasa de extinción podría tener el mismo efecto que un decremento en la tasa de especiación (Rabosky y Lovette, 2008b). En la historia evolutiva de *Calomela* se puede apreciar una primera etapa de diversificación logística que comienza hacia el final del Oligoceno (hace 25 Ma), un periodo caracterizado en el continente australiano por un clima húmedo y frío, y donde abundaba la vegetación de tipo *rainforest* (Martin, 2006) en coexistencia con las primeras formaciones de vegetación esclerófila (polen fósil de *Acacia* hace 23 Ma: Macphail y Hill, 2001; Byrne *et al.*, 2011) (Figura 4.2-79).

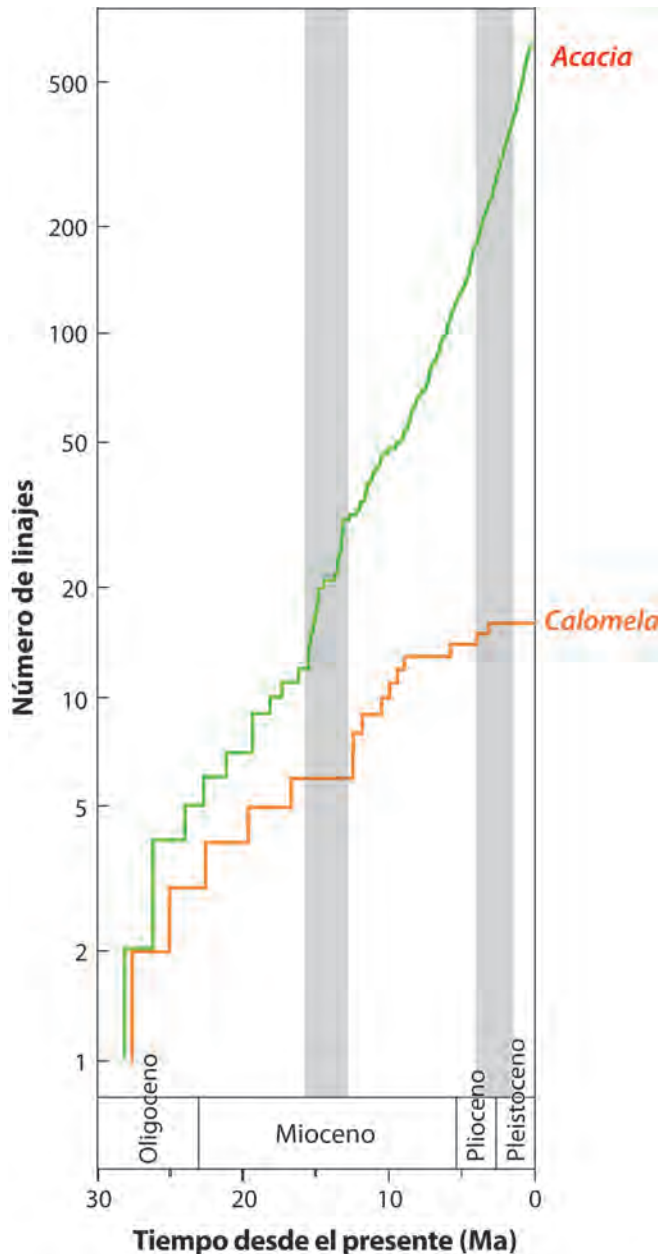


**Figura 4.2-79** (Modificada a partir de Crisp y Cook, 2013, fig. 6). Reconstrucción de la vegetación australiana en la transición Oligoceno-Mioceno (hace aprox. 23 Ma). La línea blanca continua se corresponde con la línea de costa actual, la línea roja punteada muestra la línea de costa en el Mioceno temprano. Los *rainforests* húmedos están caracterizados por *Nothofagus*, los *rainforests* secos por *Araucariaceae*, la vegetación esclerófila abierta por eucaliptos, y la tierra seca por *Asteraceae* y *Poaceae*. El mapa se ha elaborado a partir de registros de polen fósil de 12 localidades muy distantes, apenas hay datos para la mayoría del continente. Basada en Kershaw *et al.* (1994) y Macphail (2007).



Este escenario se ve reflejado en los nodos basales de nuestra inferencia filogenética de los biomas ancestrales, para los cuales se recuperó una asociación con ambos tipos de formaciones vegetales (Figura 4.2-69 nodos A y B). A partir de ese periodo, y hasta hace aproximadamente 10 Ma, tuvo lugar un episodio de cambio climático hacia un ambiente más seco y estacional (Hill, 1994), marcado por la reducción de los *rainforests* a pequeños parches y por la expansión progresiva de las formaciones vegetales esclerófilas (Crisp *et al.*, 2004; Hill, 2004; Byrne *et al.*, 2011). Este proceso de cambio climático coincide, en gran medida, con la desaceleración de la tasa de diversificación en *Calomela*, que según nuestras estimas se extendió hasta el Mioceno medio (hace 12 Ma). Aunque se ha documentado que la contracción de los *rainforest* provocó la extinción de grandes grupos animales asociados a estos sistemas (*e.g.*, familias enteras de mamíferos hace 26-23 Ma; Archer *et al.*, 1999), los resultados obtenidos en nuestro análisis de modelos de tasas de especiación y/o extinción variables otorgan mayor importancia a la desaceleración de las tasas de especiación que al incremento de la extinción con el tiempo. En este sentido, la hipótesis de la diversificación rápida inicial asociada a una oportunidad ecológica es compatible con el escenario de cambio climático que promovió la formación del bioma esclerófilo entre el que se encontraban las acacias, y en el cual se van reduciendo las tasas de especiación de los linajes de *Calomela* conforme crece la competencia intraespecífica por el nuevo recurso. De hecho, se ha demostrado que este mismo proceso es el que promovió la radiación en Australia de grupos como los canguros, reptiles, y aves como los melifágidos (*honeyeaters*) y los cractícidos (*butcherbirds*) (Kearns *et al.*, 2013). En el caso de *Calomela*, el estrecho vínculo trófico con las acacias, compartido además con los géneros hermanos *Callidemum* (algunas especies) y *Dicranosterna* (todas las especies) (Reid, 2006; Jurado-Rivera *et al.*, 2009; ver apartado 4.1), sugiere que la historia evolutiva de estas plantas puede ser un elemento clave en la comprensión de los patrones de diversificación detectados en *Calomela*. De hecho, la comparación de las gráficas LTT de ambos grupos muestra que sus respectivas radiaciones tuvieron un origen muy próximo en el tiempo, y que el linaje de las *Acacia* sufrió una desaceleración en las tasas de diversificación en el periodo 26-15 Ma (Crisp y Cook, 2013), lo que coincide con la desaceleración detectada en *Calomela* (Figura 4.2-80). Ambas desaceleraciones se prolongan hasta el Mioceno medio, cuando hace aproximadamente 14 Ma tuvo lugar un importante episodio de aridificación en Australia que dio paso a la expansión de los biomas árido y monzónico (Crisp y Cook, 2013) y que probablemente promovió la radiación de las acacias (McGowran *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2013). Por su parte, el bioma esclerófilo quedó relegado a sus actuales refugios en las costas este, sureste y suroeste (Crisp y Cook, 2007), donde el género *Acacia*

presenta hoy día sus mayores niveles de riqueza específica y endemidad (González-Orozco *et al.*, 2011). Es en este contexto de cambio climático y de radiación de especies de *Acacia* cuando se inicia una nueva etapa de diversificación en *Calomela*, dando lugar a la aparición de los linajes que definirán los principales grupos de especies que existen actualmente. En sintonía, nuestra reconstrucción de las asociaciones ancestrales con los biomas muestra que fue a partir de este episodio de aridificación en el Mioceno medio cuando comenzó a radiar el clado formado por las especies de *Calomela* propias de los biomas árido y monzónico (Figura 4.2-69 nodo

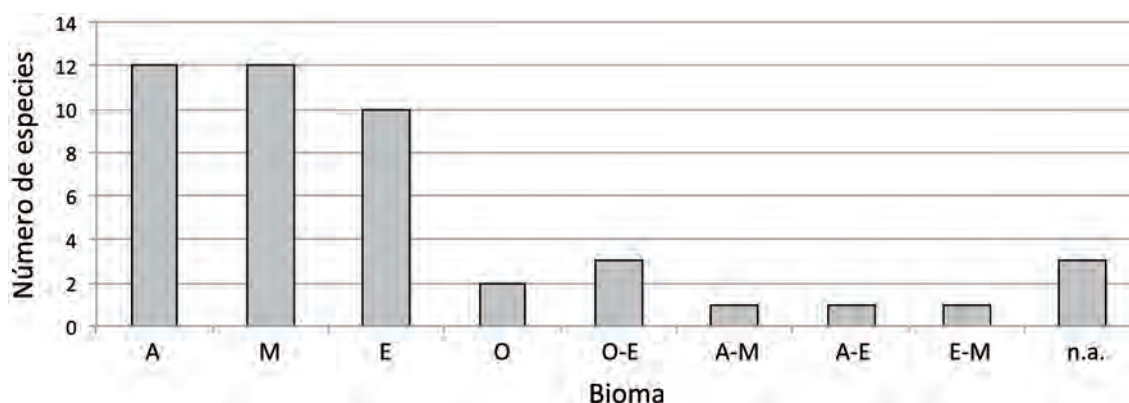


**Figura 4.2-80** Gráficas LTT de *Calomela* y *Acacia*. Los datos de *Acacia* están tomados de Crisp y Cook (2013, figura 7) y proceden de un trabajo en preparación de Thornill *et al.* Las barras grises indican dos importantes episodios de aridificación en Australia.

E). Paralelamente, se inició también la diversificación de un linaje de especies de *Calomela* (Figura 4.2-69 nodo H) estrechamente vinculadas al bioma esclerófilo, y cuya alimentación está principalmente asociada con un clado monofilético de acacias endémicas del SE australiano (Botrycephalae, Murphy *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2013; Figura 4.2-65). Al igual que sucede en la primera etapa de diversificación, la segunda presenta también un comportamiento logístico, apreciándose una reducción en cuanto a la tasa de generación de linajes entre el Mioceno medio (aprox. 12 Ma) y el presente, y que según nuestros análisis estaría causada por una disminución de las tasas de especiación (Figura 4.2-80). Sin embargo, y a

diferencia de lo descrito para la primera etapa de diversificación de *Calomela*, en esta segunda etapa las tasas de diversificación de

*Acacia* no solamente no decrecen sino que mantienen un crecimiento acelerado, indicando que las causas de la desaceleración en *Calomela* se podrían deber a otros factores. Existe la posibilidad de que la disminución de las tasas de diversificación no se deba a factores ecológicos, sino a un artefacto derivado de un muestreo incompleto (Rabosky y Lovette, 2008a). Nuestro trabajo de campo se focalizó principalmente en las regiones esclerófilas templadas, lo que estaría introduciendo un sesgo en nuestros datos hacia dicho bioma. De hecho, más de la mitad de las 45 especies de *Calomela* descritas son exclusivas de los biomas árido y monzónico (55,6%, CAM Reid, comunicación personal; Figura 4.2-81), y todas ellas podrían ser asignadas desde un punto de vista morfológico al clado representado en nuestra filogenia por las especies *C. aff. acaciae*, *C. aff. tarsalis* y *C. pallida* (Figura 4.2-69 nodo E; CAM Reid, comunicación personal). Cabría esperar por tanto que la inclusión de todas estas especies en la filogenia generara una curva LTT con una fase asintótica menos desacelerada en su tramo final, reflejando los episodios de diversificación en los biomas árido y monzónico que son los de más reciente aparición (Crisp y Cook, 2013).



**Figura 4.2-81.** Distribución por biomas de las especies de *Calomela* en Australia. Fuente: C.A.M Reid, Australian Museum, Sydney. A: árido, E: esclerófilo templado, M: monzónico, O: Omroclima húmedo.

El alto grado de especialización de las 45 especies de *Calomela* sobre un único género de plantas es un patrón inusual en la subfamilia Chrysomelinae, muchos de cuyos géneros se alimentan de plantas congénicas de una misma familia, o de géneros de varias familias o incluso de órdenes o clases diferentes (ver Jolivet y Hawkeswood, 1995). La información disponible sugiere que desde sus orígenes, ambos linajes han mantenido una estrecha asociación trófica que se ha preservado en el tiempo a lo largo de sus respectivas historias evolutivas. Sin embargo, un análisis más detallado de las interacciones a nivel específico permite descartar la existencia de un patrón coevolutivo generalizado, puesto que muchas especies de *Calomela* pueden

nutrirse de un amplio rango taxonómico de especies de *Acacia* (Figuras 4.2-65 y 4.2-66). Esta ausencia de correlación filogenética sugiere que la elección de las especies hospedadoras puede responder a criterios de adaptación ecológica o simplemente de disponibilidad de recursos en el hábitat. La disponibilidad de especies de *Acacia* no parece ser un factor limitante, ya que en Australia existen más de 1100 especies descritas cuya distribución y áreas de máxima riqueza específica son en gran medida solapantes con las de *Calomela* (González-Orozco *et al.*, 2011; CHAH, 2013). Así por ejemplo, las especies de *Calomela* estudiadas en relación al bioma esclerófilo del sureste australiano (Figura 4.2-66 clado H) tienen a su disposición más de 260 especies de *Acacia* (Maslin, 2001; González-Orozco *et al.*, 2011) y sin embargo, cada una de ellas se alimenta de un promedio de 9,6 especies (desv. est. 5.2). Además, casi la mitad de dichos registros tróficos (48%) recaen sobre ciertas especies pertenecientes a un grupo monofilético de acacias bipinnadas (Botrycephalae, Murphy *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2013) que en conjunto constituyen una ínfima parte del total de especies australianas (3,6%; Maslin, 2001; Morris *et al.*, 2002). Estos datos son indicativos de una cierta predilección por determinados linajes de *Acacia*, y que en el caso concreto de las acacias del grupo Botrycephalae, ya se conoce que son más susceptibles que las demás al ataque por parte de los herbívoros (New, 1984; Palmer y Senaratne, 2007). Por otro lado, se sabe que la radiación de las acacias de este último grupo tuvo lugar entre 3,8 y 3,4 Ma (Miller *et al.*, 2013), un periodo en el que ya se habían diferenciado las líneas evolutivas de las especies actuales de *Calomela* incluidas en el clado H (a excepción de *C. bartoni* y *C. juncta*), lo que permite descartar la existencia de un proceso de cladogénesis paralela entre ambos grupos de organismos, y pone además de relieve la capacidad de adaptación ecológica de las especies de *Calomela*. La alimentación sobre tres o más especies hospedadoras está patente en todas las especies aquí estudiadas salvo en el caso de *C. fulvilabris*, una especie que habita en zonas de interior al oeste de la cadena montañosa Great Dividing Range donde se alimenta de *A. salicina*. Se trata de una especie críptica para la que apenas se tienen datos, por lo que su genuino carácter monofágico debe ser interpretado con cautela. Por tanto, la información disponible indica que las especies de *Calomela* tienen una alimentación muy especializada en acacias, dentro de la cual son generalistas mostrando una preferencia por determinadas especies de *Acacia* taxonómicamente muy diversas



### **4.3.- La filogenia molecular aplicada al estudio de la dieta de los insectos fitófagos: Ensayo en los Chrysomelinae australianos (Coleoptera: Chrysomelidae)**

#### **4.3.1.- Introducción**

##### *4.3.1.1- Interacción insecto-planta*

Insectos y plantas conforman los dos taxones más ricos en especies entre los que constituyen la delgada pero vasta película viva que envuelve nuestro planeta (Schoonhoven, 1999). Los primeros son el linaje dominante en cuanto a diversidad biológica se refiere, incluyendo más del 50% del total de especies descritas (Wilson, 1992, Roskov *et al.*, 2014), mientras que las segundas representan la mayor parte de la biomasa de cualquier comunidad ecológica (Begon *et al.*, 2006). Más de la mitad de las especies conocidas de insectos se alimenta de plantas y un número aún mayor está vinculado a ellas de una manera u otra (May, 1988). El interés del estudio de las relaciones alimenticias entre los insectos fitófagos y sus plantas hospedadoras no reside únicamente en el conocimiento de la biología de las especies que interactúan, sino que además es un elemento crucial de cara a comprender la evolución y dinámica de los ecosistemas terrestres. La herbivoría representa un escenario evolutivo donde las especies se desenvuelven en una zona adaptativa con una enorme variedad de nichos ecológicos (Schluter, 2000), y que en el caso concreto de la interacción insecto-planta podría explicar la mayor parte de la diversidad orgánica en los ecosistemas terrestres (Ehrlich y Raven, 1964; Janz, 2011). La coevolución entre ambos linajes ha sido propuesta como la principal causa (Farrell, 1998; Moreau *et al.*, 2006; Hembry *et al.*, 2014; Althoff *et al.*, 2014), o al menos como un factor importante (López-Vaamonde *et al.*, 2006; Gómez-Zurita *et al.*, 2007a; Hunt *et al.*, 2007; Cruaud *et al.*, 2012), a la hora de entender la enorme diversidad específica que determinados grupos de insectos fitófagos exhiben. Pero al margen del modelo concreto de evolución que determine su diversificación, coevolutivo o no, es indudable que existe una vinculación macroevolutiva y microevolutiva muy estrecha entre estos grupos de organismos.

Por otro lado, la interacción alimenticia insecto-planta juega un importante papel ecológico, ya que determinados procesos de los ecosistemas tan fundamentales como los ciclos de energía y nutrientes están profundamente interrelacionados con la estructura de las redes y cadenas tróficas (de Ruiter *et al.*, 2005; Chapin III *et al.*, 2012). Además, dicha interacción también es interesante desde un punto de vista

aplicado, puesto que los insectos fitófagos son los responsables de las principales plagas de los cultivos y sus productos derivados almacenados (Schoonhoven *et al.*, 2005), al tiempo que también son utilizados con éxito en programas de lucha biológica contra plantas invasoras (Room, 1990; Klein, 2011). Finalmente, la gestión de iniciativas de conservación que impliquen sistemas en los que interactúan insectos y plantas debe basarse en el conocimiento de sus respectivas biología y los mecanismos de la interacción (Samways, 1993; Louda *et al.*, 1997).

#### 4.3.1.2.- *Métodos de estudio de la fitofagia*

El estudio de las relaciones alimenticias entre insectos y plantas ha recibido mucha atención en las últimas décadas por parte de diversas disciplinas biológicas, incluyendo bioquímica, botánica, ecología, entomología, etología, fisiología, genética, filogenética y biología evolutiva (e.g. Via, 1984; Thompson, 1988; Forster y Harris, 1997; Landolt y Phillips, 1997; Ueno *et al.*, 1997; Becerra y Venable, 1999; Wahlberg, 2001; Becerra, 2007; Stam *et al.*, 2014). Uno de los pasos fundamentales a la hora de realizar este tipo de estudios consiste en la correcta identificación taxonómica de las especies que interaccionan, lo que a menudo se ve obstaculizado por motivos diversos tales como la dificultad de inventariar especies en comunidades naturales (e.g. Janzen y Hallwachs, 1994) y la aún más complicada tarea de estimar la presencia de relaciones tróficas entre las diferentes especies que las integran (e.g. Thompson y Townsend, 1999). Son varios los métodos que hasta la fecha se han empleado con este último fin. El más básico e intuitivo de todos consiste en la observación directa de ejemplares alimentándose en la naturaleza. El hecho de encontrar un insecto herbívoro sobre una planta no necesariamente indica una relación trófica, ya que a lo largo de sus ciclos vitales los insectos pueden emplear las plantas para otros fines además de los estrictamente alimenticios (Kennedy, 1953). Prueba de ello es la elevada frecuencia con la que aparecen en la literatura registros erróneos de hospedadores basados en observaciones de campo accidentales y que por tanto no reflejan una relación trófica real (Ehrlich y Raven, 1964; Jolivet y Hawkeswood, 1995). Además, esta técnica tampoco garantiza el completo conocimiento del espectro alimenticio propio de los insectos herbívoros estenófagos (i.e. que se alimentan de varias plantas de un restringido grupo botánico, como podría ser un género) y polífagos (i.e. que explotan un amplio grupo de plantas de diversas familias).

Otro de los métodos tradicionalmente empleados consiste en la realización de experimentos de preferencia alimenticia en laboratorio (e.g. De Boer y Hanson, 1984; White *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2014). Los resultados derivados a partir de este tipo de estudios a menudo demuestran únicamente potencialidad trófica, y no necesariamente asociaciones naturales; lo mismo sucede con los registros obtenidos a partir de plantas cultivadas (Ehrlich y Raven, 1964).

Desde el punto de vista fisiológico se han desarrollado métodos basados en la exposición de los órganos sensitivos del insecto (generalmente las antenas) a volátiles específicos de determinadas plantas. La respuesta fisiológica del herbívoro se analiza a partir de la actividad neuronal registrada en los denominados electroantenogramas (Schneider, 1957), los cuales se obtienen mediante el empleo de microelectrodos insertados en el insecto y conectados a un olfactómetro (Birkett *et al.*, 2006; Chen y Fadamiro, 2007; Fernández *et al.*, 2007).

Existe otro grupo de métodos para establecer correspondencias tróficas que van más allá de la observación directa, y que se fundamentan en el análisis del material vegetal contenido en el tracto digestivo de los insectos fitófagos. El más simple de todos ellos consiste en la elaboración de preparaciones microscópicas a partir dicho contenido (Isley y Alexander, 1949; Otte y Joern, 1977), que luego se comparan con una serie de preparaciones del mismo tipo obtenidas a partir de las especies vegetales que habitan la localidad de colecta (e.g. Fry *et al.*, 1978). Este procedimiento tiene varios inconvenientes. Por un lado no siempre es posible la correcta identificación de las plantas hasta el nivel de especie debido a que los procesos digestivos suelen degradar las estructuras vegetales (Winemiller y Layman, 2005). Además, la naturaleza del método requiere o bien un muestreo exhaustivo de las plantas presentes en la zona de estudio, pues de otra forma sería posible hallar en la muestra especies que no se corresponden con ninguna de las preparaciones de referencia (e.g. Fry *et al.*, 1978), o bien un amplio y profundo conocimiento taxonómico botánico. Otro impedimento a tener en cuenta estriba en la necesidad de analizar grandes cantidades de muestra para poder estimar el espectro trófico completo del animal (Winemiller, 1990). Por último, es muy probable que esta técnica proporcione resultados sesgados en los que muchas interacciones tróficas pasen desapercibidas (Feller *et al.*, 1985).

El análisis bioquímico e histológico representa una aproximación alternativa al examen morfológico del contenido del tracto digestivo de los insectos. Dos de las



técnicas más comúnmente empleadas se basan en tinciones específicas de tejido (e.g. Schlein y Jacobson, 1999) y análisis de isótopos estables (e.g. Post, 2002). Ambas prácticas conllevan una tediosa labor y los resultados que generan tienen un escaso grado de resolución taxonómica.

Más recientemente se han desarrollado métodos moleculares basados en secuencias de ADN que han mostrado un gran potencial para identificar restos de presas en el sistema digestivo o las heces de los predadores (Symondson, 2002). El elemento fundamental sobre el que se apoyan estas prácticas es la elevada sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis y Faloona, 1987) para amplificar una secuencia nucleotídica a partir de pequeñas cantidades de ADN molde inicial. Estas condiciones son exactamente en las que se encuentra el ADN del recurso ingerido en el tracto digestivo del consumidor debido a los procesos de degradación a los que se ve sometido. Las bases de datos genéticas contienen secuencias pertenecientes a numerosas especies que permiten identificar regiones conservadas, comunes a un amplio rango de organismos; esto permite amplificar fragmentos homólogos de ADN en organismos de los que no existe ningún conocimiento previo del genoma gracias al empleo de cebadores universales (Simon *et al.*, 1994). Una vez que estos cebadores han sido desarrollados pueden ser aplicados en otros estudios de manera fácil y económica (Juen y Traugott, 2005). Este método ha sido ampliamente utilizado en el estudio de sistemas predador presa (Zaidi *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Hoogendoorn y Heimpel, 2001; Harper *et al.*, 2005, Greenstone *et al.*, 2007; Eitzinger *et al.*, 2013) e incluso se ha extendido a otras áreas como la investigación alimenticia humana (e.g. Hartmut *et al.*, 1999; Phister *et al.*, 2007; Galimberti *et al.*, 2013), la medicina forense (e.g. Craft *et al.*, 2007; Imaizumi *et al.*, 2007; Gausterer *et al.*, 2012) y los estudios de ADN antiguo (e.g. Tessier *et al.*, 2004; Coolen *et al.*, 2007).

#### 4.3.1.3.- *Diagnosis molecular de muestras vegetales*

Las metodologías basadas en ADN ofrecen una solución inmediata al problema del estudio de la herbivoría por simple analogía con las investigaciones de sistemas depredador-presa, adaptándose en cualquier caso a la detección de restos vegetales en el tracto digestivo de los insectos fitófagos mediante unos cebadores específicos de plantas.

Para que la identificación de los restos vegetales a partir de secuencias de ADN tenga la resolución que requiere la investigación de asociaciones tróficas, se depende en gran medida del desarrollo de estos marcadores en plantas.

Los primeros esfuerzos por reconstruir filogenias de plantas desde un punto de vista molecular comenzaron en la década de los 90. En un primer trabajo, Hamby y Zimmer (1992) emplearon secuencias parciales de ARNr nuclear SSU y LSU, demostrando la utilidad de estos marcadores para inferir relaciones basales en angiospermas. Poco después Chase *et al.* (1993) realizaron un análisis cladístico utilizando medio millar de secuencias cloroplásticas del gen para la ribulosa-bifosfato carboxilasa (*rbcL*), destacando su trabajo como uno de los análisis filogenéticos con más taxa hasta entonces llevados a cabo, e instaurándose como punto de referencia para investigaciones posteriores (Soltis *et al.*, 2005). A partir del estudio de Chase *et al.* (1993) se despertó un interés general sobre las topologías que se podrían obtener con otros genes, especialmente con los nucleares, pues hasta la fecha se había empleado el marcador nuclear ARNr 18S, pero su fiabilidad era cuestionada debido a la dificultad que entraña el alineamiento de este tipo de secuencias (Nickrent y Soltis, 1995). Soltis *et al.* (1997) demostraron que aunque el ARNr 18S ofrecía una menor resolución que el gen *rbcL*, ambas topologías eran concordantes. Las secuencias de ARNr 18S comenzaron a acumularse en las bases de datos al tiempo que lo hacían también las del gen plastidial *atpB* (Savolainen *et al.*, 2000), cuya longitud y tasa de evolución resultó ser similar a la de *rbcL*, lo cual propició una rápida extensión de su uso.

A partir de entonces se han ido explotando otros marcadores moleculares entre los que destacan los genes de origen cloroplástico. Los denominados marcadores plastídicos de evolución rápida, que generalmente habían sido empleados para resolver relaciones filogenéticas entre géneros y especies cercanas, demostraron también un gran potencial a la hora de investigar niveles evolutivos más profundos. El gen *matK* tiene una tasa de evolución tres veces superior a la de *rbcL* (Soltis *et al.*, 2005), lo cual llevó a pensar que sería un buen marcador para reconstruir relaciones evolutivas dentro de una misma familia o entre familias muy próximas. Sin embargo, empleando secuencias de tan sólo 1000 pb del gen *matK*, Hilu *et al.* (2003) reconstruyeron un árbol filogenético para angiospermas similar al obtenido tras combinar los genes *rbcL*, *atpB* y 18S rADN. De manera similar, Borsch *et al.* (2003) hallaron que el análisis filogenético de *trnL-F*, un intrón plastídico y una región espaciadora típicamente utilizada para realizar inferencias a nivel genérico o

específico (e.g. Taberlet *et al.*, 1991), ofrecía una topología para las angiospermas basales muy parecida a la obtenida con el análisis combinado de tres o más genes. Esto parecía deberse a la estructura secundaria del marcador, que alterna regiones variables con regiones conservadas, presentando las primeras una señal filogenética elevada en la mayoría de las posiciones.

Las regiones no codificantes del genoma cloroplástico han sido ampliamente exploradas en estudios donde se trabaja a los niveles taxonómicos intergenérico e interespecífico, asumiendo que este tipo de secuencias deben estar sometidas a una menor presión funcional que las zonas codificantes y, por tanto, presentan elevados niveles de variación para los análisis filogenéticos (Gielly y Taberlet, 1994). Shaw *et al.* (2005) realizaron un estudio comparativo con 21 marcadores cloroplásticos no codificantes estableciendo la existencia de diferentes tasas de evolución en cada uno de ellos, y por tanto demostrando la versatilidad filogenética de este tipo de secuencias. Entre las regiones no codificantes del genoma cloroplástico, los espaciadores intergénicos destacan por ser los que mayor variabilidad presentan, lo que los convierte en marcadores ideales para resolver relaciones filogenéticas entre especies próximas (Dong *et al.*, 2012).

Las plantas poseen un segundo tipo de genoma citoplasmático, el genoma mitocondrial, que es el típicamente usado en estudios filogenéticos para niveles de divergencia medios o bajos en animales (Avice, 1994). Para este genoma, las plantas constituyen una excepción a la regla general de que sus secuencias poseen una tasa de evolución rápida, pues se trata de un genoma altamente conservado incluso entre grupos muy divergentes (Cho *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2004; Kress *et al.*, 2005; Fazekas *et al.*, 2008). Wolfe *et al.* (1987) demostraron que las tasas de sustituciones sinónimas en genes mitocondriales de angiospermas eran anormalmente bajas, unas cuantas veces más lentas que las halladas para los genes cloroplásticos, de diez a veinte veces más lentas que las de los genes nucleares de angiospermas y mamíferos, y de cincuenta a cien veces más lentas que las tasas encontradas en genes mitocondriales de mamíferos. Esta peculiaridad ha propiciado que los marcadores mitocondriales se empleen para resolver niveles taxonómicos profundos. Algunos ejemplos de marcadores moleculares mitocondriales utilizados para estudiar filogenias vegetales podrían ser *atpA*, *cox1* y *mtSSU* (e.g. Bowe *et al.*, 2000; Chaw *et al.*, 2000; Soltis *et al.*, 2002; Inda *et al.*, 2010), *cox3* (e.g. Malek *et al.*, 1996) o *nad5* (e.g. Beckert *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 2010).

Un método molecular para la identificación de muestras vegetales en el contexto de la investigación de asociaciones insecto-planta debe aprovecharse de algún modo de la riqueza de información genética previa disponible en las bases de datos. La información derivada de los estudios mencionados y de estudios particulares para investigar la sistemática de grupos botánicos concretos puede proporcionar datos tanto para la selección del marcador adecuado como para el ejercicio de identificación posterior.

#### 4.3.1.4.- *Identificación taxonómica a partir de bases de datos de secuencias*

Diariamente se generan enormes volúmenes de información genética y ello ha motivado el desarrollo tanto de bases de datos para su almacenamiento como de diversas herramientas para su gestión y aprovechamiento. Una base de datos es una estructura organizada de almacenamiento de datos, que en el caso concreto de las bases de datos biológicas generalmente contiene información genómica (i.e. secuencias nucleotídicas), proteómica (i.e. secuencias aminoacídicas) y metabolómica (i.e. perfiles moleculares de los metabolitos de un organismo). En el caso de la información genómica se ha creado una entidad denominada International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC, <<http://insdc.org>>), que consiste en un esfuerzo coordinado para reunir la información genética disponible en las tres bases de datos públicas principales a nivel mundial: DNA Data Bank of Japan (DDBJ: <<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>>), EMBL (European Molecular Biology Laboratory: <<http://www.embl.org/>>) y GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology Information: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>). Existe una interacción continua entre las tres bases de datos, de modo que la información acumulada en cada una de ellas es intercambiada con las demás diariamente de manera sincronizada. Actualmente hay más de 61 millones de secuencias nucleotídicas individuales depositadas en las bases de datos, y todas ellas se encuentran disponibles de manera gratuita en Internet (Benson *et al.*, 2007).

Cada base de datos utiliza un formato propio para organizar la información asociada a las secuencias. El formato GenBank es uno de los más empleados e incluye el número único de acceso de la secuencia y una descripción de la misma, el nombre científico y la clasificación taxonómica del organismo, referencias bibliográficas, comentarios, y una tabla de características donde se listan áreas de interés biológico, tales como regiones codificantes y sus traducciones proteicas,

unidades de transcripción, regiones repetitivas y lugares de mutación o modificación. La información taxonómica asociada a la secuencia es de un considerable interés para estudios como el nuestro, donde el propósito principal consiste en la identificación de especies (o de su posición sistemática) a partir de secuencias de ADN.

Muy íntimamente asociado al establecimiento de estas bases de datos como recurso indispensable para la investigación en biología molecular, se ha progresado de manera especial en el desarrollo de herramientas bioinformáticas que hacen fácilmente accesible la información disponible en las bases de datos. Una de estas herramientas, fundamental en el ejercicio de identificación de homólogos a partir del reconocimiento de similitud entre secuencias en las bases de datos es BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990).

BLAST es un algoritmo desarrollado para identificar regiones similares entre secuencias. Para ello se compara una secuencia nucleotídica o aminoacídica con las secuencias depositadas en la base de datos y se calcula la significación estadística de esta comparación. BLAST se puede emplear para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias a la vez que para identificar miembros de familias génicas.

El algoritmo BLAST es un programa heurístico, lo que significa que utiliza atajos para ejecutar búsquedas de manera rápida en un entorno donde las alternativas posibles son muy elevadas. Este tipo de estrategia es la más adecuada para trabajar sobre una base de datos con gran cantidad de información y en continuo crecimiento.

Una búsqueda BLAST consta de tres pasos: semillado, extensión y evaluación. En la fase de semillado se buscan "palabras" pequeñas en las secuencias de la base de datos que corresponden a fragmentos cortos (e.g. siete residuos por defecto) de la secuencia problema. La elección de las palabras significativas se realiza en función de parámetros tales como la puntuación de cada palabra (más alta cuanto más similares son), el tamaño y la distancia entre éstas dentro la misma secuencia. La sensibilidad y la velocidad de la búsqueda se pueden ajustar modificando los valores de estos parámetros. La fase de extensión consiste en la elongación del alineamiento (comparación directa de posiciones de la secuencia problema con las de la base de datos) a ambos lados de las palabras siguiendo el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman, 1981), de modo que el alineamiento se va extendiendo progresivamente hasta que se alcanza una posición donde la puntuación en función del grado de similitud cae por debajo un valor X preestablecido con respecto a la

puntuación más alta obtenida anteriormente. El carácter heurístico de BLAST reside en la existencia del valor  $X$ , ya que la extensión a lo largo de todas y cada una de las secuencias del alineamiento de la base de datos implicaría un elevado coste tanto en términos de tiempo como de esfuerzo computacional. Una vez terminada la extensión de todas las palabras se procede a la fase de evaluación donde se estima la significación estadística de cada uno de los alineamientos realizados a partir de parámetros calculados durante la búsqueda.

BLAST estima varios parámetros: *expect value* (*E value*), *maximum score*, *total score*, *query coverage* y *maximum identity*. *E value* nos indica la probabilidad de que la secuencia problema se haya alineado al azar con otras secuencias no homólogas presentes en la base de datos; su valor decrece exponencialmente con el valor de *score* que se asigna al alineamiento entre dos secuencias. Dicho valor de *score* se calcula a partir de las puntuaciones asignadas a las posiciones que han sido alineadas (si son idénticas o por el contrario ha habido sustitución de bases) y las asignadas a las penalizaciones por inserción y extensión de *gaps* (huecos de alineamiento por falta de correspondencia con uno o varios nucleótidos). La diferencia entre los parámetros *maximum score* y *total score* estriba en la posibilidad de que una misma secuencia de la base de datos incluya varias repeticiones de una secuencia similar a la secuencia problema. En tal caso, *maximum score* muestra la mayor de las puntuaciones entre las asignadas a los alineamientos realizados en las diferentes regiones de la secuencia, mientras que *total score* es un indicativo de la suma de todas las puntuaciones. *Query coverage* representa, en tanto por cien, la longitud de la secuencia problema que está incluida en el segmento alineado. *Maximum identity* se corresponde con el máximo porcentaje de identidad para el total de posiciones del alineamiento entre la secuencia problema y cada una de las secuencias de la base de datos. Los resultados de un alineamiento pueden ser diferentes en función del parámetro que se escoja para ordenar la información. Por defecto el programa devuelve los alineamientos organizados según valores crecientes del estadístico *E value*.

Esta información permite recuperar una lista ordenada de secuencias presentes en la base de datos en función de uno u otro parámetro, y que generalmente irá desde las secuencias más similares a las menos similares. Las múltiples capas de información asociadas a cada secuencia, desde la anotación del gen que representan al organismo o cepa de la que proceden, servirán para conocer por extensión detalles de la secuencia problema. En el caso de secuencias de origen vegetal, debido a la riqueza en las bases de datos para algunos marcadores, esta

información podrá ser utilizada para identificar el taxón de origen (o el más similar) al de la secuencia problema.

#### 4.3.1.5.- *Modelo de estudio de asociaciones insecto-planta: Los Chrysomelidae*

La familia Chrysomelidae (Latreille, 1802) constituye un buen modelo de estudio para nuestro trabajo puesto que es un grupo de coleópteros de hábitos estrictamente fitófagos y que presenta una elevada diversificación en cuanto a número de especies y ecologías, estando presentes en la mayoría de los ecosistemas terrestres donde habitan las angiospermas (Figura 4.3-1). Con aproximadamente 40.000 especies conocidas (Chaboo *et al.*, 2014), constituye una de las familias más grandes de organismos. Tanto las larvas como los adultos de los crisomélidos se alimentan de tejidos vegetales y sus hospedadores pertenecen a un amplio rango de plantas vasculares incluyendo una gran diversidad de angiospermas (Lawrence *et al.* 1999). Los adultos de la subfamilia Sagrinae Leach, 1815 se alimentan de polen, pero la vasta mayoría de adultos de los restantes grupos se alimenta de hojas y flores de angiospermas. Los hábitos larvarios son particularmente diversos, existiendo especies que se alimentan de raíces (Eumolpinae Hope, 1840 y Alticinae Spinola, 1844), especies minadoras tanto de tallos (Sagrinae) como de hojas (algunos Cassidinae Gyllenhal, 1813 y Galerucinae Latreille, 1802) y especies que se alimentan externamente de hojas (Chrysomelinae Latreille, 1802, Spilopyrinae Chapuis, 1874, algunos Cassidinae, Criocerinae Latreille, 1807 y Galerucinae). Tan sólo se conocen las plantas hospedadoras de aproximadamente el 20% de las especies descritas de Chrysomelidae. Así, por ejemplo, para los abundantes crisomélidos que habitan en el dosel forestal tropical, que se colectan principalmente mediante la aplicación de métodos químicos e indiscriminados de captura masiva (e.g. piretroides), no es posible el establecimiento de su asociación trófica, por lo que la biología de la mayoría de dichas especies permanece desconocida (Jolivet y Hawkeswood, 1995).

Los crisomélidos han sido bien estudiados en determinadas regiones del mundo (i.e. Regiones Neártica y Paleártica), lo que nos permite conocer con precisión el trofismo de determinadas especies y emplearlas como grupo control. Por otro lado existen enormes lagunas de conocimiento en cuanto al trofismo de las especies Australes y Neotropicales (Jolivet y Hawkeswood, 1995), y el estudio de las mismas hace tiempo que es necesario.



**Figura 4.3-1.** Diferentes especies y estadios vitales de Chrysomelidae ilustrando la diversidad morfológica y ecológica del grupo. a) *Lachnaia variolosa* (subfamilia Clytrinae) en ecosistema mediterráneo (Granada, España); b) *Paropsis maculata* (subfamilia Chrysomelinae) en bosque esclerófilo australiano (NSW, Australia); c) *Omocerus casta* (subfamilia Cassidinae) en bosque lluvioso tropical (Provincia de Alajuela, Costa Rica); d) *Dicranosterna globulosa* (subfamilia Chrysomelinae) en bosque esclerófilo australiano (NSW, Australia). (Fotografías: J. A. Jurado-Rivera).

Entre los Chrysomelidae, la fauna australiana de la subfamilia Chrysomelinae es el principal objeto de estudio de esta tesis doctoral, y como ya se ha discutido en los capítulos anteriores, representa un buen ejemplo donde la historia evolutiva de los herbívoros está ligada a la de sus hospedadores. La mayoría de los géneros australianos de Chrysomelinae se caracterizan por alimentarse sobre un número reducido de especies vegetales estrechamente emparentadas (Reid, 2006), y la correcta identificación taxonómica de las especies interactuantes es un requisito fundamental de cara a investigar el origen y la evolución de las asociaciones ecológicas. Sin embargo, la práctica totalidad de los registros alimenticios disponibles



en la literatura proceden de observaciones de individuos sobre plantas, lo que no necesariamente tiene por qué reflejar la existencia de una asociación trófica real.

#### **4.3.2.- Objetivos**

La finalidad de nuestro estudio consiste en el establecimiento de un método objetivo basado en la técnica de PCR para la identificación de las especies vegetales que conforman la dieta de los insectos herbívoros, partiendo de la extracción de ADN genómico del animal completo. Para ello utilizamos como modelo un conjunto de 89 especies de coleópteros estrictamente fitófagos pertenecientes a la subfamilia Chrysomelinae (Coleoptera: Chrysomelidae). También se ha empleado la técnica de clonación de productos de PCR con el objetivo de conocer el espectro trófico completo de los especímenes estudiados. Proponemos un tratamiento bayesiano a las secuencias de ADN para establecer la posición filogenética de la planta hospedadora como alternativa a otros métodos de identificación molecular estrictamente fenéticos (e.g. *barcoding*, Hebert *et al.*, 2003) e integramos en nuestra inferencia la información disponible en relación con los registros botánicos de la zona de estudio, sistemática vegetal, citas tróficas previas existentes en la bibliografía y observaciones de campo.

#### **4.3.3.- Materiales y Métodos**

##### *4.3.3.1.- Muestreo taxonómico*

El trabajo se ha desarrollado a partir de insectos fitófagos con trofismo restringido, todos ellos pertenecientes a la familia Chrysomelidae Latreille, 1802 (Coleoptera). La mayor parte del material estudiado procede de dos campañas de colecta llevadas a cabo en Australia durante la primavera austral de los años 2005 y 2006. La primera de ellas se centró en el Este-Sureste del continente, visitando principalmente Australian Capital Territory, New South Wales, Tasmania y Victoria, mientras que la segunda se desarrolló íntegramente en Western Australia. El resto de especímenes examinados es de origen diverso (Tabla 4.3-1).

Las capturas se efectuaron principalmente durante el día mediante las técnicas de muestreo descritas en el apartado 3.1.1 (página 15).

En total se han estudiado 89 especies de coleópteros pertenecientes todas ellas a la subfamilia Chrysomelinae (Coleoptera: Chrysomelidae) (Tabla 4.3-1).

Tabla 4.3-1. Especies estudiadas.

Taxon	Localidad de colecta	Colectores
<i>Araucanomela wellingtonensis</i>	Parque Nacional Vicente Pérez Rosales (Llanquihue, Chile)	E Petitpierre
<i>Callidemum hypochalcicum</i>	Hattah-Kulkynie National Park (Victoria, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Callidemum limbatum</i>	Mount Keira (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Catomela aff. acaciae</i> (JAJ130)	Coolgardie (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Catomela bartoni</i>	Bulls Head (Australian Capital Territory, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Catomela curtisi</i>	Vineyard (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Catomela fuivilabris</i>	Jerrys Plains (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Catomela ioptera</i>	Mount Keira (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Catomela juncta</i>	Royal National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Catomela panis</i>	Warkworth (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Catomela pulchella</i>	Windsor (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Catomela ruficeps</i>	Stanwell Park (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Chalcidompra</i> sp. (JAJ131)	Stirling Range National Park (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Chrysolina americana</i>	Paraje Natural Acanitidos de Maro-Cerro Gordo (Granada, España)	A Muñoz
<i>Chrysolina quadrigemina</i>	Nossa Senhora da Assunção (Bragança, Portugal)	E Petitpierre
<i>Chrysolina viridana</i>	Riofrío (Granada, España)	ML Rivera
<i>Chrysomela collaris</i>	Kurai (Altai, Rusia)	Y Mikhailov
<i>Dicranosterna globulosa</i>	Yalgrop National Park (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Ethomela podagrosa</i>	Mount Kosciuszko National Park (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Ethomela</i> sp. (JAJ63)	Mount Kosciuszko National Park (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Eulina pulchra</i>	Leigh (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Ewanius nothofagi</i>	South West National Park (Tasmania, Australia)	DW de Little
<i>Faex notabennis</i>	Kanangra-Boyd National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
Genero y especie no descritos (JAJ55)	Mount Canobolas State Recreation Area (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Geomela aff. blackburni</i> (JAJ59)	Mount Canobolas State Recreation Area (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Gonioctena olivacea</i>	Arroyo de Santiago de la Espada (Nerpio, Albacete)	JA Jurado-Rivera
<i>Gonioctena variabilis</i>	Arroyo de Santiago de la Espada (Nerpio, Albacete)	JA Jurado-Rivera
<i>Johannica gemellata</i>	Woko National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Lamprolina aff. aeneipennis</i> (196180)	Bellbird (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Lamprolina similima</i>	Cumberland State Forest (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Lamprolina simplicipennis</i>	Thyringham (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Jayena (Granada, España)	JA Jurado-Rivera
<i>Novacastria nothofagi</i>	Barrington Tops (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Oomela distincta</i>	Red Cedar Flora Reserve (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Oomela elliptica</i>	Red Cedar Flora Reserve (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Oomela variabilis</i>	Dorrigo National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Palaeomela punctifrons</i>	Mount Canobolas State Recreation Area (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Palaeomela</i> sp. (JAJ57)	Mount Kosciuszko National Park (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Paropsides</i> sp. (JAJ92)	Woko National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera

Tabla 4.3-1. Continuación.

Taxon	Localidad de colecta	Colectores
<i>Paropsis aff. geographica</i> (JA, J138)	Balingup (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsis maculata</i>	Stanwell Tops (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Paropsis minor</i>	Darke Forest (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Paropsis pictipennis</i>	Kanangra-Boyd National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Paropsisisterna aff. capbosa</i> (JA, J142)	Balingup (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna aff. decolorata</i> (JA, J143)	Denmark (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna aff. intertincta</i> (JA, J145)	Waroona (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna aff. intertincta</i> (JA, J147)	Karridale (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna aff. intertincta</i> (JA, J148)	Denmark (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna aff. lignea</i> (JA, J151)	Barrington Tops National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna aff. variabilis</i> (JA, J139)	Willow Springs (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna beata</i>	Cessnock (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Paropsisisterna crocata</i>	Kingsbury Lookout (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna debilis</i>	Beedelup National Park (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna geniculata</i>	Black Mountain (Australian Capital Territory, Australia)	CAM Reid
<i>Paropsisisterna liturata</i>	Darke Forest (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Paropsisisterna m-fuscum #1</i>	Marulan (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Paropsisisterna m-fuscum #2</i>	Molonglo Gorge (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Paropsisisterna nigerrima #1</i>	Balingup (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna nigerrima #2</i>	Giddegannup (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna oblitterata</i>	Darke Forest (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Paropsisisterna semifumata</i>	Woko National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Paropsisisterna subcostata</i>	Florentine Valley (Tasmania, Australia)	DW de Little
<i>Peitoschema aff. orphana</i> (JA, J154)	Lane Poole Conservation Reserve (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Peitoschema cardinalis</i>	Black Mountain, Australian Capital Territory, Australia	CAM Reid
<i>Peitoschema festiva</i>	Kanangra-Boyd National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Peitoschema hera</i>	Yalgourup National Park (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Peitoschema maculiventris</i>	The Rock Nature Reserve (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Peitoschema mansueta</i>	Wollongong (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Peitoschema scutifera</i>	Mumballup (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Peitoschema sp.</i> (JA, J155)	Waroona (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Peitoschema sp.</i> (JA, J157)	Yalgourup National Park (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Peitoschema sp.</i> (JA, J161)	Denmark (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Phylidronopa turbata</i>	Yalgourup National Park (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Phylidronopa aeneipennis</i>	Wemen (Victoria, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Phratora vitellinae</i>	Valle de Arán (Lérida, España)	E Petitpierre
<i>Phyllocnistis cyanicornis</i>	Royal National Park (New South Wales, Australia)	CAM Reid

Tabla 4.3-1. Continuación.

Taxon	Localidad de colecta	Colectores
<i>Phyllocharis melanospiella</i>	Cascade (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Phyllocharis wollumbina</i>	Mount Warning National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Plagioidera versicolora</i>	Vilariño Frío (Ourense, España)	E Pettipierre
<i>Platymela cephalotes</i>	Broome (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Platymela</i> sp. (JA.J89)	Mallanganee National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Poropteromela epipleuralis</i>	Dorrigo National Park (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Rhaebosterna sciola</i>	Mildura (Victoria, Australia)	JA Jurado-Rivera y CAM Reid
<i>Trachymela</i> aff. <i>seniata</i> (JA.J167)	Wooroloo (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Trachymela</i> aff. <i>tincticollis</i> (JA.J163)	Jarrahdale (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Trachymela</i> aff. <i>tincticollis</i> (JA.J164)	Balingup (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Trachymela rugosa</i>	Mount Canobolas State Recreation Area (New South Wales, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Trachymela</i> sp.(196167)	Marulan (New South Wales, Australia)	CAM Reid
<i>Trachymela</i> sp. (JA.J168)	Yaigorup National Park (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Trachymela</i> sp. (JA.J170)	Yaigorup National Park (Western Australia, Australia)	JA Jurado-Rivera
<i>Trachymela tincticollis</i>	Albany (Western Australia, Australia)	CAM Reid

En una primera fase, se testó la eficacia del método propuesto en el presente trabajo en un conjunto de especies cuyas plantas nutricias son bien conocidas. Estas incluyeron las especies europeas *Chrysolina americana* (Linnaeus, 1758), *Chrysolina quadrigemina* (Suffrian, 1851), *Chrysolina viridana* (Küster, 1844), *Chrysomela collaris* Linnaeus, 1758, *Gonioctena variabilis* (Olivier, 1790), *Gonioctena olivacea* (Forster, 1771), *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824), *Phratora vitellinae* (Linnaeus, 1758), *Plagiodera versicolora* (Laicharting, 1781) y la especie chilena *Araucanomela wellingtonensis* Bechyné y Bechyné, 1973.

A continuación se extendió la aplicación de la técnica a 79 especies que constituyen una amplia representación de los géneros australianos de la subfamilia Chrysomelinae. En concreto analizamos muestras pertenecientes a 25 géneros, los cuales representan aproximadamente el 57% de los géneros de esta subfamilia que habitan en Australia (*sensu* Reid, 2006).

#### 4.3.3.2.- Elección del marcador molecular

Existen varios requisitos que un marcador molecular debe satisfacer para ser de utilidad según nuestros objetivos: (i) el marcador molecular ha de estar representado por el mayor número de copias posible en el tejido vegetal para facilitar su amplificación incluso en condiciones donde la concentración del ADN inicial es muy baja; (ii) el marcador ha de incluir zonas ampliamente conservadas a lo ancho del reino vegetal para poder diseñar cebadores que garanticen la amplificación y fácil secuenciación de cualquier potencial grupo botánico usado como alimento del insecto; (iii) la longitud del fragmento secuenciado debe permitir su amplificación en muestras donde el ADN ha sido parcialmente degradado por el aparato digestivo del insecto (o por los procesos de secado y conservación a los que generalmente son sometidos los ejemplares de colección); (iv) idealmente debe poseer una variabilidad interespecífica elevada para poder discriminar entre todas las especies, pero al mismo tiempo debe presentar un grado de conservación suficiente como para ser menos variable dentro de cada especie que entre especies diferentes (este criterio se puede relajar en función de la precisión de rango taxonómico que se requiera en la identificación); (v) al mismo tiempo debe mantener un mínimo nivel de integridad estructural y de secuencia que permita reconocer y establecer homologías entre representantes de un grupo tan diverso y antiguo como las angiospermas; y por último, (vi) el marcador escogido debe

contar con una alta representación de secuencias en las bases de datos públicas de secuencias de ADN.

Atendiendo a todas estas razones hemos escogido el intrón cloroplástico *trnL* y el *loop* P6 incluido en éste como marcadores moleculares para nuestro estudio. La pertenencia de este marcador al genoma cloroplástico es una ventaja, ya que esta fracción del genoma vegetal es relativamente abundante con respecto al ADN total de la planta (Clegg y Zurawski, 1992), de modo que es posible obtener éxito en la amplificación incluso en las situaciones donde la cantidad disponible de tejido vegetal no degradado es escasa.

Aunque se sabe que no es una de las regiones más variables del ADN cloroplástico (Shaw *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014), este marcador posee unas ventajas únicas: existen cebadores universales desde hace varias décadas (Taberlet *et al.*, 1991) y durante este periodo ha sido ampliamente utilizado en estudios filogenéticos tanto en géneros como en especies estrechamente relacionadas de la mayoría de familias botánicas (Gielly y Taberlet, 1996; Hollingsworth *et al.*, 2011). Además, esta región constituye el único intrón Grupo I del genoma cloroplastidial (Palmer, 1991), lo que significa que tiene una estructura secundaria conservada (Davies *et al.*, 1982) donde se alternan regiones conservadas y variables (Quandt *et al.*, 2004) que facilitan tanto el alineamiento de las secuencias como el diseño de primers internos (como los usados para el *loop* P6).

El intrón *trnL* ha sido ampliamente utilizado para reconstruir filogenias entre especies cercanas (e.g. Scharaschkin y Doyle, 2005; McDade *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005; Sinou *et al.*, 2009; Bessega y Fortunato, 2011; Guo *et al.*, 2013) o para identificar especies de plantas (e.g. Ronning *et al.*, 2005; Brežná *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2013), hasta el punto de haberse considerado unos años atrás como una posible región estándar para el sistema de *barcoding* vegetal (Taberlet *et al.*, 2007; Hollingsworth *et al.*, 2011). Todo ello ha propiciado la acumulación de un gran volumen de secuencias para dicho marcador en las bases públicas de secuencias de ADN.

El *trnL* tiene en promedio aproximadamente 500 pb lo que hace que sea un marcador relativamente fácil de amplificar por PCR. Por otro lado, el pequeño tamaño del *loop* P6 (aproximadamente 50 pb en promedio) le confiere la ventaja de ser un buen marcador a emplear en situaciones donde el ADN de la muestra a secuenciar ha

sido sometido a intensos procesos de degradación (Valentini *et al.*, 2009). Cuando la degradación es un problema y no es posible amplificar el intrón *trnL*, este pequeño fragmento ofrece una alternativa.

#### 4.3.3.3.- Extracción de ADN

Los especímenes se diseccionaron en condiciones de esterilidad para posteriormente ser sometidos a un protocolo de extracción de ADN empleando la totalidad del cuerpo del insecto tal y como se describe en los apartados 3.2.1 y 3.2.2 (páginas 17-19).

#### 4.3.3.4.- Amplificación y secuenciación de los marcadores

Las secuencias utilizadas en este estudio se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores universales *c* y *d* (Taberlet *et al.*, 1991) para amplificar y secuenciar el intrón *trnL*, y los cebadores *g* y *h* en el caso del *loop* P6 (Taberlet *et al.*, 2007) (Tabla 4.3-2).

Cada reacción tuvo lugar en un volumen total de 25µl, con las siguientes concentraciones finales totales: 3,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2µM de cada cebador, 0,4mM dNTPs y 0,25U de Taq polimerasa. Todos los reactivos -exceptuando el DNA molde- fueron manipulados y mezclados en una zona del laboratorio libre de ADN, trabajando en todo momento sobre hielo para evitar que la reacción se desencadenase de forma prematura. Tras varias pruebas iniciales se diseñó de forma experimental un programa de temperatura tipo *touchdown* (Don *et al.*, 1991) con ligeras modificaciones sobre el descrito por Jordal *et al.* (2004). Este consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 43 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 60 segundos e hibridación también de 60 segundos donde en los primeros 16 ciclos la temperatura descendía progresivamente de 60 a 43 °C, manteniéndose estable a 42 °C en una segunda fase de 27 ciclos de duración. Como último paso de la reacción se programó una fase de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR fueron comprobados utilizando la técnica de la electroforesis, analizando 4µl de cada reacción en un gel de agarosa al 1% al que se añadió bromuro de etidio para teñir el ADN, detectándose las bandas mediante un captador de imágenes dotado de luz ultravioleta para seleccionar los

**Tabla 4.3-2.** Secuencias de las parejas de cebadores universales utilizadas para amplificar el intrón *trnL* (UAA) y el vector pUC.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Amplificación	Referencia
c	CGAAATCGGTAGACGGCTACG	intrón <i>trnL</i> completo	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
d	GGGATAGAGGGACTTGAAC	intrón <i>trnL</i> completo	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
g	GGCAATCCTGAGCCAA	loop P6 del intrón <i>trnL</i>	Taberlet <i>et al.</i> , 2007
h	CCATTGAGTCTTGCACCTATC	loop P6 del intrón <i>trnL</i>	Taberlet <i>et al.</i> , 2007
pUC-F	GTTTCCCAAGTCACGACGTTG	vector plasmídico pUC	Messing y Vieira, 1982
pUC-R	AACAGCTATGACCATGATTACG	vector plasmídico pUC	Messing y Vieira, 1982

casos donde la PCR había sido exitosa. La presencia de dos o más productos de PCR en una sola muestra se manifestaba en forma de múltiples bandas en el gel, y tales reacciones se reservaron para ser clonadas en un paso posterior.

Las muestras que presentaban una única banda de amplificación fueron purificadas utilizando *MSB® Spin PCRapace* (Invitex) y siguiendo las instrucciones detalladas por el fabricante, obteniendo un volumen final de 20µl de ADN purificado resuspendido en tampón de elución. La concentración de cada muestra fue estimada con un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Dada la importancia de una buena relación entre las concentraciones de los componentes de una reacción de secuenciación para obtener resultados óptimos, se procedió a la dilución de las muestras en función de la longitud del fragmento amplificado. Las muestras obtenidas con los cebadores *c* y *d*, de longitud comprendida entre los 254 y los 767 pb (Taberlet *et al.*, 2007), se llevaron a una concentración de 14ng/µl, mientras que en los casos donde se emplearon los cebadores *g* y *h*, cuyos productos de PCR oscilan entre 10 y 143 pb (Taberlet *et al.*, 2007), se diluyeron hasta conseguir una concentración de 3ng/µl.

Ambas cadenas de ADN fueron secuenciadas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.7 (página 26).

#### 4.3.3.5.- Clonación de productos de PCR

Las reacciones de PCR que amplificaron dos o más fragmentos diferentes se podían detectar gracias a la presencia de múltiples bandas en el gel de agarosa siempre y cuando las diferencias de longitud entre ellos fuesen lo suficientemente grandes como para que éstas apareciesen separadas tras la electroforesis. Podía darse el caso



de que las longitudes fuesen tan similares que las bandas diesen la falsa impresión de ser una sola, con lo que procedimos con normalidad a la fase de secuenciación como si se tratase de un único producto de PCR. En estos casos el cromatograma resultante presentaba anomalías que indicaban la presencia de más de un producto de PCR en la reacción. Este tipo de cromatogramas se caracteriza por tener un fragmento inicial donde la lectura es clara y que se interrumpe exactamente la posición donde las secuencias comienzan a presentar diferencias en su composición nucleotídica, generándose a partir de este punto una señal ruidosa constituida por las secuencias superpuestas.

Tanto las muestras que presentaron múltiples bandas en el gel, como las que generaron un cromatograma anómalo similar al descrito anteriormente, fueron sometidas a un proceso de clonación para así poder obtener por separado las diferentes secuencias que las constituían. El protocolo de clonación utilizado se describe en el apartado 3.2.8 (página 27).

#### 4.3.3.6.- Edición de secuencias

Los cromatogramas obtenidos se visualizaron y editaron con el programa CHROMAS 2 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia <<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>>). Las secuencias de las hebras complementarias fueron utilizadas para la obtención de una secuencia consenso empleando el programa CONTIG ASSEMBLY PROGRAM (Huang, 1992) implementado en el programa BIOEDIT v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Como último paso de la edición, se eliminaron las secuencias de los cebadores.

#### 4.3.3.7.- Obtención de secuencias de la base de datos GenBank

Cada una de las secuencias *trnL* o *loop P6* obtenidas fue utilizada como punto de partida para obtener las secuencias homólogas más similares en las bases de datos genómicas mediante el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990). En particular, se usó *blastn*, un programa perteneciente a la familia de BLAST y creado específicamente para trabajar con secuencias de nucleótidos. Se utilizó la versión *online* de *blastn*, elevando a 500 el número máximo de secuencias a recuperar de la

base de datos, aquéllas de mayor *total score*, y sin modificar ninguna otra de las opciones de búsqueda establecidas por defecto.

La alternancia de regiones conservadas y variables del intrón *trnL*, donde las últimas además acumulan diferencias en la longitud de la secuencia, confiere a los alineamientos un aspecto donde destaca la presencia de regiones alineadas que están separadas entre sí por zonas de inserción-delección (*indels*). Una estructuración de este tipo puede conducir a que el algoritmo de BLAST asocie diferentes regiones relativamente conservadas de la secuencia problema cada una por separado con secuencias similares pero diferentes de la base de datos debido a la presencia de inserciones intermedias. En tal caso, el valor de *maximum score* se referirá únicamente a la puntuación obtenida para cada uno de los diferentes alineamientos en que se ha fragmentado la secuencia problema, mientras que *total score* considerará todas las puntuaciones, ofreciendo por tanto una estima más realista de la relación entre las secuencias alineadas. Por ello, una vez realizado el alineamiento las secuencias se ordenaron según valores decrecientes de *total score*.

Las 100 primeras secuencias obtenidas de este modo con *blastn* se descargaron en formato GenBank, de manera que se extrajo también toda la información asociada a cada una de las secuencias (número de registro, autores, referencia de la publicación, clasificación taxonómica). A este grupo de 100 secuencias se añadió la secuencia problema a partir de la cual se había generado el alineamiento y una selección de grupos externos.

Una de las propiedades del proceso evolutivo es que posee polaridad, i.e. que parte de un ancestro común hacia los taxones derivados pasando por una serie de ancestros intermedios. La comparación con un grupo externo (*outgroup*), fue descrita por primera vez por Watrous y Wheeler (1981) y consiste en la aplicación de un método indirecto para establecer la raíz y por tanto la polaridad de un árbol filogenético. En el caso de árboles obtenidos a partir de secuencias de ADN o proteína, el grupo externo estará constituido por una o varias secuencias provenientes de un individuo lo más cercano posible al grupo de estudio (*ingroup*), idealmente el grupo hermano, pero sin llegar a estar incluido en él.

El principal interés de nuestro trabajo no es obtener la filogenia de las plantas sino conocer la relación de nuestra secuencia problema con la del resto de taxones incluidos en el análisis, si bien es cierto que el establecimiento de la polaridad en los

árboles filogenéticos permitirá una interpretación de los resultados más intuitiva y coherente con la evolución de las plantas.

Por tanto, un grupo externo adecuado para este estudio debería estar constituido por secuencias no pertenecientes al grupo de estudio y poco divergentes con respecto al clado conformado por angiospermas, ya que es sobre este gran grupo de vegetales donde se espera que se alimenten los coleópteros incluidos en la muestra (ver Jolivet y Hawkeswood, 1995). Así, como grupo externo se escogieron tres especies de géneros pertenecientes a grupos más primitivos que las angiospermas establecidos a partir de la filogenia de plantas terrestres publicada por Soltis *et al.* (1999): *Cycas siamensis* Miq. (Orden Cicadales), *Ginkgo biloba* Linnaeus (Orden Ginkgoales) y *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco (Orden Coniferales). De la base de datos GenBank se descargó una secuencia del intrón *trnL* para cada una de las especies seleccionadas (números de acceso AY651841, AY145323 y AF327589, respectivamente).

Estas tres secuencias se añadieron a cada uno de los grupos formados por la secuencia problema y las 100 primeras secuencias procedentes de su respectivo alineamiento con *blastn* y se guardaron como un archivo de texto en formato FASTA (formato estándar para información de secuencia utilizada por la mayoría de aplicaciones bioinformáticas; Lipman y Pearson, 1985).

#### 4.3.3.8.- Alineamiento de secuencias

Como paso previo al análisis filogenético de cada uno de los conjuntos de datos, las secuencias se sometieron a un alineamiento múltiple automático para intentar establecer las posiciones homólogas entre ellas. Existen numerosas alternativas para generar estos alineamientos, entre las cuales nos decantamos por aquella que trata la variación en longitud de secuencia de manera más precisa en tiempos relativamente cortos para un elevado número de secuencias.

MAFFT (Multiple Alignment with Fast Fourier Transform) (Kato *et al.*, 2002, 2005) es uno de los métodos de alineamiento múltiple de secuencias más rápidos y precisos entre los existentes (Grasso y Lee, 2004; Nuin *et al.*, 2006; Golubchik *et al.*, 2007; Kato y Standley; 2013). Este programa implementa un grupo de algoritmos conocidos como Transformada rápida de Fourier que permiten una detección rápida

de segmentos homólogos entre las diferentes secuencias. El proceso de alineamiento consta esencialmente de tres pasos. En una fase inicial MAFFT construye un alineamiento empleando el método progresivo (Feng y Doolittle, 1987; Thompson *et al.*, 1994) al tiempo que elabora un árbol guía mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath y Sokal, 1973). De esta manera el orden con el que las secuencias se van añadiendo al alineamiento está determinado por el patrón de ramificación con el que éstas aparecen en el árbol. El segundo paso recalcula una matriz de distancias basada en la información obtenida en el paso anterior, y el alineamiento progresivo se vuelve a realizar utilizando un árbol generado a partir de la nueva matriz como punto de partida. El tercer y último paso consiste en la mejora del alineamiento con un método del refinamiento iterativo (Berger y Munson, 1991; Gotoh, 1993).

MAFFT ha sido ampliamente empleado desde su creación (e.g. Nishiyama *et al.*, 2004; Hashiguchi y Nishida M, 2005; Iwabe *et al.*, 2005; Soria-Carrasco *et al.*, 2007; Pearman *et al.*, 2014) y ha demostrado ser un método muy útil en casos de secuencias difíciles de alinear como las que contienen largas regiones de inserción-delección de posiciones nucleotídicas (Golubchik *et al.*, 2007), que es precisamente la característica de los alineamientos de *trnL*.

En nuestro estudio, las 104 secuencias de cada fichero fueron alineadas con la versión *online* de MAFFT (Kato *et al.*, 2002; <<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>>), utilizando la estrategia L-INS-i, basada en un método de refinamiento iterativo diseñado para tratar grupos inferiores a 200 secuencias y donde existen regiones flanqueantes alrededor del dominio alineable.

Los alineamientos generados con MAFFT se editaron en BIOEDIT, eliminando de la matriz todas las bases que excedían los límites establecidos por la longitud de la secuencia problema.

Las matrices alineadas se exportaron en formato NEXUS (Maddison *et al.*, 1997) utilizando el programa FASTA TO MRBAYES CONVERTER implementado en el paquete bioinformático FABOX (Villesen, 2007) disponible en la red (*FaBox: an online fasta sequence toolbox*, <<http://www.birc.au.dk/fabox/>>).

#### 4.3.3.9.- Análisis filogenético

La reconstrucción filogenética de las relaciones entre secuencias *trnL* o *loop P6* a partir de cada uno de los alineamientos generados en MAFFT se realizó mediante inferencia bayesiana implementada en el programa MR BAYES v 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). En cada análisis se estableció la secuencia del intrón de *Cycas siamensis* como grupo externo. Se utilizó el modelo evolutivo GTR (Tavaré, 1986), permitiendo además una cierta proporción de sitios invariables (I) y estableciendo para el resto de las posiciones una heterogeneidad en las tasas de sustitución representada por una distribución gamma (G); las probabilidades previas para todos los parámetros del modelo se estimaron a partir de las frecuencias observadas en los datos empíricos. Se ejecutaron simultáneamente dos análisis MCMC, donde cada una de ellos constaba de cuatro cadenas, obteniendo  $10^6$  generaciones por análisis de las cuales se muestreaba una de cada 100. El valor de *burnin* determina el número de muestras que serán descartadas antes de realizar las estimaciones estadísticas a partir de los datos obtenidos, y se calculó en base a los valores de verosimilitud (- ln) de cada generación a partir del momento en que estos se estabilizaban. Para cada análisis se estimó el valor de *burnin* de manera independiente, situándose éste generalmente entre el 5 y el 10% del total de generaciones, para posteriormente obtener un árbol consenso estricto con una estima de las longitudes de rama en términos de probabilidad de acumulación de cambios en las mismas, y de la probabilidad de que los agrupamientos obtenidos fueran correctos, que interpretamos como una medida de soporte (Alfaro *et al.*, 2003).

Una vez obtenidos, los árboles se editaron gráficamente con el fin de facilitar una interpretación rápida e intuitiva de los mismos. Los grupos externos fueron extraídos y las ramas correspondientes a las diferentes familias botánicas que conforman el grupo interno (y en algunos casos subfamilias y tribus) se diferenciaron entre sí mediante códigos de colores, basándonos para ello la clasificación taxonómica que cada secuencia lleva asociada en el formato GenBank. Para realizar las inferencias tróficas consideramos como significativos los soportes con un valor de probabilidad posterior igual o superior a 0,7, y todos aquellos valores inferiores a 0,15 fueron eliminados de los árboles.

#### 4.3.4.- Resultados y Discusión

Las inferencias tróficas se han realizado atendiendo principalmente a cinco tipos diferentes de evidencia: (i) Posición filogenética y soporte de la secuencia problema en el árbol obtenido, (ii) conocimientos filogenéticos publicados sobre el grupo botánico en cuestión, (iii) registros florísticos de la zona de estudio, (iv) citas tróficas disponibles en la literatura para el insecto estudiado y (v) observaciones personales de campo. Los árboles filogenéticos obtenidos para cada caso de estudio pueden consultarse en el apéndice A (páginas 416-521).

##### 4.3.4.1.- Confirmación de la validez del test: *Chrysomelinae* de alimentación conocida

En una primera fase del estudio se evaluó la eficacia del método en un conjunto de diez especies de *Chrysomelinae* cuyo trofismo es bien conocido. Estas muestras pertenecen a la fauna de crisomelinos paleárticos excepto en el caso de las especies *Araucanomela wellingtonensis* y *Leptinotarsa decemlineata* cuyo origen es americano. Los resultados obtenidos confirman las citas de plantas hospedadoras descritas previamente para cada una de ellas y otorgan confianza a la utilidad general de esta metodología para poder reconocer de manera objetiva y empírica las asociaciones tróficas de insectos herbívoros. En la aplicación del test al estudio de una fauna poco conocida desde el punto de vista de sus relaciones tróficas, como es el caso de los *Chrysomelinae* de Australia, también se han incluido especies para las que se conocía su trofismo, y al coincidir las inferencias obtenidas, como ya se verá, en cualquier caso refuerzan la validez de esta prometedora técnica.

##### ***Araucanomela wellingtonensis* Bechyné y Bechyné, 1973 (árbol 1)**

El endemismo chileno *Araucanomela wellingtonensis* ha sido citado previamente por varios autores sobre *Nothofagus* (*Nothofagus*) *betuloides* (Mirb.) Oerst. (Reid, 2002; Daccordi y de Little, 2003; Petitpierre y Elgueta, 2006). El ejemplar que nosotros estudiamos, del Parque Nacional Vicente Pérez Rosales (Llanquihue, Chile), fue precisamente recolectado sobre esta especie de *Nothofagus* Blume nom. cons. El resultado obtenido tras la aplicación del método de inferencia filogenética a partir de secuencias *trnL* amplificadas a partir del insecto, establece una relación trófica entre *A. wellingtonensis* y la familia Nothofagaceae Kuprianova (probabilidad

posterior:  $pp = 1$ ), donde se aprecia una estrecha relación con la especie *Nothofagus nitida* (Phil.) Krasser ( $pp = 0,98$ ).

La familia Nothofagaceae cuenta únicamente con el género *Nothofagus*, para el que se conocen 35 especies (Cook y Crisp, 2005; Heads, 2006) clasificadas en cuatro subgéneros: *Brassospora*, *Fuscospora*, *Lophozonia* y *Nothofagus s. str.* (Hill y Read, 1991; Manos, 1997). *Brassospora* es el único subgénero no representado en nuestro análisis, si bien este hecho carece de relevancia para la inferencia, ya que las especies de dicho grupo habitan exclusivamente en Nueva Caledonia y Nueva Guinea.

El árbol obtenido para los miembros de la familia Nothofagaceae muestra tres clados soportados por valores elevados de probabilidad posterior y que se corresponden con cada uno de los tres subgéneros de *Nothofagus* incluidos en el análisis: *Fuscospora* [*N. alessandrii* Espinosa, *N. fusca* (Hook.f.) Oerst., *N. gunnii* (Hook.f.) Oerst., *N. solandri* (Hook.f.) Oerst. y *N. truncata* (Colenso) Cockayne] ( $pp = 0,96$ ), *Lophozonia* [*N. cunninghamii* (Hook.) Oerst., *N. glauca* (R.Phil.) Krasser, *N. menziesii* (Hook.f.) Oerst., *N. moorei* (F.Muell.) Krasser y *N. obliqua* (Mirb.) Oerst.] ( $pp = 1$ ) y *Nothofagus s.str.* [*N. antarctica* (G. Forster) Oerst. y *N. nitida*] ( $pp = 0,98$ ). Esta topología es congruente con la obtenida en estudios moleculares previos (e.g. Knapp *et al.*, 2005). La secuencia problema se ubica de manera inequívoca junto a las especies del subgénero *Nothofagus s.str.* ( $pp = 0,98$ ), ocupando una posición compatible con la que cabría esperar para la especie *N. betuloides* en caso de que la secuencia de esta última hubiese sido incluida en el análisis (verManos, 1997).

En Suramérica el género *Nothofagus* está representado por nueve especies (Donoso *et al.*, 2004; Steconni *et al.*, 2004), entre las que se cuentan los cinco integrantes del subgénero *Nothofagus s.str.* (Manos, 1997; Heads, 2006): *N. antarctica*, *N. betuloides*, *N. dombeyi* (Mirb.) Oerst., *N. nitida* y *N. pumilio* (Poepp. *et* Endl.) Krasser. Todas estas especies pueden ser halladas en Chile y sus respectivas áreas de distribución abarcan la localidad de colecta (Donoso *et al.*, 2004; Heads, 2006). Las especies *N. betuloides*, *N. dombeyi* y *N. pumilio* no han sido incluidas en el análisis, por lo que su relación con la secuencia problema no ha podido ser evaluada. No obstante existen evidencias en favor de una relación trófica con *N. betuloides* ya que no sólo se colectó el ejemplar de *A. wellingtonensis* sobre dicha planta, sino que además la inferencia es compatible con la filogenia molecular de *Nothofagus* elaborada por Manos (1997) usando secuencias del marcador ribosomal nuclear ITS. Si la secuencia problema correspondiera a *N. pumilio* el árbol debería representar una

relación más estrecha con *N. antarctica* en lugar de la obtenida con *N. nitida*; por otro lado, si la secuencia problema correspondiera a *N. dombeyi*, ésta debería situarse en posición basal al clado que contiene las secuencias de *N. antarctica* y *N. nitida*.

### ***Chrysolina americana* (Linnaeus, 1758) (árbol 2)**

*Chrysolina americana* es una especie muy común en el Mediterráneo y aparece asociada siempre a Lamiaceae Martynov, nom. cons., preferentemente *Rosmarinus officinalis* L. y diversas especies de *Lavandula* L. (Jolivet y Petitpierre, 1976; Bourdonné y Doguet, 1991) (Figura 4.3-2). El material estudiado procede del Paraje Natural Acantilados de Maro-Cerro Gordo (Granada, España), donde fue hallado sobre *R. officinalis*. La inferencia filogenética establece una relación trófica correcta entre esta especie de *Chrysolina* y la labiada *Rosmarinus officinalis* L. ( $pp = 0,99$ ).



**Figura 4.3-2.** *Chrysolina americana* sobre *Rosmarinus officinalis*. a) Adulto. Parc Natural del Cap de Creus (Girona, España). b) Larva. Parque Natural de las Sierras de Tejeda, Almijara y Alhama (Málaga-Granada, España) (Fotografías: J. A. Jurado-Rivera).

En la localidad de colecta es posible encontrar dos de las tres especies de *Rosmarinus* L. presentes en la Península Ibérica: *R. officinalis* y *R. tomentosus* Huber-Morath et Maire (Flora Ibérica, FI en adelante). Tan sólo se han incluido representantes de la especie *R. officinalis* en el análisis, por lo que no podemos descartar una relación trófica con *R. tomentosus* hasta que se disponga de secuencias



para el intrón *trnL* de esta última planta en la base de datos. Salvando esta objeción, el resultado obtenido demuestra una clara relación trófica entre *C. americana* y el género *Rosmarinus*.

### ***Chrysolina quadrigemina* (Suffrian, 1851) (árbol 3)**

La especie circummediterránea *C. quadrigemina* se alimenta de *Hypericum* L. (Jolivet y Petitpierre, 1976; Bourdonné y Doguet, 1991), lo que queda de manifiesto en su atribución subgenérica (*Hypericia* Bedel, 1899). Esta asociación trófica es bien conocida y la especie se utiliza comúnmente como control biológico de *H. perforatum* L. en áreas donde la planta ha sido introducida, como Canadá, EE.UU. o Australia (e.g. Chepherd, 1985; Campbell y McCaffrey, 1991; Schoeps *et al.*, 1996). El material estudiado procede de las proximidades de la ermita de Nossa Senhora da Assunção (Bragança, Portugal). La localidad de colecta pertenece a la provincia histórica de Trás-Os-Montes y Alto Douro, donde se han citado nueve especies de *Hypericum* entre las cuales se debe encontrar la planta hospedadora del ejemplar examinado: *H. calycinum* L., *H. androsaemum* L., *H. undulatum* Schousb. ex Willd., *H. humifusum* L., *H. linariifolium* Vahl, *H. pulchrum* L., *H. montanum* L., *H. tomentosum* L. y *H. elodes* L. (FI).

La inferencia filogenética obtenida asigna la alimentación de este crisomelino al clado de la familia Clusiaceae Lindley, nom. cons., donde la secuencia problema aparece situada junto a la única especie del género *Hypericum* L. incluida en el análisis: *Hypericum kamtschaticum* Ledeb. (*pp* = 1).

El hecho de que en el momento de extraer la información de la base de datos las secuencias *trnL* de Clusiaceae se restringiesen únicamente a la especie *H. kamtschaticum* impide establecer con total seguridad la pertenencia de la secuencia al género *Hypericum*, aunque la proximidad evolutiva y la escasa divergencia entre las secuencias de la planta hospedadora y este género de Clusiaceae prácticamente garantizan que la inferencia es correcta. La relación se resolverá con mayor precisión a medida que se incremente la información relativa a esta familia en la base de datos.

***Chrysolina viridana* (Küster, 1844) (árbol 4)**

Esta especie está distribuida en los países del Mediterráneo occidental incluyendo las islas mayores y su alimentación se ha asociado a labiadas del género *Mentha* L. (y, como en el caso anterior, esto queda incluso reflejado en su atribución subgenérica: *Menthastriella* Bechyné, 1950) (Jolivet y Petitpierre, 1976; Bourdonné y Doguet, 1991). El espécimen estudiado se colectó sobre *Mentha* sp. en un sistema de vegetación riparia próximo a la localidad de Riofrío (Granada, España). El género *Mentha* se compone de una veintena de especies, cinco de las cuales habitan en la provincia de Granada: *M. pulegium* L., *M. aquatica* L., *M. longifolia* (L.) Huds., *M. suaveolens* Ehrh. y *M. spicata* L. En cualquier caso, las especies de *Mentha* presentan una alta frecuencia de hibridación interespecífica que puede dar lugar a todo un complejo de formas intermedias (FI), lo que dificulta la determinación de una relación trófica concreta a nivel específico. El resultado obtenido en nuestro análisis pone de manifiesto una clara relación trófica con la familia Lamiaceae, subfamilia Nepetoideae, tribu Mentheae ( $pp = 1$ ). En particular, la secuencia problema aparece ubicada entre las dieciséis especies del género *Mentha* L. incluidas en el análisis ( $pp = 1$ ), detectándose además una especial relación con el clado conformado por las especies *M. suaveolens*, *M. spicata*, *M. longifolia* y una especie de menta no identificada ( $pp = 0,74$ ).

Las especies de *Mentha* incluidas en el clado inferido están representadas en el elenco florístico granatense, si bien los valores de probabilidad posterior recuperados no permiten establecer con cual de ellas la relación es más estrecha.

***Chrysomela collaris* Linnaeus, 1758 (árbol 5)**

La descripción original por Linneo de esta especie típicamente centroeuropea de *Chrysomela* ya indicaba que aparecía asociada a Salicáceas, una asociación que se ha ido confirmando hasta la actualidad (e.g., Karabulut *et al.*, 2005). El resultado filogenético obtenido confirma la relación trófica de esta especie con la familia Salicaceae Mirbel, nom. cons. ( $pp = 0,97$ ), donde la secuencia problema aparece ubicada entre las especies de los géneros *Salix* L. y *Chosenia* Nakai ( $pp = 1$ ), y más concretamente en el clado de las especies *Chosenia arbutifolia* (Pall.) A.K.Skvortsov, *S. arctica* Pall., *S. caprea* L., *S. glauca* L., *S. polaris* Wahlenb., *S. purpurea* L., *S.*

*reticulata* L., *S. rotundifolia* Trautv., *S. sericea* Marshall, *S. triandra* L. y *S. viminalis* L. ( $pp = 0,79$ ).

*Chosenia* es un género de Salicaceae erigido a partir de la especie *S. splendida* Nakai (Nakai, 1920). Análisis filogenéticos de índole molecular basados en el gen cloroplástico *rbcL* han demostrado (como lo hacen aquí los de *trnL*) que no existen razones para separar ambos géneros, ya que son entidades taxonómicas evolutivamente muy próximas y que conforman un linaje fuertemente monofilético (Azuma *et al.*, 2000).

El ejemplar de *C. collaris* estudiado procede de la cadena montañosa de Kurai en la provincia de Altai (Rusia). La inferencia realizada no permite establecer la planta hospedadora hasta el nivel específico, si bien el resultado es totalmente congruente con la información bibliográfica. En cualquier caso, existen citas bibliográficas de esta especie sobre numerosas especies de *Salix*, algunas de las cuáles no se han citado más arriba, además de sobre el género *Populus* L., estrechamente emparentado con *Salix* (Olivier, 1807).

### ***Gonioctena olivacea* (Forster, 1771) (árbol 6)**

*Gonioctena olivacea* es una especie ampliamente extendida en Europa y que se ha asociado en su ámbito de distribución a leguminosas (Marsham, 1802) de los géneros *Cytisus* L., *Genista* L., *Laburnum* Medik., *Lupinus* L. e incluso *Ulex* L. El material estudiado procede del Arroyo de Santiago de la Espada (Nerpio, Albacete) donde fue colectado sobre *Cytisus scoparius* (L.) Link, una especie de leguminosa a la que se ha asignado la alimentación de esta especie de crisomélido (Petitpierre, 1994, 1997; Mardulyn *et al.*, 1997). La relación trófica inferida incluye las familias Fabaceae Lindley, nom. cons., Caprifoliaceae Jussieu, nom. cons. y Loasaceae Jussieu, nom. cons. ( $pp = 1$ ).

Es importante señalar que la búsqueda *blastn* tan sólo recuperó un único representante en sendas familias Caprifoliaceae y Loasaceae, perteneciendo las 98 secuencias restantes a la familia Fabaceae. No se consigue una resolución hasta el nivel de género o de especie en este análisis debido a que únicamente se disponía de la secuencia del *loop* P6 del intrón *trnL*, la cual es más corta y menos informativa que la del intrón *trnL* completo. Por otro lado, en el momento de extraer la información de

la base de datos no existían secuencias del intrón *trnL* para la especie *C. scoparius*, de modo que su relación con la secuencia problema no ha podido ser evaluada.

### ***Gonioctena variabilis* (Olivier, 1790) (árbol 7)**

Esta otra especie de *Gonioctena* es endémica de los países del extremo más occidental del Mediterráneo y al igual que la anterior ha sido citada sobre una diversidad de Fabaceae, principalmente sobre el género *Genista* (Mardulyn *et al.*, 1997). El espécimen estudiado procede del Arroyo de Santiago de la Espada (Nerpio, Albacete), donde fue hallado sobre *Genista scorpius* (L.) D.C. La filogenia para este ejemplar, que en esta ocasión se basa en las secuencias *trnL* completas, muestra una estrecha relación trófica con la familia Fabaceae, tribu Genisteeae Benth. ( $pp = 1$ ), más concretamente con la especie *Genista scorpius* ( $pp = 0,99$ ).

En la flora ibérica existen 39 especies de *Genista*, 24 de las cuales están representadas entre las 55 que se han incluido en nuestro análisis; en la provincia de Albacete se han citado once especies de *Genista*: *G. anglica* L., *G. hirsuta* Vahl, *G. longipes* Pau, *G. polyanthos* R. Roem ex Willk., *G. pseudopilosa* Coss., *G. pumilla* (Debeaux *et* É.Rev. ex Hervier) Vierh., *G. scorpius*, *G. spartioides* Spach, *G. tinctoria* L., *G. umbellata* (L'Her.) Dum.Cours. y *G. valentina* (Willd. ex Spreng.) Steud. (FI). A excepción de *G. longipes* y *G. umbellata*, las secuencias de todas ellas han sido incluidas en la matriz de datos estudiada, habiéndose detectado una relación altamente soportada únicamente con la especie *G. scorpius*. Atendiendo a la clasificación inicialmente propuesta por Gibbs (1966) y posteriormente revisada mediante análisis filogenéticos de índole molecular por Pardo *et al.* (2004) mediante el estudio de genes tanto nucleares (ITS) como cloroplásticos (espaciador intergénico *trnL-trnF*), *G. scorpius* pertenece al subgénero *Genista* sección *Scorpioides*. La procedencia de la secuencia problema de cualquiera de las dos especies presentes en la provincia de Albacete no incluidas en análisis puede ser descartada, ya que *G. longipes* pertenece también al subgénero *Genista* pero se incluye en la sección *Erinacoides*, mientras que *G. umbellata* es propia del subgénero *Spatocarpus* sección *Cephalospartum*. En caso de provenir la secuencia problema de alguna de estas dos especies, se habría detectado una relación con alguno de los miembros de sus respectivas secciones botánicas presentes en el árbol.

***Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824)** (árbol 8)

*L. decemlineata*, el escarabajo de la patata, es un insecto bien conocido ya que constituye una plaga agrícola de distribución mundial y ha sido objeto de detallados estudios etológicos, fisiológicos y ecológicos tanto en Norte América como en Europa (Jermy, 1994). Se atribuye a esta especie un carácter oligófago sobre diferentes especies de solanáceas, entre las que destaca *S. tuberosum* L. (Koch, 1992; Jermy, 1994). El ejemplar utilizado en nuestro estudio fue colectado en las inmediaciones de Jayena (Granada, España) cuando se alimentaba sobre una planta de *S. tuberosum*.

El resultado del análisis filogenético muestra una clara asociación con la familia Solanaceae Jussieu, nom. cons., subfamilia Solanoideae ( $pp = 1$ ). La topología obtenida posiciona a la secuencia problema junto a especies del género *Solanum* L., aunque esta relación carece de soporte debido probablemente a la escasa variabilidad que exhiben para este marcador las diferentes especies del citado género (promedio  $p\text{-distance} = 0,006 \pm 0,001$ ).

***Phratora vitellinae* (Linnaeus, 1758)** (árboles 9 y 10)

Esta especie está ampliamente distribuida en toda la región paleártica (excepto en el Norte de África) y en todo su ámbito de distribución se ha citado sobre diversas especies de *Salix* o de *Populus* (Rowell-Rahier, 1984; Soetens y Pasteels, 1994). El material estudiado fue colectado concretamente sobre *Salix bicolor* Willd. en el Valle de Arán (Lérida, España).

Los árboles obtenidos tanto a partir de la secuencia del intrón *trnL* (árbol 8) como con el *loop* P6 (árbol 9) muestran una clara relación con la familia Salicaceae ( $pp = 1$ , en ambos casos). La corta longitud de este último fragmento (97 pb) impide extraer una inferencia de planta hospedadora resuelta a los niveles genérico o específico. Pero en el caso del primer marcador es posible concretar la inferencia al clado constituido por las quince especies del género *Salix* y la única especie de *Chosenia* (pero ver discusión para *C. collaris*) incluidas en el análisis ( $pp = 1$ ), recuperándose una relación fuertemente soportada con el grupo *S. alba* L. y *S. pentandra* L. ( $pp = 0,99$ ).

Las especies *S. alba*, *S. pentandra* y *S. babylonica* L. representan un clado monofilético (Azuma *et al.*, 2000) al que posiblemente también pertenezca la planta hospedadora del ejemplar de *P. vitellinae* estudiado.

***Plagiodera versicolora* (Laicharting, 1781) (árbol 11)**

La alimentación de *Plagiodera versicolora*, una especie Holártica, está vinculada a los géneros *Salix* y *Populus* (Koch, 1992; Wade, 1994; Cabrera, 2004). En consonancia, el ejemplar estudiado fue colectado en Vilariño Frió (Ourense, España) sobre *Salix sp.*

Al igual que sucede con *Phratora vitellinae*, se infiere una estrecha relación trófica con la familia Salicaceae ( $pp = 1$ ), concretamente con el clado constituido por las quince especies del género *Salix* y la única especie de *Chosenia* (un *Salix* a todos los efectos, *vide supra*) incluidas en el análisis ( $pp = 1$ ), manifestándose un vínculo soportado con el grupo *S. alba* y *S. pentandra* ( $pp = 0,99$ ). Este resultado es idéntico al discutido previamente para *P. vitellinae*, de modo que no solamente se confirma el trofismo de *P. versicolora* sobre el género *Salix*, sino que además es posible relacionar la planta hospedadora concreta con el grupo de especies monofiléticas constituido por *S. alba*, *S. pentandra* y *S. babylonica*.

**4.3.4.2.- Aplicación del test: Inferencias tróficas para *Chrysomelinae* australianos**

Una vez verificada la eficacia del método se procedió a su aplicación en un amplio grupo de crisomelinos procedentes de Australia. Por motivos de síntesis y organización, los resultados que a continuación se discuten están ordenados en función de las distintas familias vegetales inferidas.

**APOCYNACEAE Jussieu, nom. cons.**

Se ha detectado una relación trófica con la familia Apocynaceae en dos de los géneros de *Chrysomelinae* australianos estudiados: *Peltoschema* Reitter, 1880 y *Phyllocharis* Dalman, 1824. En todos los casos la inferencia obtenida se refiere al clado conformado por miembros de la tribu Echiteae Bartl., donde se puede apreciar

una remarcable proximidad de la secuencia problema a los géneros *Artia* Guillaumin, *Parsonsia* R.Br. y *Prestonia* R.Br. ( $pp \geq 0,80$ ).

Estos resultados constituyen la primera cita de trofismo sobre Apocynaceae para la fauna australiana de Chrysomelinae, no siendo así para el conjunto mundial de la subfamilia, ya que la planta *Prestonia isthmica* Woodson se ha relacionado con el género neotropical *Doryphora* Illiger, 1807 en Costa Rica (Eberhard, 1981).

La explotación de las apocynáceas como recurso trófico es un hecho relativamente frecuente en otras subfamilias de Chrysomelidae, donde esta relación se ha podido constatar en varios representantes de grupos tales como Alticinae, Cassidinae, Eumolpinae y Galerucinae (Jolivet y Hawkeswood, 1995).

### ***Peltoschema* Reitter, 1880**

El género *Peltoschema* (Figura 4.3-3) se ha descrito como con alimentación exclusiva sobre Fabaceae (géneros *Acacia* Miller, *Dillwynia* Sm., *Jacksonia* R.Br. ex Sm., *Oxylobium* Andrews nom. cons. and *Pultenaea* Sm.) (Reid, 2006). La relación trófica con la familia Apocynaceae detectada para la especie *Peltoschema turbata* (Chapuis, 1877) constituye una de las tres excepciones halladas en este trabajo a este tipo de alimentación.



**Figura 4.3-3.** *Peltoschema* sp., New England National Park (NSW, Australia) (Fotografía: J. A. Jurado-Rivera)

***Peltoschema turbata* (Chapuis, 1877) (árbol 12)**

El resultado obtenido vincula el trofismo de esta especie con la familia Apocynaceae ( $pp = 1$ ), más concretamente con el clado conformado por las especies de los géneros *Artia*, *Parsonsia* y las especies de *Prestonia* incluidas en el análisis excepto *P. riedelii* Markgr. ( $pp = 0,84$ ), todas ellas relativas a la subfamilia Apocynoideae, tribu Echiteae. Este resultado concuerda con la monofilia demostrada para el clado constituido por los géneros *Artia*, *Parsonsia* y *Prestonia* mediante el análisis combinado de cinco marcadores moleculares cloroplásticos (intrón *trnL* y espaciador génico *trnL-trnF*, intrón *rpl16*, intrón *rps16*, *matK* e intrón *trnK*) y 16 caracteres morfológicos llevado a cabo por Livshultz *et al.* (2007). La especie *P. riedelii* está muy relacionada con el género *Rhodocalyx* Müll.Arg. (Ezcurra *et al.*, 1992; Livshultz *et al.*, 2007), lo que está en sintonía con la posición filogenética alejada del clado inferido que ocupa dicha especie en nuestro árbol.

El espécimen de *P. turbata* estudiado fue colectado en Yalgorup National Park (Western Australia, Australia), localidad que está incluida en el área de distribución de la familia Apocynaceae en Western Australia. Atendiendo a la procedencia geográfica de la muestra podemos descartar de partida cualquier inferencia trófica sobre las especies de los géneros *Artia* y *Prestonia*, los cuales son endémicos de Nueva Caledonia y del continente americano respectivamente (Livshultz *et al.*, 2007). *Parsonsia* es el único género de la tribu Echiteae presente en Western Australia (*FloraBase, the Western Australia Flora*, FBWAF en adelante), y *Parsonsia diaphanophleba* F.Muell. representa a la única especie del género citada en la localidad de colecta (FBWAF). La secuencia de esta última no fue incluida en la matriz de datos empleada en nuestro análisis por no estar disponible en el momento de extraer la información de la base de datos, de modo que su relación con la secuencia problema no ha podido ser evaluada. Pero la información filogenética junto con la florística hacen de *P. diaphanophleba* la planta hospedadora más probable para el ejemplar de *P. turbata* estudiado.

***Phyllocharis* Dalman, 1824**

Las plantas hospedadoras previamente descritas para las especies de *Phyllocharis* pertenecen a las familias Lamiaceae y Solanaceae (Reid, 2006), por tanto nuestros resultados, vinculando dos de las tres especies estudiadas de *Phyllocharis*



con la familia Apocynaceae, constituyen la primera cita trófica sobre esta familia para este género de Chrysomelinae.

*Phyllocharis* es uno de los géneros que se han incluido en el denominado “grupo de *Phyllocharis*” (Reid, 2006). Existen otros miembros pertenecientes a este grupo cuya alimentación conviene destacar, como son *Chalcolampra* Blanchard, 1853 (Asteraceae Martynov, nom. cons.: Reid 2006; Pittosporaceae R.Br., nom. cons.: este trabajo; Lamiaceae: Reid, 1993; y Scrophulariaceae Jussieu, nom. cons.: Reid, 1993), *Eulina* Baly, 1855 (Oleaceae Hoffmannsegg et Link, nom. cons.: Reid, 2006 y este estudio; y Pittosporaceae: Reid, 2006), *Johannica* Blackburn, 1888 (Bignoniaceae Jussieu: Monteith, 1991; Reid, 1991; este estudio) y *Phola* Weise, 1890 (Verbenaceae Jaume Saint-Hilaire nom. cons.: Jolivet y Hawkeswood, 1995; Reid, 2006), ya que las familias Bignoniaceae, Lamiaceae, Oleaceae y Verbenaceae son evolutivamente próximas perteneciendo todas ellas al orden Lamiales (Soltis et al., 2005). El orden Gentianales es el grupo hermano de Lamiales e incluye a la familia Apocynaceae (Soltis et al., 2005), lo que sitúa el trofismo de los integrantes del “grupo de *Phyllocharis*” en esta rama evolutiva de las angiospermas.

#### ***Phyllocharis melanospila* Baly, 1862 (árbol 13)**

Se establece una relación trófica con la familia Apocynaceae ( $pp = 1$ ), ubicándose la secuencia problema, al igual que en el caso de *Peltoschema turbata* (vide supra), entre las especies de los géneros *Artia*, *Parsonsia* y parte de las *Prestonia* incluidas en el análisis ( $pp = 0,8$ ), todas ellas pertenecientes a la tribu Echiteae. Se aprecia una relación altamente soportada con la especie *Parsonsia eucalyptophylla* F.Muell. ( $pp = 0,7$ ).

El material estudiado procede de las proximidades de Cascade, en la región más septentrional de New South Wales (Australia). En la localidad de colecta se tiene constancia de la existencia de ocho géneros de la familia Apocynaceae (Flora of New South Wales, FNSW en adelante) de los cuales únicamente *Parsonsia* pertenece a la tribu Echiteae. Incluso a nivel estatal (y nacional), donde existen registros de 26 géneros de Apocynaceae, de nuevo *Parsonsia* es el único representante de esta tribu, lo que contribuye a reforzar nuestra inferencia sobre este género vegetal. En la localidad de colecta se han citado las siguientes especies de *Parsonsia*: *P. brownii* (Britten) Pichon, *P. dorrigoensis* J.B.Williams, *P. induplicata* F.Muell., *P. lanceolata*

R.Br., *P. lilacina* F.Muell., *P. purpurascens* J.B.Williams, y *P. straminea* (R.Br.) F.Muell. (FNSW). Ninguna de estas especies contaba con la secuencia del intrón *trnL* en la base de datos en el momento de realizar los análisis, por lo que todas ellas deben considerarse como posibles candidatas a ser planta hospedadora del ejemplar estudiado de *Phyllocharis melanospila*.

#### ***Phyllocharis wollumbina* (Daccordi, 2003) (árbol 14)**

El análisis filogenético sitúa a la secuencia *trnL* problema de esta especie con la familia Apocynaceae ( $pp = 0,98$ ). La secuencia problema aparece incluida en un clado de la tribu Echiteae entre las especies *Artia balansae* (Baill.) Pichon in Guillaumin, *Parsonsia crebriflora* Baill., *P. eucalyptophylla*, *P. ferruginea* J.B.Williams, *P. flexuosa* Baill., *P. lata* Markgr., *P. longiflora* Guillaumin, *P. oligantha* (K.Schum.) D.J.Middleton, *Prestonia coalita* Vell.(Woodson), *P. lagoensis* (Müll.Arq) Woodson, *P. mollis* H.B et K., *P. portobellensis* (Beurl.) Woodson y *P. robusta* Rusby ( $pp = 0,93$ ).

El ejemplar de *P. wollumbina* estudiado procede de Mount Warning National Park, una localidad separada de la anterior, pero también del extremo septentrional de New South Wales (Australia). En la localidad de colecta se han citado tres especies de la familia Apocynaceae: *Ochrosia moorei* (F.Muell.) F.Muell. ex Benth, *Melodinus acutiflorus* F.Muell. y *Parsonsia fulva* S.T.Blake (FNSW). De ellas, únicamente *Parsonsia fulva* pertenece a la tribu Echiteae (y de hecho, como ya se ha dicho con anterioridad, el género *Parsonsia* es el único Echiteae en New South Wales). Como la secuencia de esta especie no ha podido ser incluida en el análisis, desconocemos su relación con la secuencia problema, pero por lo dicho anteriormente, parece la asociación trófica más probable para el ejemplar de *Phyllocharis wollumbina* examinado.

#### **ASTERACEAE Martynov, nom. cons.**

Han sido tres los géneros de crisomelinos en los que se han hallado secuencias del intrón *trnL* pertenecientes a la familia Asteraceae: *Ethomela* Lea, 1916, *Peltoschema* y *Rhaebosterna* Weise, 1916. Hasta el momento *Chalcolampra* ha sido el único género australiano de Chrysomelinae que había sido relacionado con esta familia (Reid, 2006).

Las asteráceas constituyen una importante fuente de recursos tróficos para numerosos crisomélidos, entre los que se incluyen especies de los géneros de Chrysomelinae *Calligrapha* Chevrolat, 1836, *Chrysolina* Motschulsky, 1860, *Crosita* Motschulsky, 1860, *Cyrtonus* Latreille, 1829, *Elytrosphaera* Chevrolat, 1843, *Oreina* Chevrolat, 1837, *Phaedon* Latreille, 1829, *Timarcha* Latreille, 1829 y *Zygogramma* Chevrolat, 1837 (Jolivet y Hawkeswood, 1995).

### ***Ethomela* Lea, 1916**

Se han estudiado dos ejemplares de *Ethomela* pertenecientes a la especie *E. podagrosa* (Lea, 1903) y a una segunda especie sin identificar. En esta última se han hallado dos secuencias *trnL* diferentes que hemos podido asociar a dos familias de angiospermas (Asteraceae y Fabaceae).

Las especies de *Ethomela* se suelen encontrar en el suelo, generalmente bajo piedras o entre hierba en zonas de prado o sotobosque, lo que sumado a su pequeño tamaño y escasa abundancia hace de estos crisomelinos un grupo de difícil estudio, con una biología poco conocida. La única cita de trofismo publicada para *Ethomela* establece una correspondencia trófica con *Scaevola revoluta* subsp. *revoluta* R.Br. (Goodeniaceae R.Br., nom. cons.) (Daccordi, 2003b), de modo que los resultados obtenidos en nuestro trabajo representan una importante contribución al conocimiento de la ecología de *Ethomela*. Asteraceae y Goodeniaceae son familias botánicas filogenéticamente muy próximas dentro del orden Asterales (Soltis *et al.*, 2005).

### ***Ethomela podagrosa* (Lea, 1903) (árbol 15)**

El árbol reconstruido para el *trnL* caracterizado en esta especie de *Ethomela* establece una relación con la familia Asteraceae ( $pp = 0,85$ ) y aunque con bajo soporte, la secuencia problema aparece ubicada junto a los géneros de la subfamilia Asteroideae *Chondropyxis* D.A.Cooke (tribu Gnaphalieae), *Erodiophyllum* F.Muell. (tribu Astereae) y *Olearia* Moench nom. cons. (tribu Astereae) ( $pp = 0,63$ ).

Las especies de la tribu Astereae representadas en el análisis aparecen segregadas en diferentes clados entre los que se integran las dos especies de la tribu Gnaphalieae disponibles para el análisis. El hecho de que tal topología carezca de

soporte y que la monofilia e independencia de ambas tribus haya sido previamente demostrada (Kim y Jansen, 1995; Bayer y Starr, 1998; Liu *et al.*, 2002) podría ser indicativo bien de una falta de resolución a este nivel taxonómico del marcador molecular empleado o bien de un artefacto derivado del sesgo muestral.

En todo caso, parece que la secuencia problema está relacionada con la de las tribus Astereae, Gnaphalieae, o a cualquier otro linaje de la subfamilia Asteroideae evolutivamente próximo a éstas como podrían ser Anthemideae, Calenduleae, Eupatorieae, Helenieae, Heliantheae, Plucheeae (Kim y Jansen, 1995; Bayer y Starr, 1998; Liu *et al.*, 2002). Inuleae y Senecioneae no figuran en la anterior lista de posibles tribus hospedadoras ya que se han incluido representantes de ambos grupos en el análisis sin que se observe relación especial alguna entre estos y la secuencia problema.

El material estudiado procede de Mount Kosciuszko National Park (New South Wales, Australia). En las proximidades del área de colecta se han citado siete especies incluidas en la subfamilia Asteroideae: *Celmisia pugioniformis* M.Gray *et* Given, *Craspedia aurantia* J.Everett *et* J.Thompson, *Leptorhynchos squamatus* (Labill.) Less., *Olearia algida* Wakef., *Ozothamnus alpinus* (Wakef.) Anderb., *Podolepis robusta* (Maiden *et* Betche) J.H.Willis y *Senecio pectinatus* DC. (FNSW). Podemos descartar la pertenencia de la secuencia problema a *S. pectinatus* ya que, como se ha indicado más arriba, no hemos detectado ninguna relación significativa con las especies de *Senecio* L. existentes en la matriz de datos analizada. El resto de especies pertenecen a las tribus Astereae y Gnaphalieae, por lo que son posibles candidatos a representar la planta o plantas hospedadoras del ejemplar de *Ethomela podagrosa* estudiado, y la limitación para descubrirlas con este método viene impuesta por la ausencia del gen homólogo al que estudiamos en las bases de datos públicas. De todas formas, conviene notar aquí que aunque proponemos las tribus Astereae y Gnaphalieae como potenciales candidatas a incluir la planta hospedadora, las relaciones de soporte obtenidas en este análisis impiden afirmar esta asociación con confianza.

#### ***Ethomela sp.* (JAJ63) (árbol 16)**

Los resultados obtenidos para esta especie sin identificar de *Ethomela* ponen de manifiesto una clara vinculación con la familia Asteraceae ( $pp = 1$ ), detectándose

además, a diferencia del caso anterior, una estrecha relación con la secuencia de *Craspedia variabilis* J.Everett y Doust ( $pp = 1$ ).

Este ejemplar de *Ethomela* fue colectado en Mount Kosciuszko National Park (New South Wales, Australia), donde se tiene constancia de la existencia de al menos cuatro especies del género *Craspedia* G.Forst.: *C. alba* J.Everett et J.Thompson, *C. aurantia*, *C. costiniana* J.Everett et J.Thompson y *C. maxgrayi* J.Everett et J.Thompson (Hill y Pickering, 2006), y entre las que muy probablemente se halla la planta hospedadoras del ejemplar de *Ethomela* estudiado.

Este mismo ejemplar ha producido en adición secuencias de *trnL* que hemos podido asociar con la familia Fabaceae (página 333).

### ***Peltoschema* Reitter, 1880**

Se han encontrado dos tipos de secuencias del intrón *trnL* en *Peltoschema maculiventris* (Lea, 1924) que relacionan a esta especie con las familias Asteraceae y Fabaceae. Este caso constituye la segunda de las tres excepciones halladas en el presente trabajo para el género *Peltoschema* con respecto a la alimentación exclusiva sobre Fabaceae descrita por Reid (2006), que se suma a la ya mencionada de *P. turbata* sobre Apocynaceae. Los resultados obtenidos para las especies estudiadas de *Peltoschema* demuestran la existencia de un comportamiento oligofágico en al menos algunos de los representantes del género.

### ***Peltoschema maculiventris* (Lea, 1924) (árbol 17)**

El resultado obtenido es muy similar al discutido en el caso de *Ethomela podagrosa*. El árbol recuperado establece una relación con la familia Asteraceae, en concreto de las subfamilias Asteroideae, Cichorioideae y Carduoideae ( $pp = 0,95$ ) y aunque con bajo soporte, la topología obtenida sitúa la secuencia problema junto a los géneros de la subfamilia Asteroideae *Chondropyxis* (tribu Gnaphalieae), *Erodiophyllum* (tribu Astereae) y *Olearia* (tribu Astereae) ( $pp = 0,63$ ). En principio no pertenece a ninguna de las otras dos subfamilias, pues éstas están separadas y bien soportadas ( $pp = 1$ ) dentro de Asteroideae. Las limitaciones respecto a esta inferencia son las mismas que las precisadas para *E. podagrosa*, más bien condicionadas por exclusión de candidatos que por asignación directa.

A diferencia del caso de *Ethomela*, la procedencia geográfica de la muestra de *P. maculiventris* impone unas constricciones muy útiles a la hora de proponer unos potenciales hospedadores para esta especie. El material estudiado fue hallado en The Rock Nature Reserve (New South Wales, Australia), donde se han citado apenas tres especies de Asteraceae, todas ellas pertenecientes a la subfamilia Asteroideae: *Senecio garlandii* F.Muell. ex Belcher, *Sigesbeckia australiensis* D.L.Schulz y *Stuartina muelleri* Sond. (FNSW). La pertenencia de la secuencia problema a la especie *S. garlandii* (tribu Senecioneae:  $pp = 0,96$ ) puede ser descartada pues se han incluido dos especies de *Senecio* en el análisis sin que se haya recuperado una relación significativa con ninguna de ellas o con la tribu, por lo que *Sigesbeckia australiensis* y *Stuartina muelleri* representan por el momento los dos candidatos con mayor probabilidad de ser la planta hospedadora del ejemplar estudiado de *P. maculiventris*.

### ***Rhaebosterna* Weise, 1916**

Se ha estudiado un ejemplar de la especie *R. sciola* Weise, 1916, en el que se han hallado dos secuencias diferentes para el intrón *trnL* que lo vinculan con las familias Asteraceae y Myrtaceae Jussieu, nom. cons. La inferencia sobre la primera de estas familias constituye una nueva aportación para el conocimiento de este pequeño género endémico de Australia, mientras que en el caso de la segunda se corrobora la información previa registrada en la bibliografía (Reid, 2006).

### ***Rhaebosterna sciola* Weise, 1917 (árbol 18)**

La pertenencia de la secuencia *trnL* obtenida a partir de *R. sciola* a la familia Asteraceae está muy bien soportada en el árbol filogenético obtenido ( $pp = 1$ ). Pero más concretamente, se recupera una relación relativamente bien soportada con los géneros de la subfamilia Asteroideae *Chondropyxis* (tribu Gnaphalieae), *Erodiophyllum* (tribu Astereae) y *Olearia* (tribu Astereae) ( $pp = 0,73$ ). Este resultado es similar al de las dos especies anteriores, aunque la inferencia sobre Astereae o Gnaphalieae está mejor soportada estadísticamente. Por este motivo se puede proponer con más seguridad que la planta nutricia de la especie pertenece a alguna de estas tribus, o de linajes evolutivamente próximos, como Anthemideae, Calenduleae, Eupatorieae,

Helenieae, Heliantheae, Plucheeae (Kim y Jansen, 1995; Bayer y Starr, 1998; Liu *et al.*, 2002).

El material estudiado procede de la localidad de Mildura (Victoria, Australia) donde se han citado cinco especies relativas a la subfamilia Asteroideae: *Calendula arvensis* L., *Calotis cuneifolia* R.Br., *Hyalosperma semisterile* (F.Muell.) Paul G.Wilson, *Leiocarpa leptolepis* (DC.) Paul G.Wilson y *Olearia rudis* (Benth.) F.Muell. ex Benth. (FNSW) y entre las que podría encontrarse la asterácea de la que se alimenta *Rhaebosterna sciola*.

## **BIGNONIACEAE Jussieu**

Las bignoniáceas constituyen una importante fuente de alimento para un amplio grupo de crisomélidos pertenecientes a diversas subfamilias, tales como Alticinae, Cassidinae *sensu lato*, Eumolpinae y Galerucinae (Jolivet y Hawkeswood, 1995). En cuanto a la subfamilia Chrysomelinae se refiere, *Johannica* constituye el único género para el se tiene constancia de esta relación trófica.

### ***Johannica* Blackburn, 1888**

#### ***Johannica gemellata* (Westwood, 1849) (árbol 19)**

El género *Johannica* presenta un área de distribución que abarca desde la región central de New South Wales hasta el norte del estado de Queensland (Reid, 2006). Hemos estudiado la única especie del género, *J. gemellata*, la cual ha sido previamente citada alimentándose sobre la especie *Pandorea pandorana* Andrews (Steenis) (Monteith, 1991; Reid, 1991). Ciertamente, los ejemplares de *J. gemellata* colectados fueron hallados única y exclusivamente sobre pies de plantas del género *Pandorea* (Figura 4.3-4). Además, el individuo aquí examinado procede de Woko National Park (New South Wales, Australia) donde tan sólo habita la especie *Pandorea pandorana* (Andrews) Steenis (C.A.M. Reid comunicación personal).

La filogenia reconstruida a partir de secuencias *trnL* incluyendo la secuencia obtenida de *J. gemellata* muestra a las bignoniáceas como una entidad parafilética carente de soporte, por incluir Verbenaceae y alguna Avicenniaceae. Este resultado parece más bien un artefacto del análisis debido a una falta de señal filogenética a

este nivel para el marcador utilizado, ya que se ha demostrado que la familia Bignoniaceae es un linaje monofilético (Spangler y Olmstead, 1999). No obstante, el árbol inferido establece una relación bien soportada de la secuencia problema con la especie *Pandorea jasminoides* (Lindl.) Schum. ( $pp = 0,89$ ), lo cual está en sintonía con las citas tróficas previas para *Johannica*, confirmándose el género *Pandorea* como planta hospedadora de *Johannica gemellata*. La presencia en la base de datos de una sola especie de *Pandorea* no permite establecer una hipótesis trófica a nivel específico, si bien el hecho de que en la localidad de estudio únicamente se tenga constancia de la presencia de *P. pandorana* puede ser considerado como una evidencia a favor de esta última como especie hospedadora del ejemplar de *Johannica* estudiado.

Es interesante señalar que la distribución del género *Johannica* en el cuadrante nororiental del Australia coincide con el descrito para dos de las tres especies endémicas de *Pandorea* existentes en Australia: *P. baileyana* (Maiden et R.T.Baker) Steenis (Queensland), *P. pandorana* (todos los estados de Australia) y *P. jasminoides* (Queensland) (Harden, 1991), lo que podría ser indicativo de una relación ecológica muy especializada entre este grupo de crisomelinos y sus plantas hospedadoras.



**Figura 4.3-4.** *Johannica gemellata* sobre *Pandorea pandorana* en Woko National Park (NSW, Australia) (Fotografía: J. A. Jurado-Rivera).



### **CARYOPHYLLACEAE Jussieu, nom. cons.**

Se ha detectado un único caso de afiliación trófica con la familia Caryophyllaceae, que se corresponde con una de las cuatro secuencias para el *loop* P6 del intrón *trnL* halladas en un género de Chrysomelinae aún no descrito y colectado en la expedición a Australia de 2005. Las demás secuencias obtenidas para este ejemplar ponen de manifiesto una relación trófica con las familias Myrtaceae y Solanaceae.

### ***Canobolas* Reid, Jurado-Rivera y Beatson, 2009**

El género *Canobolas* ha sido descrito a partir del material colectado para la elaboración de la presente tesis doctoral. No se dispone de registros de ejemplares alimentándose en la naturaleza (Reid *et al.*, 2009).

### ***Canobolas nobilis* (Lea, 1917) (árbol 20)**

El material estudiado es originario de Mount Canobolas State Recreation Area (New South Wales, Australia) y la filogenia resultante del análisis para una de las secuencias del *loop* P6 demuestra una relación trófica con los miembros de la familia Caryophyllaceae ( $pp = 1$ ), situándose la secuencia problema en el clado conformado por los géneros *Cerastium* L. y *Stellaria* L. ( $pp = 1$ ), donde aparece incluida más concretamente en la rama del grupo de especies de *Stellaria* ( $pp = 0,78$ ).

La elevada señal filogenética que manifiestan las secuencias del *loop* P6 en el caso de Caryophyllaceae genera una topología donde las especies de los diferentes géneros integrantes de la familia conforman clados bien delimitados y soportados. Esta propiedad de los datos contribuye a reafirmar la posición sistemática de la secuencia problema.

En la localidad de origen de la muestra han sido citadas cuatro especies de *Stellaria*: *S. angustifolia* Hook., *S. flaccida* Hook., *S. multiflora* Hook. y *S. pungens* Brongn., y una especie introducida de *Cerastium*, *C. glomeratum* Thuill. (Hunter, 2002). En la actualidad no existen secuencias *trnL* en las bases de datos públicas de ADN para ninguna de ellas y, por tanto, no han podido ser comparadas directamente con nuestra secuencia. Basándonos en el árbol inferido podemos considerar las

especies de *Stellaria* como las candidatas más probables a ser la planta hospedadora del insecto estudiado, excluyendo a *C. glomeratum*. Entre las citadas especies de *Stellaria*, tan sólo *S. flaccida* es propia de la comunidad vegetal de pastizal de claros de bosque (Hunter, 2002) donde todos los ejemplares pertenecientes a este nuevo género fueron colectados, si bien conviene anotar que el carácter oportunista de *S. multiflora* y *S. pungens* podría convertir a estas dos especies en posibles fuentes de alimento.

### **FABACEAE Lindley, nom. cons.**

Son muy numerosos los crisomélidos que utilizan las leguminosas como recurso alimenticio, destacando este grupo botánico como el escogido por la mayoría de las especies de hábitos tanto oligófagos como polífagos, al tiempo que representa una de las principales elecciones dentro de la subfamilia Chrysomelinae (Jolivet y Hawkeswood, 1995). En nuestro estudio basado en *trnL* hemos detectado 23 casos de relación trófica con la familia Fabaceae, que se reparten entre seis de los géneros australianos de Chrysomelinae estudiados: *Callidemum* Blanchard, 1853, *Calomela* Hope, 1840, *Dicranosterna* Motschulsky, 1860, *Ethomela*, *Peltoschema* y *Platymela* Baly 1856. Los resultados obtenidos en relación a los géneros *Ethomela* y *Platymela* constituyen una aportación inédita al conocimiento de sus respectivas biología.

Entre las fabáceas australianas que son empleadas por los crisomelinos como plantas hospedadoras, el género *Acacia* (Figura 4.3-5) ocupa una posición preeminente ya que junto a los géneros de mirtáceas *Eucalyptus* L'Hér. y *Corymbia* K.D.Hills et L.A.S Johnson, todos ampliamente distribuidos y altamente diversificados en Australia, conforman un grupo de plantas sobre las que se alimentan la mayoría de las 750 especies de Chrysomelinae existentes en el continente (Reid, 2006).

La singular importancia de este género para gran número de especies de crisomelinos australianos justifica la breve revisión de su clasificación taxonómica que a continuación se expone en aras de facilitar la interpretación de las inferencias tróficas obtenidas.



**Figura 4.3-5.** *Acacia* sp. en Stanwell Park (NSW, Australia) (Fotografía: J. A. Jurado-Rivera).

El género *Acacia* habita Asia, América, África y Australia (Murphy *et al.*, 2003) y es el segundo género de leguminosas con mayor número de especies (Maslin, 2001). En Australia se conocen unas 950 especies de las aproximadamente 1200 que se cuentan en su área de distribución mundial (Miller y Bayer, 2001), erigiéndose como el género más prolífico en cuanto a número de especies dentro del grupo de las plantas vasculares australianas (Maslin, 2001).

La historia nomenclatural del género *Acacia* ha sido muy compleja incluso desde el momento de su descripción (Maslin *et al.*, 2003), de manera que a lo largo del tiempo se han ido sucediendo diferentes propuestas que van desde (i) el establecimiento de un único género con seis series (Bentham, 1875), pasando por (ii) un solo género constituido por tres subgéneros (Vassal, 1972; Pedley, 1978; Vassal, 1981), seguido de la (iii) subdivisión en tres géneros diferentes (Pedley, 1986), hasta llegar a la última propuesta avalada por estudios moleculares (e.g. Clarke *et al.*, 2000; Robinson y Harris, 2000; Luckow *et al.*, 2003; Miller y Bayer, 2003) donde (iv) se considera *Acacia* como una entidad parafilética que debe ser segregada en al menos

cinco géneros diferentes (Maslin *et al.*, 2003; Miller y Seigler, 2012). Este carácter no monofilético del género *Acacia* se pone de manifiesto en los resultados obtenidos en el presente trabajo. De igual modo se confirma la no monofilia de la tribu Ingeae, tal y como proponen Miller *et al.* (2003).

De los tres subgéneros de *Acacia* clásicamente reconocidos (*sensu* Vassal, 1981), el subgénero *Phyllodineae* constituye la mayor entidad monofilética dentro del género *Acacia* y está integrado por unas 950 especies predominantemente australianas (Murphy *et al.*, 2003), ya que tan sólo 18 de ellas se encuentran fuera de dicho continente (Pedley, 1975). El 99% de las especies de *Acacia* presentes en Australia pertenecen al subgénero *Phyllodineae* (Maslin y Pedley, 1988), por lo que éste es un grupo de gran importancia para la fauna australiana de Chrysomelinae que se alimenta de *Acacia*.

Todas las inferencias tróficas sobre especies del género *Acacia* obtenidas en nuestros análisis se refieren a integrantes del subgénero *Phyllodineae*, para el que Pedley (1978) estableció la clasificación más comúnmente aceptada dividiéndolo en siete secciones cuyos nombres, número de especies y distribuciones en Australia se describen a continuación: (i) sección *Alatae*, 21 especies, regiones templadas del suroeste de Australia; (ii) sección *Botrycephalae*, 42 especies, regiones templadas del este y sureste de Australia; (iii) sección *Juliflorae*, 235 especies, regiones tropical, subtropical y suroeste de Australia, algunas especies en el este y sur de Australia; (iv) sección *Lycopodiifoliae*, 17 especies, Australia tropical y subtropical; (v) sección *Phyllodineae*, 408 especies, regiones templadas del sureste y suroeste de Australia; (vi) sección *Plurinerves*, 212 especies, suroeste y este de Australia; y (vii) sección *Pulchellae*, 27 especies, regiones templadas del suroeste de Australia (Hnatiuk y Maslin, 1988). De todas ellas, tres son numerosas y están ampliamente extendidas (*Juliflorae*, *Phyllodineae* y *Plurinerves*), mientras que las otras cuatro (*Alatae*, *Botrycephalae*, *Lycopodiifoliae* y *Pulchellae*) contienen menos especies y presentan distribuciones más restringidas (Murphy *et al.*, 2003).

### ***Callidemum* Blanchard, 1853**

Se han estudiado dos especies de *Callidemum*, y para una de ellas se infirió una relación con el género *Acacia* (Fabaceae). El trofismo de *Callidemum* sobre el género *Acacia* ya ha sido descrito con anterioridad (Jolivet y Hawkeswood, 1995; Reid,

2006). Otras familias hospedadoras descritas para este género de Chrysomelinae son: Elaeocarpaceae Candolle nom. cons. (*Elaeocarpus* L., *Sloanea* L.), Rutaceae Jussieu nom. cons. (*Citrus* L.), Sapindaceae Jussieu nom. cons. (*Dodonaea* Mill.) y Surianaceae Arnott nom. cons. (*Guilfoylia* F.Muell.) (Reid, 2006).

### ***Callidemum limbatum* (Baly, 1875) (árbol 21)**

Para este ejemplar inferimos una relación trófica con la familia Fabaceae ( $pp = 1$ ), ubicándose la secuencia problema dentro del clado formado por las especies *Acacia falciformis* DC. y *A. verticillata* (L'Hér.) Willd. ( $pp = 0,83$ ), ambas incluidas en el subgénero *Phyllodineae*. Estas dos especies pertenecen a las secciones *Phyllodineae* y *Juliflorae* respectivamente y ambas aparecen más estrechamente relacionadas entre sí ( $pp = 0.81$ ) que con otras especies de sus propias secciones presentes en el árbol. Esta topología está de acuerdo con la idea de estas secciones podrían representar de hecho entidades polifiléticas (Murphy *et al.*, 2003).

El ejemplar estudiado fue colectado en Mount Keira (New South Wales, Australia) sobre una *Acacia*, lo que es congruente con el resultado obtenido. En el área de colecta se han citado las siguientes especies de *Acacia* entre las cuales podría encontrarse la planta hospedadora del ejemplar de *C. limbatum* examinado: *A. baueri* Benth., *A. binervata* DC., *A. bynoeana* Benth., *A. echinula* DC., *A. elata* Cunn. ex Benth., *A. elongata* Sieber ex DC., *A. filicifolia* Cheel et M.B. Welch, *A. irrorata* Sieber ex Sprengel, *A. iteaphylla* F.Muell. ex Benth., *A. leprosa* Sieber ex DC., *A. longifolia* (Andrews) Willd., *A. maidenii* F.Muell., *A. melanoxyton* R.Br. in W.T.Aiton, *A. myrtifolia* (Smith) Willd., *A. obtusifolia* Cunn. in B.Field, *A. paradoxa* DC., *A. saligna* (Labill.) H.L.Wendl., *A. suaveolens* (Smith) Willd., *A. terminalis* (Salisb.) J.F.Macbr. y *A. ulicifolia* (Salisb.) Court. (FNSW). De todas estas especies *A. elata* y *A. melanoxyton* pueden ser descartadas ya que sus secuencias han sido incluidas en el análisis sin que hayan demostrado especial relación con la secuencia problema.

### ***Calomela* Hope, 1840**

Se han estudiado nueve especies del género *Calomela* y en todas ellas se ha recuperado una relación trófica con integrantes del género *Acacia* (Fabaceae), resultado esperable atendiendo a las citas de plantas hospedadoras publicadas

previamente (Reid, 1989, 2006; Jolivet y Hawkeswood, 1995; Hunt *et al.*, 1996). La especificidad trófica de cada especie de *Calomela* parece no estar restringida a una única especie vegetal, pues la mayoría de ellas se ha colectado sobre más de una especie de *Acacia* (Reid, 1989, 1992).

***Calomela bartoni* (Baly, 1856)** (árbol 22)

El árbol obtenido relaciona la secuencia *trnL* encontrada en esta especie con la familia Fabaceae ( $pp = 0,96$ ) y aunque los resultados no permiten establecer una relación soportada con ningún clado concreto de leguminosas, se ha inferido una asociación con representantes del género *Acacia*, subgénero *Phyllodineae*.



**Figura 4.3-6.** *Calomela bartoni* sobre *Acacia dealbata* subsp. *dealbata* en Bulls Head (ACT, Australia) (Fotografía: J. A. Jurado-Rivera).

El espécimen estudiado fue colectado mientras se alimentaba sobre un pie de planta de *A. dealbata* Link subsp. *dealbata* (Figura 4.3-6) (planta determinada por B.R. Maslin, comunicación personal) en Bulls Head (Australian Capital Territory, Australia). A nivel regional, además de *A. dealbata* subsp. *dealbata*, se han citado las especies *A. buxifolia* A.Cunn., *A. falciformis*, *A. gunnii* Benth., *A. kettlewelliae* Maiden, *A. melanoxyton*, *A. obliquinervia* Tindale, *A. parramattensis* Tindale, *A. pravissima*

F.Muell., *A. rubida* A.Cunn. y *A. siculiformis* A.Cunn. ex Benth. (FNSW). La pertenencia de la secuencia problema a cualquiera de las especies *A. falciformis* y *A. melanoxyton* puede ser descartada ya que sus respectivas secuencias se han incluido en el análisis sin que la secuencia problema aparezca estadísticamente relacionada con ellas. En cualquier caso, el árbol filogenético obtenido, los registros florísticos de la zona y los datos de campo son congruentes con el trofismo del ejemplar de *C. bartoni* sobre *A. dealbata* subsp. *dealbata*.

### ***Calomela curtisi* (Kirby, 1818) (árbol 23)**

Ésta es la especie típica del género *Calomela*, con trofismo demostrado sobre *Acacia* (Hunt *et al.*, 1996), y consistentemente para ella se ha detectado una relación con la familia Fabaceae ( $pp = 0,86$ ) y más concretamente junto al clado formado por las especies de *Acacia*: *A. amplexiceps* Maslin, *A. calamifolia* Sweet ex Lindley, *A. colei* Maslin y L.A.J.Thomson, *A. elata*, *A. latisejala* Pedley, *A. mearnsii* De Wild., *A. melanoxyton*, *A. oswaldii* F.Muell., *A. paradoxa*, *A. platycarpa* F.Muell., *A. translucens* Cunn. ex Hook. y *A. tumida* F.Muell. ex Benth ( $pp = 0,77$ ), todas ellas del subgénero *Phyllodineae*.

El ejemplar analizado fue obtenido al varezar una acacia en Vineyard (New South Wales, Australia) donde se han citado las especies *A. binervia* (J.C.Wendl.) J.F.Macbr., *A. brownii* (Poir.) Steud., *A. bynoeana*, *A. decurrens* Willd., *A. elongata*, *A. falcata* Willd., *A. floribunda* (Vent.) Willd., *A. gordonii* (Tindale) Pedley, *A. leiocalyx* (Domin) Pedley, *A. linifolia* (Vent.) Willd., *A. lunata* G.Lodd., *A. parramattensis*, *A. pubescens* (Vent.) R.Br., *A. stricta* (Andrews) Willd. y *A. trinervata* Sieber ex DC. (FNSW). Ninguna de estas especies ha sido incluida en el análisis por lo que desconocemos su posible relación con la secuencia problema. Pero al menos sabemos que *C. curtisi* ha sido citada sobre una de las especies integrantes del clado inferido, *Acacia mearnsii* (Hunt *et al.*, 1996).

### ***Calomela fulvilabris* (Germar, 1848) (árbol 24)**

El árbol recuperado establece el trofismo de esta especie sobre la familia Fabaceae ( $pp = 1$ ) y ubica a la secuencia problema en posición basal al clado de *Acacia adoxa* Pedley y *A. lycopodiifolia* Cunn. ex Hook. ( $pp = 0,86$ ), ambas relativas a

la sección Lycopodiifoliae. La filogenia molecular elaborada por Murphy *et al.* (2003) usando el marcador nuclear ribosomal ITS presenta esta sección como un grupo aparentemente monofilético.

El material estudiado procede de Jerrys Plains (New South Wales, Australia), donde se han citado las especies *A. amblygona* A.Cunn. ex Benth., *A. binervia*, *A. cultriformis* A.Cunn. ex G.Don, *A. decora* Rchb., *A. filicifolia*, *A. fulva* Tindale, *A. homalophylla* A.Cunn. ex Benth., *A. pendula* A.Cunn. et G.Don, *A. piligera* A.Cunn., *A. salicina* Lindl. y *A. undulifolia* A.Cunn. ex G.Lodd. (FNSW). Ninguna de estas especies pertenece a Lycopodiifoliae, lo que parece sugerir un problema de asignación de la secuencia problema a esta sección. Sin embargo, conviene subrayar que su posición basal con respecto a los dos miembros de la sección Lycopodiifoliae incluidos en el análisis no nos permite establecer con seguridad su pertenencia al citado grupo.

La única Lycopodiifoliae presente en el sureste australiano (aunque en principio no en la localidad de estudio) es *A. baueri* (Maslin y Pedley, 1988), aunque algunos autores la han relacionado con la sección Phyllodineae (Maslin y Pedley, 1988; Orchard y Wilson, 2001; Maslin, 2001 *Wattle: Acacias of Australia*). En cualquier caso, su ausencia en nuestro análisis imposibilita una inferencia más precisa.

***Calomela ioptera* (Baly, 1856)** (árbol 25) y ***Calomela aff. acaciae* (Lea, 1916)** (JAJ130) (árbol 26)

Como para el resto de *Calomela*, para estas especies también se ha inferido una asociación con la familia Fabaceae tanto usando el marcador *trnL* completo (*C. ioptera*; *pp* = 1) como un fragmento del mismo (*C. aff. acaciae*; *pp* = 0,94). En el caso de la secuencia problema de *C. ioptera*, ésta además se ubica entre los representantes del subgénero *Phyllodineae* (*pp* = 0,81) incluidos en el análisis, cosa que no ocurre con la otra especie, resultado que atribuimos a la menor longitud del fragmento que fue posible secuenciar (342 pb). En ambos casos de cualquier modo se obtiene una relación altamente soportada con las especies *Acacia calamifolia*, *A. elata* y *A. latisepala* (*C. ioptera*: *pp* = 0,93; *C. aff. acaciae*: *pp* = 0,73).

Siguiendo la clasificación propuesta por Pedley en 1978, las especies *A. elata* y *A. latisepala* pertenecen a la sección Botrycephalae, un grupo de acacias bipinnadas que habita el sureste de Australia (Hnatiuk y Maslin, 1988; Miller y Bayer, 2001;



Murphy *et al.*, 2003). Por otro lado, *A. calamifolia* pertenece a la sección Phyllodineae. La sección Botrycephalae es parafilética y en ella se integran algunos miembros de la sección Phyllodineae, notablemente los de la categoría informal definida como “grupo de *Acacia microbotrya* Benth.”, en la que se encuentra *A. calamifolia* (Maslin, 1995; Maslin, 2001 *Wattle: Acacias of Australia*; Murphy *et al.*, 2003). Como en otros casos ya discutidos, la posición basal de la secuencia problema respecto a estos grupos impide establecer con seguridad la inferencia dentro de los mismos. Sin embargo, la enorme proximidad genética y filogenética de las secuencias problema y de Botrycephalae (y Phyllodineae asociados) y el soporte estadístico que los relaciona, hace de estos grupos los candidatos más probables para incluir las plantas hospedadoras de ambas especies de *Calomela*. El dato del soporte es particularmente significativo, pues cuando en las filogenias de *Acacia* para este marcador se obtiene algún tipo de soporte, el grupo soportado se corresponde con agrupaciones taxonómicas robustas. Además, contamos con un dato ecológico para *C. ioptera* que la relaciona con *A. falcata*, perteneciente al “grupo de *Acacia microbotrya*” (Andrew y Hughes, 2007).

*C. ioptera* proviene de Mount Keira (New South Wales, Australia). En esta localidad se han citado las siguientes especies de *Acacia*: *A. baueri*, *A. binervata*, *A. bynoeana*, *A. echinula*, *A. elata*, *A. elongata*, *A. filicifolia*, *A. irrorata*, *A. iteaphylla*, *A. leprosa*, *A. longifolia*, *A. maidenii*, *A. melanoxyton*, *A. myrtifolia*, *A. obtusifolia*, *A. paradoxa*, *A. saligna*, *A. suaveolens*, *A. terminalis* y *A. ulicifolia* (FNSW). Ninguna de estas especies se incluye en el “grupo de *Acacia microbotrya*”, aunque cuatro de ellas *A. elata*, *A. filicifolia*, *A. irrorata* y *A. terminalis* pertenecen a la sección Botrycephalae, por lo que deben ser consideradas como posibles plantas hospedadoras del ejemplar de *C. ioptera* estudiado.

El ejemplar de *C. aff. acaciae* fue colectado en las proximidades de Coolgardie (Western Australia, Australia), localidad donde se han citado las especies *Acacia acuminata* Benth., *A. aestivalis* E.Pritzl, *A. calcarata* Maiden et Blakely, *A. camptoclada* C.R.P.Andrews, *A. colletioides* Benth., *A. coolgardiensis* subsp. *coolgardiensis* Maiden, *A. desertorum* var. *desertorum* Maiden et Blakely, *A. duriuscula* W.Fitzg., *A. enervia* subsp. *explicata* Maiden et Blakely, *A. erinacea* Benth., *A. fragilis* Maiden et Blakely, *A. gibbosa* Cowan et Maslin, *A. hemiteles* Benth., *A. jennerae* Maiden in A.J.Ewart et O.B.Davies, *A. lasiocalyx* C.R.P.Andrews, *A. ligulata* Cunn. ex Benth., *A. merrallii* F.Muell., *A. microbotrya*, *A. murrayana* F.Muell. ex Benth., *A. prainii* Maiden, *A. pulchella* var. *glaberrima* R.Br. in W.T.Aiton, *A. quadrimarginea* F.Muell., *A.*

*ramulosa* var. *ramulosa* W.Fitzg., *A. resinimarginea* W.Fitzg., *A. resinistipulea* W.Fitzg., *A. sclerophylla* var. *teretiuscula* Lindley in T.Mitch., *A. tetragonophylla* F.Muell., *A. websteri* Maiden et Blakely, *A. willdenowiana* H.L.Wendl., *A. xerophila* var. *brevior* W.Fitzg., *A. yorkrakinensis* subsp. *acrita* C.Gardner. (FNSW). Al no existir ninguna especie de la sección Botrycephalae en el listado anterior, podemos restringir el grupo de especies candidatas a los representantes del "grupo de *A. microbotrya*" que en él se incluyen *A. aestivalis*, *A. jennerae* y *A. microbotrya*.

### ***Calomela juncta* Lea, 1903 (árbol 27)**

La filogenia obtenida a partir de los datos de *trnL* de *C. juncta* pone de manifiesto la relación de esta especie con la familia Fabaceae ( $pp = 0,95$ ). La secuencia problema aparece situada dentro del grupo formado por las especies *Acacia ampliceps*, *A. calamifolia*, *A. colej*, *A. elata*, *A. latisepala*, *A. mearnsii*, *A. melanoxylon*, *A. paradoxa*, *A. platycarpa*, *A. translucens*, *A. tumida* y *A. oswaldii* ( $pp = 0,77$ ), todas ellas pertenecientes al subgénero *Phyllodineae*.

*C. junta* ha sido citada sobre las especies *A. dealbata* y *A. mearnsii* (Hunt et al., 1996), ambas pertenecientes a la sección Botrycephalae. Por otro lado, el material estudiado procede de Royal National Park (New South Wales, Australia), donde se han citado las especies *A. baueri*, *A. binervata*, *A. brownii*, *A. echinula*, *A. elongata*, *A. fimbriata* A.Cunn. ex G.Don, *A. floribunda*, *A. irrorata*, *A. iteaphylla*, *A. linifolia*, *A. longifolia*, *A. maidenii*, *A. melanoxylon*, *A. myrtifolia*, *A. obtusifolia*, *A. suaveolens*, *A. terminalis* y *A. ulicifolia* (FNSW). A falta de más datos, estas 18 especies constituyen por el momento el conjunto de plantas con mayor probabilidad de alimentar al ejemplar del que proviene la secuencia problema.

### ***Calomela parilis* Lea, 1903 (árbol 28)**

En el análisis de la secuencia *trnL* para *C. parilis* se recupera apenas una relación trófica con la familia Fabaceae ( $pp = 0,93$ ). Ningún otro nodo bien soportado nos permite establecer una inferencia trófica más precisa, aunque se sugiere una asociación con las once especies de *Acacia* del subgénero *Phyllodineae* incluidas en el análisis. *C. parilis* ha sido citada sobre las especies *A. dealbata* y *A. mearnsii* (Hunt et al., 1996) y el espécimen estudiado fue hallado sobre *Acacia filicifolia* en Warkworth (New South Wales, Australia). Estos datos son compatibles con la relación trófica

exclusiva de *Calomela* con *Acacia*, incluso a falta de soporte filogenético para la misma.

En la localidad de captura del ejemplar se han citado las siguientes especies de *Acacia*: *A. alaticaulis* Kodela et Tindale, *A. amblygona*, *A. binervia*, *A. bulgaensis* Tindale et S.Davies, *A. cultriformis*, *A. deanei* (R.T.Baker) M.B.Welch et al., *A. decora*, *A. elongata*, *A. falcata*, *A. filicifolia*, *A. fulva*, *A. homalophylla*, *A. implexa* Benth., *A. irrorata*, *A. ixiophylla* Benth., *A. juncifolia* Benth., *A. linifolia*, *A. paradoxa*, *A. parvipinnula* Tindale, *A. pendula*, *A. piligera*, *A. prominens* A.Cunn. ex G.Don, *A. saliciformis* Tindale, *A. salicina*, *A. ulicifolia* y *A. undulifolia* (FNSW). De éstas, *A. mearnsii* puede ser descartada ya que su secuencia ha sido incluida en el análisis sin que se haya detectado una relación estrecha con la secuencia problema. La observación de campo es decisiva en este caso para establecer el trofismo del ejemplar estudiado con *A. filicifolia*.

### ***Calomela pulchella* (Baly, 1856) (árbol 29)**

Este caso es parecido al de las otras *Calomela* donde se reconoce la asociación de la especie con Fabaceae ( $pp = 0,98$ ) del género *Acacia* subgénero *Phyllodineae* ( $pp = 0,85$ ), pero sin una relación soportada con alguna de las *Acacia* disponibles para el análisis (*A. amplexiceps*, *A. calamifolia*, *A. colei*, *A. elata*, *A. latisepala*, *A. mearnsii*, *A. melanoxydon*, *A. paradoxa*, *A. platycarpa*, *A. translucens*, *A. tumida* y *A. oswaldii*).

El ejemplar examinado fue obtenido en las proximidades de Windsor (New South Wales, Australia) al vear un pie de planta de acacia. En la localidad de colecta se han citado las especies *A. binervia*, *A. brownii*, *A. bynoeana*, *A. elongata*, *A. falcata*, *A. filicifolia*, *A. floribunda*, *A. gordonii*, *A. lunata*, *A. myrtifolia*, *A. parramattensis*, *A. parvipinnula*, *A. pubescens*, *A. stricta*, *A. terminalis*, *A. trinervata* y *A. vestita* Ker Gawl. (FNSW). Ninguna de estas especies tenía secuencias para el intrón *trnL* disponibles en la base de datos en el momento de extraer la información, por lo que la relación de cada una de ellas con la secuencia problema permanece sin evaluar y todas constituyen hipótesis igualmente probables de ser el alimento del insecto investigado.

***Calomela ruficeps* (Boisduval, 1835)** (árboles 30 y 31)

El ejemplar estudiado de *C. ruficeps* se puede relacionar claramente con la familia Fabaceae tanto para el *trnL* ( $pp = 1$ ; árbol 30) como para el *loop* P6 ( $pp = 0,99$ ; árbol 31). Para el *trnL*, la secuencia problema ocupa una posición basal soportada con respecto al clado constituido por las especies *Acacia falciformis* y *A. verticillata* ( $pp = 0,97$ ), las cuales pertenecen respectivamente a las secciones Phyllodineae y Juliflorae. La información filogenética contenida en el corto fragmento del *loop* P6 (98 pb) no permite inferir relaciones soportadas resueltas a ningún nivel taxonómico en Fabaceae.

*A. falciformis* y *A. verticillata*, a pesar de pertenecer a secciones distintas con varios representantes en la filogenia, aparecen en el árbol relacionadas entre sí con un soporte elevado, lo que es consistente con el tratamiento de la sección Phyllodineae como una entidad polifilética (Murphy *et al.*, 2003). A diferencia de otros análisis que implican especies de *Acacia*, en este árbol no se reúnen en un solo clado las especies del subgénero *Phyllodineae*, aunque no hay soporte que contradiga esta solución. La posición basal de la secuencia problema a dos especies de *Acacia* de secciones diferentes impide, como ya se ha comentado, la adscripción de la misma a alguno de estos taxones. Pero, de nuevo, en un grupo en el que un soporte elevado para este marcador molecular es muy indicativo de pertenencia a un determinado grupo natural, es sugestivo de que los hospedadores probables sean ciertamente Phyllodineae o Juliflorae próximos a *A. falciformis* y *A. verticillata*.

El espécimen estudiado procede de Stanwell Park (New South Wales, Australia), donde se han citado las especies *A. baueri*, *A. binervata*, *A. bynoeana*, *A. elata*, *A. elongata*, *A. falcata*, *A. hispidula* (Sm.) Willd., *A. linifolia*, *A. longifolia*, *A. melanoxylon*, *A. myrtifolia*, *A. parramattensis*, *A. rubida*, *A. stricta*, *A. suaveolens*, *A. terminalis* (FNSW). De este listado, *A. melanoxylon* y *A. longifolia* han sido incluidas en la matriz de datos analizada sin que ninguna de ellas haya mostrado una relación significativa con la secuencia problema, por lo que cualquier inferencia trófica sobre ellas puede ser descartada. Del resto, *A. binervata*, *A. falcata*, *A. hispidula*, *A. linifolia*, *A. myrtifolia*, *A. rubida*, *A. stricta* y *A. suaveolens* son Phyllodineae, y *A. longifolia* es Juliflorae, con lo que se trata de los candidatos más probables como recurso trófico para esta especie.

### ***Dicranosterna* Motschulsky, 1860**

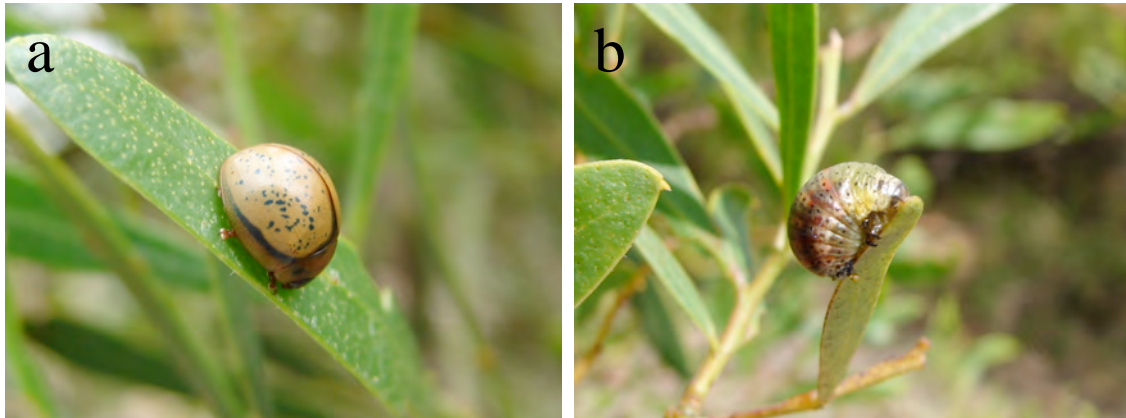
#### ***Dicranosterna globulosa* (Chapuis, 1877) (árbol 32)**

El género *Dicranosterna* aparece asociado en la bibliografía a una alimentación sobre *Acacia* (Jolivet y Hawkeswood, 1995; Reid, 2006). Nosotros hemos investigado un ejemplar de *D. globulosa* para el que efectivamente inferimos una relación con la familia Fabaceae ( $pp = 1$ ), apareciendo la secuencia problema ubicada dentro del clado conformado por las acacias del subgénero *Phyllodineae* incluidas en el análisis ( $pp = 0,75$ ), más concretamente junto a la especie *Acacia ampliceps* ( $pp = 0,95$ ).

En este caso poseemos además información de campo consistente con la inferencia. El ejemplar estudiado fue colectado sobre un pie de planta de *A. rostellifera* Benth. (planta determinada por B.R. Maslin, comunicación personal) (Figura 4.3-7) en Yalgorup National Park (Western Australia, Australia). Las larvas de *D. globulosa* también se encontraban alimentándose sobre la misma especie de acacia sobre la que se colectaron los adultos.

Al margen de la observación de campo, la relación inferida entre la secuencia problema y *A. ampliceps* puede indicar bien un trofismo sobre la citada especie, o bien sobre una especie muy relacionada con ésta. La primera de las dos opciones puede ser descartada ya que la distribución de esta especie se restringe a la región septentrional del continente australiano (FBWAF,) y por tanto está ausente en Yalgorup National Park. Esto nos permite postular que la planta hospedadora en cuestión ha de pertenecer a una especie diferente pero evolutivamente próxima a ésta.

*A. ampliceps* es una de las doce especies estrechamente relacionadas entre sí que constituyen el informalmente denominado “grupo de *A. bivenosa* DC” (Chapman y Maslin, 1992). En la localidad de colecta del insecto estudiado se tiene registro de las especies *A. cochlearis* (Labill.) H.L.Wendl., *A. penninervis* Sieber ex DC., *A. pulchella*, *A. rostellifera*, *A. saligna* y *A. truncata* Hort. ex Hoffmanns. (FNSW; Portlock *et al.*, 1994). Ninguna de ellas ha sido incluida en el análisis, por lo que su relación con la secuencia problema permanece sin testar. Sin embargo conviene notar que de todas estas especies, *A. rostellifera* es la única que se incluye en el “grupo de *A. bivenosa*”, lo que, junto con los datos de campo, refuerza mucho el valor de la inferencia.



**Figura 4.3-7.** *Dicranosterna globulosa* sobre *Acacia rostellifera* en Yalgorup National Park (WA, Australia) a) Adulto. b) Larva (Fotografías J. A. Jurado-Rivera).

### ***Ethomela* Lea, 1916**

En nuestro estudio investigamos dos especies de *Ethomela*: *E. podagrosa* y una especie sin identificar (probablemente no descrita). En la primera se ha inferido una relación trófica con la familia Asteraceae (página 314) mientras que en la segunda se han obtenido dos secuencias *trnL* diferentes que la vinculan con las familias Asteraceae (página 315) y Fabaceae. Ambas constituyen un dato ecológico muy importante, pues este género se había asociado únicamente a la familia Goodeniaceae con anterioridad (Daccordi, 2003b).

### ***Ethomela* sp. (JAJ63) (árbol 33)**

El resultado confirma un trofismo sobre la familia Fabaceae ( $pp = 1$ ) y establece una relación basal soportada con las especies *Acacia falciformis* y *A. verticillata* ( $pp = 0,88$ ), resultando un caso equivalente al previamente discutido para *Callidemum limbatum* y *Calomela ruficeps* (*vide supra*). Ambas especies de *Acacia* pertenecen a secciones distintas y una de ellas claramente polifilética (Murphy *et al.*, 2003), y la secuencia problema aparece basal a ambas, a una cierta distancia filogenética, pero con un soporte elevado sugestivo de una agrupación natural con éstas.

El ejemplar analizado procede de Mount Kosciuszko National Park (New South Wales, Australia), de la localidad de montaña Charlotte's Pass, por encima de los 1700m donde únicamente es posible que habite la especie *A. alpina* F.Muell. (Maslin,

2001 *Wattle: Acacias of Australia*; McDougall y Walsh, 2007). *A. alpina* se incluye en la sección Juliflorae, lo cual es congruente con el resultado obtenido.

### ***Peltoschema* Reitter, 1880**

Se ha establecido una relación con la familia Fabaceae en ocho de las once especies estudiadas de *Peltoschema*: *P. cardinalis* (Lea, 1924), *P. festiva* (Chapuis, 1877), *P. hera* (Stål, 1860), *P. maculiventris*, *P. scutifera* (White, 1841) y otras tres especies sin identificar. El trofismo de las restantes especies ha sido asignado en el presente estudio a las familias Asteraceae (página 316), Apocynaceae (página 310) y Myrtaceae (página 364).

Reid (2006) relaciona a los hospedadores de *Peltoschema* exclusivamente con los géneros de fabáceas *Acacia*, *Dillwynia* Sm., *Jacksonia* R.Br. ex Sm., *Oxylobium* Andrews nom. cons. y *Pultenaea* Sm. En relación a esta familia botánica, nuestros resultados no sólo confirman al género *Acacia* como fuente de alimento para este género de Chrysomelinae endémico de Australia, sino que además ponen de relieve una relación trófica con el género *Daviesia* Smith desconocida hasta el momento.

***Peltoschema cardinalis* (Lea, 1924)** (árboles 34 y 35) y ***P. maculiventris* (Lea, 1924)** (árbol 36)

Para estas dos especies de *Peltoschema* se obtiene una inferencia muy similar y equivalente a la que ya se ha discutido para *Calomela ioptera* y *C. aff. acaciae* (página 327; árboles 25 y 26). En ambos casos se observa una relación con la familia Fabaceae (*P. cardinalis*: *pp* = 1; *P. maculiventris*: *pp* = 0,95), género *Acacia*, subgénero *Phyllodineae* (*P. cardinalis*: *pp* = 0,71; *P. maculiventris*: *pp* = 0,85), apareciendo sus secuencias como basales al grupo formado por las especies *Acacia calamifolia* (sección Phyllodineae, “grupo de *A. microbotrya*”), *A. elata* y *A. latisejala* (sección Botrycephalae) (*P. cardinalis*: *pp* = 0,93; *P. maculiventris*: *pp* = 0,87). La secuencia del *loop* P6 del intrón *trnL* también se caracterizó para *P. cardinalis* (árbol 35), mostrando un claro soporte dentro de la familia Fabaceae (*pp* = 1), aunque imposibilitando una inferencia más precisa debido probablemente a su escasa señal filogenética. En el caso de *P. maculiventris* además se obtuvo una secuencia *trnL*

alternativa relacionando el trofismo de este crisomelino con la familia Asteraceae (página 316; árbol 17).

Como en el caso de las *Calomela* y en otros ya discutidos, el soporte basal de las secuencias problema respecto a un grupo que incluye representantes de diferentes grupos naturales (aunque emparentados como es este caso, donde se relaciona el “grupo de *A. microbotrya*” con Botrycephalae; Maslin, 1995; Maslin, 2001 *Wattle: Acacias of Australia*; Murphy *et al.*, 2003), imposibilita hacer una inferencia robusta del trofismo potencial. Aún así, podemos postular que el trofismo de ambas especies está estrechamente relacionado con estos grupos botánicos.

La sección Botrycephalae es un grupo de acacias bipinnadas que habitan el sureste de Australia (Hnatiuk y Maslin, 1988; Miller y Bayer, 2001; Murphy *et al.*, 2003), región donde fue colectado el ejemplar estudiado de *P. cardinalis* (Black Mountain, Australian Capital Territory, Australia), precisamente sobre una *Acacia*. En el área de colecta se han citado doce especies de *Acacia*: *A. baileyana* F.Muell., *A. buxifolia*, *A. dealbata*, *A. decurrens*, *A. genistifolia* Link, *A. gunnii*, *A. implexa*, *A. lanigera* A.Cunn., *A. mearnsii*, *A. parramattensis*, *A. penninervis* y *A. rubida* (CPBM). De éstas, las potenciales hospedadoras podrían ser *A. baileyana*, *A. dealbata*, *A. decurrens*, *A. mearnsii*, *A. parramattensis* (Botrycephalae) o *A. rubida*, como única representante del “grupo de *A. microbotrya*”.

En el caso de *P. maculiventris*, el ejemplar estudiado fue colectado sobre *Acacia* en The Rock Nature Reserve (NSW, Australia) donde se han citado las especies *A. deanei*, *A. decora*, *A. doratoxylon* A.Cunn., *A. lanigera*, *A. linearifolia* Maiden *et* Blakely, *A. paradoxa*, *A. pycnantha* Benth. y *A. verniciflua* A.Cunn. (FNSW). *A. paradoxa* ha sido incluida en el análisis sin que se haya detectado una relación soportada con la secuencia problema, por lo que puede ser descartada de nuestra inferencia. Del citado listado de especies, tan sólo *A. deanei* representa a la sección Botrycephalae, mientras que a la sección Phyllodineae lo hacen *A. decora*, *A. lineariifolia*, *A. paradoxa*, *A. pycnantha* y *A. verniciflua*, si bien ninguna de ellas se incluye en el “grupo de *A. microbotrya*”. Así, el trofismo potencial más probable sería aquél sobre *A. deanei*, pero sin descartar a las otras especies presentes en el área en que se recolectó el insecto.



***Peltoschema festiva* (Chapuis, 1877) (árbol 37)**

Este es el único caso de nuestro estudio donde se ha establecido una relación con la familia Fabaceae ( $pp = 0,84$ ) en un género distinto de *Acacia*. La secuencia obtenida para *Peltoschema festiva* se ubica dentro del clado constituido por el género *Daviesia* ( $pp = 1$ ), junto a la especie *D. elliptica* Crisp ( $pp = 1$ ).

*Daviesia* es un género endémico de Australia cuya monofilia ha sido demostrada mediante estudios moleculares usando el marcador nuclear ribosomal ITS (Crisp y Cook, 2003), lo que contribuye a reforzar nuestra inferencia.

El material estudiado procede de Kanangra-Boyd National Park (New South Wales, Australia), donde se tiene constancia de la presencia de las especies *D. mimosoides* R.Br. y *D. ulcifolia* Andrews (FNSW). La secuencia para el intrón *trnL* de *D. ulcifolia* se encuentra entre las incluidas en el análisis, aunque la posible relación con la secuencia problema queda eclipsada por la mayor proximidad recuperada con la especie *D. elliptica*. De cara a la interpretación de los resultados, conviene anotar que la especie *D. elliptica* se ha incluido dentro del informalmente denominado “grupo de *D. latifolia* R.Br.” (Crisp, 1991), al que también pertenece *D. mimosoides*.

Atendiendo a la información reunida, *D. mimosoides* representaría por el momento la especie con mayor probabilidad de ser la planta hospedadora del ejemplar de *P. festiva* sometido a estudio.

***Peltoschema hera* (Stål, 1860) (árbol 38)**

El resultado muestra una relación con la familia Fabaceae ( $pp = 0,93$ ) e incluye a la secuencia problema en el clado constituido por las especies *Acacia alata* R.Br. in W.T.Aiton, *A. adoxa*, *A. ampliceps*, *A. calamifolia*, *A. colei*, *A. elata*, *A. falciformis*, *A. latisepala*, *A. longifolia*, *A. lycopodifolia*, *A. mearnsii*, *A. melanoxylon*, *A. oswaldii*, *A. paradoxa*, *A. platycarpa*, *A. translucens*, *A. tumida*, y *A. verticillata* ( $pp = 0,73$ ), pertenecientes todas ellas al subgénero *Phyllodineae*.

Aunque con bajo soporte, la secuencia problema se relaciona con las especies *A. alata* y *A. ampliceps*, relativas a las secciones *Alatae* y *Phyllodineae* respectivamente. Es posible que ambas secciones conformen una asociación

monofilética (Murphy *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2003) en la que podría encontrarse la planta nutricia de *P. hera*.

El individuo estudiado procede de Yalgorup National Park (Western Australia, Australia), y allí se han citado las especies *A. cochlearis*, *A. penninervis*, *A. pulchella*, *A. rostellifera*, *A. saligna* y *A. truncata* (FNSW; Portlock *et al.*, 1994). Ninguna de estas especies ha sido incluida en el análisis, por lo que su relación con la secuencia problema permanece sin testar.

***Peltoschema scutifera* (White, 1841)** (árbol 39) y ***Peltoschema sp.*** (JAJ161) (árbol 40)

Para estas dos especies de *Peltoschema* del oeste australiano se ha obtenido una inferencia similar. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto su relación trófica con la familia Fabaceae ( $pp = 0,94$  y  $pp = 1$ , respectivamente), apareciendo la secuencia problema junto a la de la especie *Acacia pulchella* ( $pp = 1$  y  $pp = 0,88$ , respectivamente).

La relación entre las secuencias *trnL* de los representantes de la sección Pulchellae incluidos en el análisis, *A. drummondii* Lindley y *A. pulchella*, está muy bien soportada en el árbol inferido ( $pp = 0,94$ ), reforzando el vínculo de la secuencia problema con este grupo de acacias. La sección Pulchellae representa una entidad probablemente monofilética cuya morfología es diferente a la del resto de secciones y que podría estar además vinculada a la sección Alatae (Murphy *et al.*, 2003), como muestra la relación altamente significativa recuperada en nuestro resultado entre las especies de la sección Pulchellae *A. drummondii* y *A. pulchella*, y el representante de la sección Alatae *A. alata* ( $pp = 1$ ).

Atendiendo a la topología obtenida, la planta hospedadora en cuestión ha de pertenecer a la sección Pulchellae. Esta sección consta de 27 especies (Maslin, 2001 *Wattle: Acacias of Australia*), todas ellas endémicas del suroeste de Western Australia (Maslin, 1975). La organización del grupo está basada en tres especies centrales, *A. browniana* H.L.Wendl., *A. drummondii* y *A. pulchella*, alrededor de las cuales se organizan la mayor parte de las restantes (Guinet *et al.*, 1980), existiendo un remanente de ocho especies tradicionalmente asignadas a Pulchellae pero cuya relación con los demás miembros de la sección no está clara (Orchard y Wilson,

2001). Afortunadamente para nuestro estudio las secuencias de *A. drummondii* y *A. pulchella* han podido ser incluidas en el análisis, observándose en el resultado una mayor proximidad de la secuencia problema a la segunda de estas especies, y quedando la primera relegada a un segundo plano. Esta estructuración nos permite descartar la inferencia sobre *A. drummondii* y por consiguiente sobre cualquiera de las especies que conforman el conjunto de plantas estrechamente interrelacionadas denominado “grupo de *A. drummondii*” (Maslin, 1975). Por otro lado, no se han incluido en la matriz de datos representantes del llamado “grupo de *A. browniana*” (Guinet *et al.*, 1980), aunque cualquier hipótesis centrada en las especies este grupo puede ser igualmente eliminada, ya que si atendemos a la filogenia molecular del subgénero *Phyllodineae* elaborada por Murphy *et al.* (2003) podemos observar que los representantes del “grupo de *A. browniana*” se sitúan en un clado soportado diferente al ocupado por *A. drummondii* y *A. pulchella*, y por tanto es de esperar que su posición sistemática con respecto a la secuencia problema sea más alejada que la correspondiente a cualquiera de estas dos últimas especies. El razonamiento seguido hasta este punto nos permite delimitar la pertenencia de la secuencia problema al par formado por el conjunto de acacias que constituyen el informalmente denominado “grupo de *A. pulchella*” (Guinet *et al.*, 1980) y el grupo de ocho especies no incluidas en ninguno de los grupos principales de la sección Pulchellae discutidos anteriormente.

El ejemplar de *Peltoschema scutifera* examinado procede de las inmediaciones de Mumballup (Western Australia, Australia) donde se han citado las especies *A. acuminata*, *A. applanata* Maslin, *A. dentifera* Benth., *A. divergens* Benth., *A. drummondii*, *A. elata*, *A. extensa* Lindl., *A. insolita* E.Pritz., *A. lateriticola* Maslin, *A. pulchella*, *A. saligna*, *A. urophylla* Benth. y *A. varia* Maslin (FNSW). Son cuatro las especies de este listado que pertenecen a la sección Pulchellae, *A. drummondii*, *A. lateriticola*, *A. pulchella* y *A. varia*, de las cuales tan sólo una, *A. pulchella*, se incluye en el “grupo de *A. pulchella*”.

En cuanto a las ocho especies de la sección Pulchellae de incierta clasificación conviene anotar que tan sólo dos de ellas, *A. gilbertii* Meissner *in* J.G.C.Lehmann y *A. preissiana* (Meissner) Maslin, exhiben una distribución potencialmente compatible con la localidad de colecta, aunque cualquier relación entre éstas y la secuencia problema parece poco probable ya que existen evidencias morfológicas que cuestionan la vinculación de ambas a la sección Pulchellae (Guinet, 1980).

El árbol filogenético obtenido, los conocimientos sobre la sistemática del grupo y los registros florísticos de la zona de estudio nos permiten por el momento señalar a la especie *A. pulchella* como el hospedador más probable del ejemplar de *P. scutifera* estudiado. Es importante tener en cuenta que aunque no han sido citadas en la localidad de colecta, existen otras dos especies del “grupo de *A. pulchella*”, *A. amputata* Maslin y *A. lasiocarpa* Benth., cuyas áreas de distribución (Maslin, 2001 *Wattle: Acacias of Australia*) también nos obligan a consideradas como posibles plantas hospedadoras.

El material estudiado de la especie desconocida (JAJ161) procede de las inmediaciones de Denmark (Western Australia, Australia) donde se han citado las especies *A. auronitens* Lindley, *A. biflora* R.Br.; in W.T.Aiton, *A. cyclops* Cunn. ex Don, *A. divergens*, *A. drummondii*, *A. hastulata* Smith in Rees, *A. littorea* Maslin, *A. luteola* Maslin, *A. myrtifolia* y *A. pentadenia* Lindley. (FNSW). Son tres las especies de este listado que pertenecen a la sección Pulchellae, *A. drummondii*, *A. luteola*, *A. pentadenia*, aunque ninguna de ellas se incluye en el “grupo de *A. pulchella*”.

A la luz de la filogenia obtenida, la hipótesis de que la secuencia problema pertenece al “grupo de *A. pulchella*” puede ser mantenida únicamente si asumimos que los registros florísticos de la zona son incompletos. Tres de las especies de dicho grupo, *A. amputata*, *A. lasiocarpa* y *A. pulchella* presentan una distribución que solapa con el área de colecta (Maslin, 2001 *Wattle: Acacias of Australia*), lo que las señala como posibles candidatas a representar la planta hospedadora en cuestión.

#### ***Peltoschema* aff. *orphana* (Erichson, 1842) (JAJ154) (árbol 41)**

La secuencia *trnL* de este ejemplar de *Peltoschema* muy similar a la especie *P. orphana* permite inferir una relación clara con la familia Fabaceae ( $pp = 1$ ), en particular con las especies *Acacia ampliceps*, *A. calamifolia*, *A. colei*, *A. elata*, *A. longifolia*, *A. mearnsii*, *A. melanoxylon*, *A. oswaldii*, *A. paradoxa*, *A. platycarpa*, *A. translucens* y *A. tumida* ( $pp = 0,76$ ), todas ellas pertenecientes al subgénero *Phyllodineae*.

El material de estudio procede de Lane Poole Conservation Reserve (Western Australia, Australia), en cuyas inmediaciones se han citado las especies *A. alata*, *A. applanata*, *A. celastrifolia* Benth., *A. dentifera*, *A. divergens*, *A. drummondii*, *A. huegelii*

Benth., *A. lasiocarpa*, *A. lateritcola*, *A. nervosa* DC., *A. oncinophylla* Lindl., *A. pulchella*, *A. saligna*, *A. sessilis* Benth., *A. stenoptera* Benth., *A. teretifolia* Benth. y *A. urophylla* (FNSW), todas ellas incluidas en el subgénero *Phyllodineae*. La limitada información en la base de datos y la diversidad de especies del género *Acacia* en la región estudiada no permiten precisar nuestra inferencia trófica para esta especie mucho más allá del subgénero *Phyllodineae*, aunque lógicamente sobresalen como posibles candidatos las especies de este grupo citadas en la zona de estudio. Es previsible que el incremento en número de especies para este marcador molecular y en particular para el subgénero *Phyllodineae* contribuirán a la obtención de una mayor resolución en las inferencias.

#### ***Peltoschema* sp. (JAJ157) (árbol 42)**

La filogenia incluyendo el *trnL* que se amplificó a partir de este ejemplar permite una inferencia que relaciona a esta especie con la familia Fabaceae ( $pp = 1$ ) y en particular con las especies *Acacia alata* y *A. ampliceps* ( $pp = 0,84$ ), las cuales pertenecen a las secciones Alatae y Phyllodineae respectivamente. Esta inferencia es muy parecida a la que se ha discutido previamente para *Dicranosterna globulosa* (página 332, árbol 32), basada en un ejemplar recolectado precisamente en la misma localidad: Yalgorup National Park (Western Australia, Australia). Curiosamente en este último caso no se recuperaba la secuencia de *A. alata* y la discusión de la inferencia se centró exclusivamente en la potencial asociación con la sección Phyllodineae. La explicación a este fenómeno reside en la posición recuperada para la secuencia *trnL* de *A. alata* en los alineamientos *blastn* tras ordenar por *total score* y al hecho de utilizar para el análisis las 100 primeras secuencias de cada alineamiento. En el caso de *D. globulosa* *A. alata* ocupa la posición 111 por lo que quedaba excluida del grupo de secuencias seleccionadas, mientras que en el caso de *Peltoschema* sp. (JAJ157) aparece en la posición 96 de modo que finalmente se incluyó en el análisis. En cualquier caso, es posible que las especies de la sección Alatae y determinados miembros de la sección Phyllodineae puedan conformar una asociación monofilética (Murphy *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2003) en la que cabría encontrar a la planta nutricia de esta especie de *Peltoschema*. A diferencia de otros casos, la secuencia problema aparece claramente anidada en este grupo, así que podemos restringir la inferencia a este conjunto de especies.

Como ya se discutió para *D. globulosa*, en la zona de procedencia del material colectado se han citado las especies *A. cochlearis*, *A. penninervis*, *A. pulchella*, *A. rostellifera*, *A. saligna* y *A. truncata* (FNSW; Portlock *et al.*, 1994), ninguna de ellas disponible en la base de datos. De estas especies, aunque representan varias Phyllodineae, sólo *A. rostellifera* pertenece al “grupo de *A. bivenosa*”, agrupamiento informal que incluye a *A. ampliceps* (Chapman y Maslin, 1992). Esta especie sería la mejor candidata a constituir el alimento del ejemplar de *Peltoschema sp.* analizado. Por otra parte, la sección Alatae está compuesta por 21 especies exclusivas del suroeste de Western Australia (Murphy *et al.*, 2003), aunque ninguna de ellas se citó en el área de colecta. No obstante, esta sección incluye seis especies, *A. alata*, *A. applanata*, *A. incurva* Benth., *A. stenoptera*, *A. tegracarpa* Meissner in J.G.C. Lehmann y *A. willdenowiana* cuya distribución potencial incluye el área de colecta (Maslin, 2001 *Wattle: Acacias of Australia*), así que podrían ser consideradas como candidatas a ser la planta hospedadora en cuestión.

### ***Platymela* Baly 1856**

Hasta la fecha, las plantas hospedadoras publicadas para este género se restringen a la familia Sapindaceae (Jolivet y Hawkeswood, 1995; Matthews y Reid, 2002; Reid 2006). En el presente estudio, en el que hemos investigado dos especies de este género, se corrobora dicha información pero además se aportan nuevos datos a favor de una relación trófica sobre Fabaceae para una de las especies estudiadas.

### ***Platymela cephalotes* (Lea, 1903) (árbol 43)**

La inferencia para *P. cephalotes* pone de manifiesto un trofismo sobre la familia Fabaceae ( $pp = 0,94$ ), y más concretamente con el género *Acacia*, subgénero *Phyllodineae* ( $pp = 0,79$ ). El material estudiado procede de Broome (Western Australia, Australia), en cuyas proximidades se han citado las especies *A. adoxa*, *A. ampliceps*, *A. bivenosa*, *A. coleii*, *A. eriopoda* Maiden *et* Blakely, *A. hippuroides* Benth., *A. monticola* J.M.Black, *A. platycarpa*, *A. plectocarpa* Benth., *A. stipuligera* F.Muell., *A. translucens* y *A. tumida* (FBWAF). Cinco de de ellas, *A. ampliceps*, *A. coleii*, *A. platycarpa*, *A. translucens* y *A. tumida* han sido incluidas en el análisis observándose únicamente una relación soportada por valores bajos de probabilidad posterior con la especie *A. platycarpa* (sección Plurinerves). La información disponible actualmente señala al conjunto de especies del género *Acacia* subgénero *Phyllodineae* citadas en

la zona de estudio como el grupo de plantas con mayor probabilidad de incluir a la especie de la cual procede la secuencia problema.

## **LAMIACEAE Martynov, nom. cons.**

### ***Phyllocharis* Dalman, 1824**

La familia Lamiaceae contiene géneros sobre los que se alimentan numerosos crisomélidos (Jolivet y Hawkeswood, 1995). En nuestro estudio hemos detectado un solo caso de trofismo sobre este grupo de plantas, y se corresponde con la especie tipo del género *Phyllocharis*, *P. cyanicornis* (Fabricius, 1775) (Figura 4.3-8). Las plantas hospedadoras citadas en Australia para este género se han relacionado con los géneros *Clerodendrum* L. (Lamiaceae ex Verbenaceae), *Solanum* (Solanaceae) (Jolivet y Hawkeswood, 1995; Reid, 2006), y Apocynaceae (este trabajo). Con relación a la fauna australiana de Chrysomelinae, también se tienen citas de alimentación sobre labiadas para el género *Chalcolampra* (Reid, 1993). *Phyllocharis* y *Chalcolampra* se consideran próximos evolutivamente y se han incluido en el denominado “grupo de *Phyllocharis*” (Reid, 2006). Existen otros miembros pertenecientes a este grupo cuya alimentación conviene destacar, como son *Johannica* (Bignoniaceae: Monteith, 1991; Reid, 1991; este estudio), *Phola* (Verbenaceae: Jolivet y Hawkeswood, 1995; Reid, 2006) y *Eulina* (Oleaceae: Reid, 2006; este estudio; y Pittosporaceae: Reid, 2006), ya que las familias Bignoniaceae, Lamiaceae, Oleaceae y Verbenaceae son también evolutivamente próximas perteneciendo al orden Lamiales (Soltis *et al.*, 2005).

### ***Phyllocharis cyanicornis* (Fabricius, 1775) (árbol 44)**

El resultado obtenido para esta especie establece un trofismo sobre la familia Lamiaceae ( $pp = 0,99$ ), apareciendo la secuencia problema en una posición basal, aunque no muy próxima, a las especies *Ajuga decumbens* Thunb. y *A. multiflora* Bunge ( $pp = 1$ ), las cuales pertenecen a la subfamilia Teucroioideae. Esta posición basal de la secuencia problema con respecto al clado inferido no permite establecer su pertenencia al género *Ajuga*, aunque la proximidad filogenética de la planta hospedadora a este linaje o a aquél que contiene Teucroioideae y Nepetoideae ( $pp = 0,82$ ) está asegurada.



**Figura 4.3-8.** *Phyllocharis cyanicornis*, Cumberland State Forest (NSW, Australia) (Fotografía: J. A. Jurado-Rivera)

El material estudiado procede de Royal National Park (New South Wales, Australia) donde se han citado las siguientes especies de labiadas: *Chloanthes stoechadis* R.Br., *Clerodendrum tomentosum* (Vent.) R.Br., *Hemigenia purpurea* R.Br., *Prostanthera densa* A.A.Ham., *P. hirtula* F.Muell. ex Benth., *P. linearis* Sieber ex Benth, *P. marifolia* R.Br., *P. sieberi* Benth., *P. violacea* R.Br., *Stachys arvensis* L. y *Westringia fruticosa* (Wild.) Druce (FNSW). Ninguna de estas especies ha sido incluida en el análisis, por lo que desconocemos sus respectivas relaciones con la secuencia problema. Es necesario destacar que *C. tomentosum* es el único miembro de la subfamilia Teucroioideae que figura en el anterior listado, y por tanto es la especie más próxima al clado inferido en nuestro análisis, tal y como ha sido demostrado por estudios moleculares previos (Cantino *et al.*, 1997; Wagstaff y Olmstead, 1997; Steane *et al.*, 2004). En apoyo de la hipótesis de *Clerodendrum* como potencial hospedador de *P. cyanicornis*, cabe mencionar que se recolectaron ejemplares de este insecto sobre una especie de planta similar a *C. tomentosum* (observación personal) en Cumberland State Forest (New South Wales, Australia) y que este género de labiadas ya ha sido citado como planta nutricia de *Phyllocharis* (Reid, 2006).



## **MYRTACEAE Jussieu, nom. cons.**

Hemos obtenido resultados que señalan un trofismo sobre la familia Myrtaceae en ocho de los 24 géneros estudiados de Chrysomelinae australianos: *Canobolas* Reid, Jurado-Rivera y Beatson, 2009; *Faex* Weise, 1901; *Paropsis* Olivier, 1807; *Paropsisterna* Motschulsky, 1860; *Peltoschema*; *Poropteromela* Lea, 1916; *Rhaebosterna*; *Trachymela* Weise, 1908.

El conocimiento de la complicada taxonomía de esta familia botánica, extremadamente diversa en Australia, es muy importante para la correcta interpretación de los resultados obtenidos, lo que justifica el breve comentario que sobre la misma se expone a continuación.

Durante aproximadamente 150 años la clasificación de la familia Myrtaceae estuvo condicionada por el esquema de tres tribus publicado por de Candolle en 1828 y que distintos autores fueron modificando (e.g. Schauer, 1841; Niedenzu, 1898), hasta que en 1979 Briggs y Johnson introdujeron un cambio sustancial en la taxonomía del grupo instaurando un sistema basado en alianzas y subalianzas. La propuesta de Briggs y Johnson (1979) ha proporcionado a la comunidad botánica hipótesis alternativas de relaciones filogenéticas que han sido testadas con datos de índole morfológica y molecular (e.g. Landrum y Stevenson, 1986; O'Brien *et al.*, 2000; Udovicic y Ladiges, 2000; Wilson *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2002; Steane *et al.*, 2002), demostrando que dicha clasificación contiene incorrecciones. Con toda esta información y la derivada de una filogenia basada en secuencias del marcador *matK* Wilson *et al.* (2005) formalizaron la actual clasificación de la familia Myrtaceae, donde se reconocen dos subfamilias y 17 tribus.

El linaje de los eucaliptos (tribu Eucalypteae) reviste especial importancia ya que una gran parte de las inferencias obtenidas en el presente estudio se han realizado sobre este conjunto de plantas. El grupo está formado por siete géneros que se separan en dos grandes clados (Ladiges *et al.*, 2003), destacando el integrado por los géneros dominantes de la vegetación esclerófila australiana (*Angophora* Cav., *Corymbia* y *Eucalyptus*), ya que sobre ellos se alimenta una gran proporción de especies de Chrysomelinae australianos (Reid, 2006). *Corymbia* y *Angophora* constituyen un linaje monofilético que es a su vez el grupo hermano de *Eucalyptus* (Ladiges, 1997; Parra-O *et al.*, 2006). El género *Angophora* está representado por 11-13 especies cuya distribución se restringe al este de Australia (Ladiges, 1997).

*Corymbia* lo constituyen aproximadamente 100 especies que habitan en Australia (excepto en las regiones más frías del sur y en Tasmania) y Nueva Guinea (Ladiges, 1997). *Eucalyptus* esta integrado por aproximadamente 700 especies casi todas ellas endémicas de Australia (Ladiges, 1997) y cuya distribución incluye formaciones de bosque húmedo y áreas adyacentes a los bosques pluviales templados-fríos (*rainforest*), aunque propiamente son características de bosques secos abiertos y formaciones vegetales típicas de zonas semiáridas (Williams y Woinarski, 1997). En cuanto a su clasificación, las especies de *Eucalyptus* han sido objeto de considerable debate (Sale *et al.*, 1993; Ladiges, 1997). Brooker (2000) establece 13 subgéneros, si bien su propuesta ha sido criticada principalmente por haber sinonimizado con *Eucalyptus* a las especies de *Angophora* y de *Corymbia*, ya que este agrupamiento claramente se contradice con resultados obtenidos a partir de ocho conjuntos independientes de datos de naturaleza tanto morfológica como molecular (verLadiges y Udovicic, 2000). Excluyendo a estos dos géneros bien caracterizados, en definitiva los subgéneros a considerar se reducirían a once.

El linaje de los eucaliptos también incluye otros cuatro géneros menores: *Allosyncarpia* S.T. Blake, *Arillastrum* Pancher *ex* Baill., *Eucalyptopsis* C.T. White y *Stockwellia* Carr, Carr *et* Hyland. *Allosyncarpia* es un género monotípico que habita en una región del norte de Australia; *Arillastrum* también consta de una sola especie propia de Nueva Caledonia; *Eucalyptopsis* están representado por dos especies en Nueva Guinea, el archipiélago de las Molucas y la isla de Woodlark; y la única especie existente de *Stockwellia* se encuentra en el noreste de Australia (Ladiges *et al.*, 2003).

Otro linaje de Myrtaceae interesante a la hora de estudiar las relaciones tróficas de los Chrysomelinae australianos es el representado por la tribu Leptospermeae, donde cabe destacar a los géneros *Agonis* (DC.) Sweet, *Kunzea* Rchb. y *Leptospermum* J.R.Forst. *et* G.Forst. por su importancia como plantas hospedadoras para la fauna australiana de Chrysomelinae. El género *Agonis* es endémico del suroeste de Australia y consta únicamente de cuatro especies (FBWAF). *Kunzea* esta representado por 36 especies en todo el mundo, de las que 35 son endemismos australianos (Harden, 1991). *Leptospermum* cuenta con 79 especies, 75 de las cuales son endémicas de Australia y pueden ser halladas en todos los estados del país (NSW). El estatus taxonómico de *Leptospermum* debe ser revisado ya que el género ha demostrado ser polifilético y se ha propuesto su división en al menos cuatro géneros: especies con fruto persistente, especies del este de Australia con fruto no persistente, especies del oeste de Australia con fruto no persistente y por último la

especie *L. spinescens* Endl. como único integrante de un género diferente (O'Brien *et al.*, 2000). En nuestro estudio, y debido a la limitada disponibilidad de secuencias para el intrón *trnL* en la base de datos, tan sólo la especie *L. scoparium* J.R.Forst. *et* G.Forst. ha podido ser incluida en los análisis. Esta especie pertenece al grupo de especies de *Leptospermum* caracterizadas por poseer un fruto de tipo persistente (Stephens *et al.*, 2005).

Las citas de alimentación de crisomelinos australianos sobre mirtáceas se concentran en los géneros *Acmena* DC., *Agonis*, *Angophora*, *Austromyrtus* (Nied.) Burret, *Baeckea* L., *Callistemon* R.Br., *Darwinia* Rudge, *Eucalyptus*, *Kunzea*, *Leptospermum*, *Lophostemon* Schott, *Melaleuca* L., *Syncarpia* Ten., *Syzygium* Gaertn. nom. cons. y *Thryptomene* Endl. nom. cons. (Reid, 2006). Todos ellos pertenecen la subfamilia Myrtoideae y representan nueve de las 15 tribus que componen dicho linaje (Chamelaucieae, Eucalypteae, Leptospermeae, Lophostemoneae, Melaleuceae, Myrteae, Syncarpieae, Syzygeae y Thryptomenineae; *sensu* Wilson *et al.*, 2005).

La señal filogenética del intrón *trnL* en el caso de las Myrtaceae resuelve muy bien tanto la monofilia de la familia como las relaciones de los principales grupos de géneros que la constituyen, sin embargo no podemos afirmar lo mismo en lo que respecta a las relaciones intragenéricas de las diferentes especies que constituyen dichos clados. Esta particularidad del marcador molecular limita en la mayoría de los casos el establecimiento de las relaciones tróficas a los niveles de género o de grupos de géneros.

### **Faex Weise, 1901**

#### ***Faex notatipennis* (Chapuis, 1877) (árbol 45)**

*Faex notatipennis* es la especie tipo de este género, para el que existe una cita previa sobre los géneros de mirtáceas *Baeckea*, *Kunzea* y *Leptospermum* aportada por Reid (2006). El resultado de la filogenia de *trnL* muestra, de manera congruente con esta observación, una relación de la secuencia obtenida con la familia Myrtaceae ( $pp = 1$ ), donde la secuencia problema aparece dentro del clado compuesto por los géneros *Kunzea* y *Leptospermum* ( $pp = 1$ ) mostrando un estrecho vínculo con la especie *Leptospermum scoparium* ( $pp = 0,9$ ).

La disposición de la secuencia problema anidada entre *Kunzea* y *Leptospermum* garantiza la pertenencia de ésta a la tribu Leptospermeae (Wilson *et al.*, 2005). El hecho de que tan sólo se haya empleado una sola especie de *Leptospermum* para el análisis deja abierta la posibilidad de que la planta hospedadora pudiese pertenecer a algún otro género de esta tribu muy relacionado con *Leptospermum*. Leptospermeae incluye según Wilson *et al.* (2005) a los géneros *Agonis*, *Angasomyrtus* Trudgen *et* Keighery, *Asteromyrtus* Schauer, *Homalospermum* Schauer, *Kunzea*, *Leptospermum*, *Neofabricia* Joy Thomps. y *Pericalymma* (Endl.) Endl. De todos ellos, únicamente *Kunzea* y *Leptospermum* albergan especies que hayan sido citadas como plantas hospedadoras de *Faex* (Reid, 2006).

El material estudiado fue colectado sobre *Leptospermum* en Kanangra-Boyd National Park (New South Wales, Australia), donde en relación a la tribu Leptospermeae tan sólo se han citado especies de los género *Kunzea* y *Leptospermum*: *K. cambagei* Maiden *et* Betche, *K. parvifolia* Schauer, *L. continentale* Joy Thomps., *L. grandifolium* Sm., *L. morrisonii* Joy Thomps., *L. myrtifolium* Sieber *ex* DC., *L. obovatum* Sweet, *L. parvifolium* Sm., *L. petraeum* Joy Thomps., *L. polyanthum* Joy Thomps., *L. polygalifolium* Salisb. , *L. squarrosum* Gaertn. y *L. trinervium* (Sm.) Joy Thomps.; los demás géneros de la tribu carecen de representantes en New South Wales (FNSW).

Las once especies de *Leptospermum* citadas en la localidad de colecta integran la lista de candidatos con más probabilidad de incluir la planta hospedadora del ejemplar de *F. notatipennis* analizado. En todo caso, e incluso considerando la posibilidad de que el catálogo florístico de la zona pueda ser incompleto, la relación trófica con alguna especie de *Kunzea* o de *Leptospermum* está garantizada. La adición a la base de datos de nuevas secuencias del intrón *trnL* de otros miembros de la tribu Leptospermeae, y concretamente de especies de los géneros *Kunzea* y *Leptospermum* contribuirá decididamente a esclarecer la relación inferida.

### ***Paropsis* Olivier, 1807**

*Paropsis* es un género de Chrysomelinae bien conocido debido al carácter de plaga de mirtáceas que sus poblaciones pueden llegar a adquirir, siendo numerosos los estudios que se han realizado en torno a este tema (e.g. de Little, 1979a; Ohmart

*et al.*, 1985; Ohmart, 1996; Ohmart y Edwards, 1991; Withers, 2001; Schutze *et al.*, 2006).

*Procrisina* Aslam, 1968 ha sido sinonimizado por Reid (2006) con el género *Paropsis*. En el mismo trabajo, el autor reconoce que los integrantes de *Procrisina* se alimentan sobre un grupo de Myrtaceae (*Leptospermum*) diferente al que utilizan las especies de *Paropsis* (*Angophora*, *Eucalyptus* y *Melaleuca*).

Se han estudiado cuatro especies de *Paropsis* y en todas se ha detectado una relación con la familia Myrtaceae, concretamente con las tribus Eucalypteae y Leptospermeae. Esta última afiliación se ha inferido para las dos especies de *Procrisina* incluidas en el análisis, corroborando las diferencias en cuanto a trofismo comentadas por Reid (2006).

#### ***Paropsis maculata* (Marsham, 1808) (árbol 46)**

El resultado obtenido establece una clara relación con los miembros de la familia Myrtaceae ( $pp = 1$ ), situándose la secuencia problema dentro del clado formado por las especies del género *Eucalyptus* ( $pp = 1$ ).

La relación de la secuencia problema con la de las demás especies de *Eucalyptus* carece de soporte en el árbol recuperado, por lo que no es posible establecer un vínculo directo con ninguna especie concreta, si bien está muy claro que la planta hospedadora pertenece al género *Eucalyptus*.

El material estudiado procede de las inmediaciones de Stanwell Tops (New South Wales, Australia) (Figura 4.3-9) donde se tiene constancia de la presencia de las siguientes especies de *Eucalyptus*: *E. apiculata* R.T.Baker *et* H.G.Sm., *E. beyeriana* L.A.S.Johnson *et* K.D.Hill, *E. consideriana* Maiden, *E. cypellocarpa* L.A.S.Johnson, *E. eugenioides* Sieber *ex* Spreng., *E. haemastoma* Sm., *E. ligustrina* DC., *E. longifolia* Link, *E. luehmanniana* F.Muell., *E. moluccana* Roxb., *E. multicaulis* Blakely, *E. oblonga* DC., *E. obstans* L.A.S.Johnson *et* K.D.Hill, *E. paniculata* Sm., *E. sclerophylla* (Blakely) L.A.S.Johnson *et* Blaxell, *E. sieberi* L.A.S.Johnson, *E. sparsifolia* DC., *E. squamosa* H.Deane *et* Maiden, *E. stricta* Sieber *ex* Spreng. y *E. tereticornis* Sm. (FNSW).

Ninguna de las anteriores especies está presente en la matriz de datos analizada por lo que la relación entre cada una de ellas y la secuencia problema no ha podido ser evaluada. Por consiguiente, todas ellas deben ser igualmente consideradas como posibles plantas hospedadoras del ejemplar de *P. maculata* estudiado.



**Figura 4.3-9.** Bosque esclerófilo dominado por *Eucalyptus* en Stanwell Tops (NSW, Australia)

***Paropsis aff. geographica* Baly, 1864 (JAJ138) (árbol 47)**

Para esta otra especie de *Paropsis* se ha inferido una relación con los miembros de la familia Myrtaceae ( $pp = 1$ ), pero en esta ocasión concretamente con el clado constituido por las especies de los géneros *Angophora* y *Corymbia* ( $pp = 1$ ).

La secuencia problema se sitúa en una posición que sugiere, aunque sin soporte elevado, una mayor proximidad a *Corymbia*. Por otra parte, el espécimen de *Paropsis* estudiado fue colectado en las proximidades de Balingup (Western Australia, Australia), una región de Australia donde el género *Angophora* no está presente (Ladiges, 1997). Por ambos motivos podemos atribuir con seguridad la pertenencia de la secuencia problema al género *Corymbia*, cuya distribución comprende todos los estados de Australia con excepción de Tasmania (Ladiges, 1997). Además, ya se tiene constancia de la alimentación de *Paropsis* sobre *Corymbia* (Lawson y McDonald, 2005).

En el suroeste de Western Australia existen cuatro especies de *Corymbia*, de las cuales tan sólo dos presentan un área de distribución que incluye la localidad de colecta: *C. calophylla* (Lindl.) K.D.Hill et L.A.S.Johnson y *C. haematoxylon* (Maiden) K.D.Hill et L.A.S.Johnson (FBWAF), lo que hace muy probable que alguna de ellas sea la planta hospedadora de esta especie de *Paropsis*.

***Paropsis minor* (Marsham, 1808)** (árbol 48) y ***P. pictipennis* Boheman, 1859** (árbol 49)

Para estas dos especies, los árboles obtenidos las relacionan con la familia Myrtaceae ( $pp = 1$ ) y las sitúa muy próximas a *Leptospermum scoparium* ( $pp = 1$ ). *P. minor* fue colectado en Darkes Forest (New South Wales, Australia) sobre un pie de planta de *Leptospermum*, lo que es consistente con el elevado valor de probabilidad posterior recuperado, que garantiza la proximidad filogenética de la planta hospedadora a *L. scoparium*.

De todas formas, al ser *Leptospermum scoparium* el único representante del género presente en la base de datos en el momento de ejecutar el análisis, no es posible establecer con total seguridad la relación de *P. minor* con esta potencial planta hospedadora, cabiendo incluso la posibilidad de que la secuencia problema pudiese pertenecer a otro género de la misma tribu (Leptospermeae) o de una tribu diferente. Conviene notar aquí que, a diferencia del caso de *Faex* descrito más arriba donde también aparecía la asociación con *Leptospermum*, en aquel caso sí se podía precisar la pertenencia de la secuencia problema a Leptospermeae. Para *P. minor* y *P. pictipennis* (y otros casos que se discutirán después) no es posible hacer esta precisión pues en la correspondiente filogenia no se incluye la también Leptospermeae

*Kunzea* (que sí aparecía en el resultado de *Faex*). Esta situación particular se discutirá con detalle al final de este apartado por su relevancia a la hora de realizar las inferencias. Las localidades de origen de estos dos ejemplares de *Paropsis* (el de *P. pictipennis* proviene de Kanangra-Boyd National Park, New South Wales, Australia) pertenecen a la subdivisión botánica conocida como "New South Wales Central Coast", donde se encuentran especies de diez de las 17 tribus que se establecen para la familia Myrtaceae. A continuación se listan las diez tribus junto a los géneros de las mismas que están presentes en esta subdivisión botánica: Backhousieae (*Backhousia* Hook. et Harv. y *Choricarpia* Domin), Chamelaucieae (*Baeckea*, *Calytrix* Labill., *Darwinia*, *Euryomyrtus* Schauer, *Micromyrtus* Benth. y *Triplarina* Raf.), Eucalypteae (*Angophora*, *Corymbia* y *Eucalyptus*), Kanieae (*Tristaniopsis* Brongn. et Gris), Leptospermeae (*Kunzea* y *Leptospermum*), Melaleuceae (*Callistemon* y *Melaleuca*), Myrteae (*Austromyrtus*, *Decaspermum* J.R.Forst. et G.Forst., *Gossia* N.Snow et Guyer, *Rhodamnia* Jack y *Rhodomyrtus* (DC.) Rchb.), Syncarpieae (*Syncarpia*), Syzygieae (*Acmena* y *Syzygium*) y Tristanieae (*Tristania* R.Br.) (FNSW). Las especies del resto de las tribus bien no están presentes en New South Wales o su distribución comprende divisiones botánicas diferentes.

En los árboles *trnL* de *P. minor* y *P. pictipennis* se incluyen los tres géneros de la tribu Eucalypteae existentes en New South Wales: *Angophora*, *Corymbia* y *Eucalyptus*. Las especies de estos géneros conforman clados muy bien definidos y soportados que excluyen a las secuencias problema, por lo que la inferencia sobre cualquier miembro de esta tribu puede ser descartada.

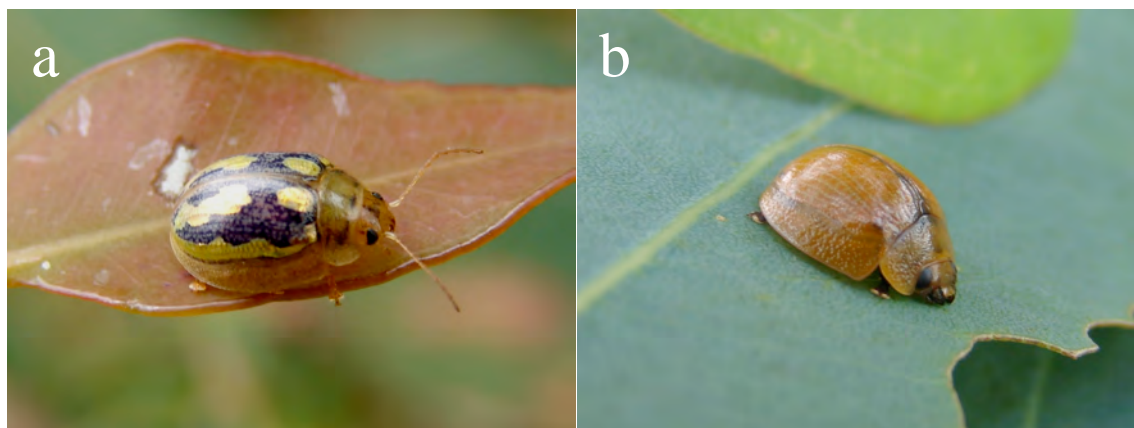
La ausencia de especies representantes para las restantes tribus no nos permite establecer una inferencia con mayor grado de resolución, al menos hasta que dispongamos de secuencias de estos grupos para el intrón *trnL* en la base de datos. Por tanto, podemos afirmar que entre las nueve tribus restantes se encuentra la especie de la cual proviene la secuencia problema.

En la localidad de colecta de *P. minor* se tiene constancia de la presencia de las siguientes mirtáceas (excluyendo la anteriormente descartada tribu Eucalypteae): *Acmena smithii* (Poir.) Merr. et L.M.Perry, *Backhousia myrtifolia* Hook. et Harv., *Baeckea diosmifolia* Rudge, *B. imbricata* (Gaertn.) Druce, *B. linifolia* Rudge, *Callistemon citrinus*, *Choricarpia leptopetala* (F.Muell.) Domin, *Darwinia diminuta* B.G.Briggs, *D. fascicularis* Rudge, *D. grandiflora* (Benth.) R.T.Baker et H.G.Sm., *Euryomyrtus ramosissima* (A.Cunn.) Trudgen, *Kunzea ambigua* (Sm.) Druce,



*Leptospermum arachnoides* Gaertn., *L. continentale*, *L. epacridoideum* Cheel, *L. grandifolium*, *L. juniperinum* Sm., *L. laevigatum* (Gaertn.) F.Muell., *L. morrisonii*, *L. parvifolium*, *L. polygalifolium*, *L. squarrosum*, *L. trinervium*, *Melaleuca deanei* F.Muell., *M. hypericifolia* Sm., *M. squamea* Labill., *M. squarrosa* Donn ex Sm., *M. thymifolia* Sm., *Rodamnia rubescens* (Benth.) Miq., *Syncaria glomulifera* (Sm.) Nied., *Syzygium oleosum* (F.Muell.) B.Hyland, *S. paniculatum* Gaertn., *Tristania neriifolia* (Sims) R.Br., *Tristaniopsis collina* Peter G.Wilson et J.T.Waterh. y *T. laurina* (Sm.) Peter G.Wilson et J.T.Waterh. (FNSW). La localidad donde se recolectó *P. pictipennis* es algo menos diversa en cuanto a mirtáceas se refiere (excluyendo la anteriormente descartada tribu Eucalypteae): *Backhousia myrtifolia*, *Baeckea brevifolia* (Rudge) DC., *B. utilis* F.Muell. ex Miq., *Callistemon ptyoides* F.Muell., *Kunzea cambagei*, *K. parvifolia*, *Leptospermum continentale*, *L. grandifolium*, *L. morrisonii*, *L. myrtifolium*, *L. obovatum*, *L. parvifolium*, *L. petraeum*, *L. polyanthum*, *L. polygalifolium*, *L. squarrosum*, *L. trinervium*, *Melaleuca armillaris* (Sol. ex Gaertn.) Sm., *Syzygium paniculatum* y *Tristaniopsis laurina* (FNSW). Estos conjuntos de especies representan en cada caso las plantas con mayor probabilidad de albergar a las plantas nutricias respectivas de los ejemplares de ambas especies de *Paropsis*, con el matiz hecho previamente sobre *Leptospermum*. Matiz pertinente porque, además, *P. minor* y *P. pictipennis* (únicas especies del género sinonimizado *Procrisina*; Reid, 2006) han sido las dos citadas con anterioridad exclusivamente sobre *Leptospermum* (Jolivet y Hawkeswood, 1995; Reid, 2006).

#### ***Paropsisterna* Motschulsky, 1860**



**Figura 4.3-10.** Ejemplares de *Paropsisterna* sobre hojas de *Eucalyptus*. a) *Paropsisterna* aff. *nobilitata*, Balingup (WA, Australia) b) *Paropsisterna* sp., Northam (WA, Australia) (Fotografías: J. A. Jurado-Rivera).

Se han estudiado 17 especies de *Paropsisterna* (Figura 4.3-10), hallándose en todas ellas una relación trófica con la familia Myrtaceae. Reid (2006) cita diez géneros

de mirtáceas como hospedadores de *Paropsisterna*, poniendo de manifiesto el amplio espectro trófico del grupo. Todas las plantas hospedadoras descritas son propias de las tribus Chamelaucieae, Eucalypteae, Leptospermeae, Melaleuceae y Syzygieae (*sensu* Wilson *et al.*, 2005). Los resultados hallados en nuestro estudio se restringen a las tribus Eucalypteae y Leptospermeae.

***Paropsisterna beata* (Newman, 1842)** (árbol 50), ***P. geniculata* (Boisduval, 1835)** (árboles 51 y 52), ***P. liturata* (Marsham, 1808)** (árbol 53), ***P. m-fuscum* (Boheman, 1859)** (árboles 54, 55 y 56) ***P. nigerrima* (Germar, 1848)** (árboles 57 y 58), ***P. aff. captiosa* (Clark, 1865)** (JAJ142) (árbol 59), ***P. aff. variabilis* (Chapuis, 1877)** (JAJ139) (árbol 60)

Para este conjunto de siete especies de *Paropsisterna* la inferencia filogenética basada en *trnL* ha sido idéntica. Los resultados obtenidos establecen una clara relación trófica de estas especies con la familia Myrtaceae ( $pp = 1$  en todos los casos), más concretamente con el clado constituido por las especies *Eucalyptus* ( $pp = 0,88$  [en *P. geniculata*],  $0,99$  [en un ejemplar de *P. nigerrima* y en *P. aff. captiosa*] o  $1$  [en las restantes]). La posición de las secuencias problema con respecto a las demás secuencias de *Eucalyptus* no están soportadas por valores elevados de probabilidad posterior, por lo que la inferencia queda en todos los casos únicamente establecida a nivel de género. Con esta información y los datos bibliográficos para cada una de las especies se intentará restringir la potencial selección trófica de acuerdo con las especies de *Eucalyptus* presentes en el área de colecta de los ejemplares estudiados.

*P. beata* fue colectado en las proximidades de Cessnock (New South Wales, Australia), donde se han citado las especies *E. canaliculata* Maiden, *E. punctata* DC., *E. moluccana* y *E. fergusonii* R.T.Baker (FNSW), probables hospedadores del crisomélido. Se tiene constancia de la alimentación de esta especie sobre *E. camaldulensis* Dehnh. en New South Wales (Stone y Bacon, 1994). *E. camaldulensis* ha sido incluida en el análisis sin que se recupere ninguna relación especial con la secuencia problema (árbol 50), lo que sugiere la existencia de un comportamiento oligofágico en *P. beata*.

El espécimen estudiado de *P. geniculata* fue colectado en Black Mountain (Australian Capital Territory, Australia) sobre *Eucalyptus*, lo que refuerza el resultado obtenido. La localidad de estudio ha sido objeto de un exhaustivo muestreo florístico,

habiéndose registrado la presencia de nueve especies de *Eucalyptus*: *E. blakelyi* Maiden, *E. bridgesiana* R.T.Baker, *E. dives* Schauer, *E. macrorhyncha* F.Muell. ex Benth., *E. mannifera* Mudie, *E. melliodora* A.Cunn. ex Schauer, *E. polyanthemus* Schauer, *E. rossii* R.T.Baker et H.G.Sm. y *E. rubida* H.Deane et Maiden (CPBM). De todas ellas únicamente *E. rubida* puede ser descartada, ya que esta especie ha sido incluida en el análisis sin que se haya detectado una relación especial con la secuencia problema (árbol 51). Las ocho especies restantes han de ser consideradas por igual como posibles plantas hospedadoras del ejemplar analizado. Para este mismo ejemplar también se ha obtenido la secuencia del *loop* P6 del intrón *trnL* produciendo, como esperábamos, una menor resolución debido a la menor señal filogenética del fragmento (árbol 52), pero igualmente asocia a la especie con Myrtales, concretamente con el clado formado por las familias Myrtaceae y Combretaceae R.Br. nom. cons. ( $pp = 0,99$ ).

El material estudiado de *P. liturata* procede de Darkes Forest (New South Wales, Australia) donde se han citado las especies *E. apiculata*, *E. beyeriana*, *E. botryoides* Sm., *E. camfieldii* Maiden, *E. capitellata* Sm., *E. ligustrina*, *E. longifolia*, *E. luehmanniana*, *E. multicaulis*, *E. oblonga*, *E. obstans*, *E. paniculata*, *E. pilularis* Sm., *E. piperita* Sm., *E. quadrangulata* H.Deane et Maiden, *E. robusta* Sm., *E. scias* L.A.S.Johnson et K.D.Hill, *E. sclerophylla*, *E. sieberi*, *E. squamosa*, *E. stricta*, *E. tereticornis* (FBWAF). *E. pilularis* ha sido incluida en el análisis sin que se haya detectado ninguna relación especial con la secuencia problema (árbol 53). El resto de especies deben ser consideradas como el conjunto de plantas con mayor probabilidad de albergar la especie hospedadora del ejemplar estudiado, al menos hasta que la disponibilidad de secuencias en la base de datos permita evaluar las relaciones de cada una de ellas con la secuencia problema.

Se han estudiado dos individuos de *P. m-fuscum* procedentes de localidades de New South Wales diferentes: Marulan (árbol 54) y Molonglo Gorge (árbol 55). El ejemplar de Marulan fue colectado vareando plantas de *E. bridgesiana*. La secuencia de esta especie de eucalipto no existía en la base de datos en el momento de realizar los análisis, por lo que su relación con la secuencia problema no ha podido ser estudiada. En esta localidad se han citado además otras 31 especies de *Eucalyptus* (FNSW) que deben ser consideradas como posibles plantas hospedadoras de *P. m-fuscum*: *E. agglomerata* Maiden, *E. aggregata* H.Deane et Maiden, *E. amplifolia* Naudin, *E. blaxlandii* Maiden et Cabbage, *E. bosistoana* F.Muell., *E. cinerea* F.Muell. ex Benth., *E. dives*, *E. elata* Dehnh., *E. eugenioides*, *E. globoidea* Blakely, *E.*

*goniocalyx* F.Muell. ex Miq., *E. macarthurii* H.Deane et Maiden, *E. macrorhyncha*, *E. maidenii* F.Muell., *E. mannifera*, *E. melliodora*, *E. moluccana*, *E. moorei* Maiden et Cabbage, *E. muelleriana* A.W.Howitt, *E. ovata* Labill., *E. paniculata*, *E. pauciflora* Sieber ex Spreng., *E. punctata*, *E. radiata* Sieber ex DC., *E. rossii*, *E. rubida*, *E. sclerophylla*, *E. sieberi*, *E. stellulata* Sieber ex DC., *E. stricta*, *E. tereticornis* (FNSW). *E. ovata* y *E. rubida* se pueden descartar como plantas hospedadoras, puesto que han sido incluidas en el análisis sin mostrar una relación significativa con la secuencia problema (árbol 54). El insecto de Molonglo Gorge fue colectado al vear una rama de *Eucalyptus*, género que en la zona de estudio está presente como: *E. blakelyi*, *E. bridgesiana*, *E. cinerea*, *E. delegatensis* R.T.Baker, *E. dives*, *E. fastigata* H.Deane et Maiden, *E. macrorhyncha*, *E. mannifera*, *E. melliodora*, *E. nortonii* (Blakely) L.A.S.Johnson, *E. pauciflora*, *E. polyanthemos*, *E. rossii*, *E. rubida*, *E. sieberi*, *E. stellulata*, *E. viminalis* Labill. (FNSW). *E. viminalis* y, de nuevo, *E. rubida* han sido incluidas en el análisis sin que se recupere ninguna relación significativa con la secuencia problema (árbol 55), por lo que pueden ser descartadas de la inferencia.

Las secuencias obtenidas en los dos ejemplares de *P. m-fuscum* analizados presentan diferencias entre sí en cuanto a longitud y composición nucleotídica. Para evaluar la posición sistemática relativa de ambas secuencias se ha realizado un análisis independiente en el que se han incluido éstas junto con las secuencias para el intrón *trnL* de doce especies de *Eucalyptus* presentes en la base de datos. La secuencia de *Lophostemon confertus* ha sido utilizada como grupo externo pues esta especie está reconocida como un linaje basal de Myrtaceae (Wilson *et al.*, 2005) y se ha empleado con el mismo fin en análisis filogenéticos centrados en otros grupos de dicha familia (Ladiges *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2000, Brown *et al.*, 2001). El resultado obtenido (árbol 56) muestra a las dos secuencias estudiadas conformando un mismo clado, aunque sin soporte. Esta topología sugiere que las plantas hospedadoras de las que proceden las secuencias no estén alejadas filogenéticamente, lo que induce a pensar en la existencia de un cierto grado de especialización trófica en esta especie de crisomelino. El marcador molecular empleado no resuelve satisfactoriamente las relaciones interespecíficas entre las especies de *Eucalyptus*, excepto en los dos casos representados por las agrupaciones *E. cordata*, *E. globulus* y *E. ovata* ( $pp = 0,99$ ) por un lado, y *E. rodwayi* y *E. viminalis* ( $pp = 0,76$ ) por el otro. Es posible que la inclusión de un mayor número de especies de *Eucalyptus* en el análisis pueda contribuir a la obtención de una mayor definición de los diferentes clados que integran este linaje.

La especie *P. nigerrima* (Figura 4.3-11) se ha estudiado a partir de individuos procedentes de dos localidades de Western Australia: Balingup (árbol 57) y Gidgegannup (árbol 58). El insecto colectado en las proximidades de Balingup (Western Australia, Australia) se encontró sobre una planta de *Eucalyptus*, lo que contribuye a reforzar el resultado obtenido. En la zona de colecta se han citado las especies *E. decipiens* Endl., *E. diversicolor* F.Muell., *E. drummondii* Benth., *E. marginata* D.Don ex Sm. y *E. rudis* Endl. (FNSW). Todas ellas han de ser consideradas por igual especies hospedadoras candidatas, al menos hasta que la disponibilidad de secuencias en la base de datos permita incluirlas en el análisis. Exactamente lo mismo se aplica para el ejemplar de *P. aff. captiosa* recolectado en la misma localidad y para el que se obtiene una inferencia idéntica (árbol 59). Por su parte, el ejemplar de *P. nigerrima* de Gidgegannup fue obtenido vareando un pie de planta de *Eucalyptus* y en esta localidad se han citado *E. accedens* W.Fitzg., *E. drummondii*, *E. marginata*, *E. patens* Benth., *E. rudis* y *E. wandoo* Blakely (FNSW). Ninguna de las especies estaba disponible para el análisis por lo que todas han de ser consideradas por igual como posibles plantas hospedadoras del ejemplar analizado. Existe un dato publicado relacionando *P. nigerrima* con *E. globulus* (Loch, 2005), si bien no parece ser el caso que nos ocupa ya que *E. globulus* ha sido incluida en el análisis sin que se detecte una relación soportada con la secuencia problema.

Las secuencias obtenidas a partir de los dos ejemplares de *P. nigerrima* son exactamente iguales en cuanto a su composición nucleotídica, diferenciándose tan sólo en que en el ejemplar de Gidgegannup hay doce nucleótidos más hacia el extremo 5' de las secuencia. Esta coincidencia entre las secuencias podría ser indicativa de la preferencia de este crisomelino por una especie o grupo estrechamente relacionado de especies de *Eucalyptus*, sobre todo teniendo en cuenta que las localidades de colecta se encuentran separadas por unos 230 Km. en línea recta. Además, ambas secuencias presentan diferencias autoapomórficas al ser comparadas tanto con las secuencias de las diferentes especies de *Eucalyptus* depositadas en la base de datos como con las secuencias obtenidas en otros ejemplares de *Paropsisterna* incluidos en este trabajo en los que se ha detectado una relación trófica con este género de Myrtaceae, lo que constituye otra evidencia a favor de la especificidad alimenticia de *P. nigerrima*. Tres especies de *Eucalyptus* son comunes a las dos localidades de colecta, *E. drummondii*, *E. marginata* y *E. rudis*, lo cual las señala como el conjunto de plantas con mayor probabilidad de albergar a la especie de la cual proceden las secuencias problema.



**Figura 4.3-11.** *Paropsisterna nigerrima* sobre *Eucalyptus* sp., Northam (WA, Australia) (Fotografía: J. A. Jurado-Rivera).

La última especie de *Paropsisterna* asociada con *Eucalyptus*, *P. aff. variabilis*, fue estudiada a partir de material capturado sobre *Eucalyptus* en Willow Springs (Western Australia, Australia), lo cual contribuye a reforzar el resultado obtenido (árbol 60). En las proximidades del área de colecta se han citado las especies *E. diversicolor*, *E. marginata* y *E. patens* (FNSW). A falta de más datos, estas tres especies han de ser consideradas como posibles plantas hospedadoras de este ejemplar.

#### ***Paropsisterna crocata* (Boisduval, 1835) (árbol 61)**

La secuencia *trnL* de *P. crocata* obtenida a partir de un individuo recolectado en Kingsbury Lookout (Western Australia, Australia) recupera una relación con la familia Myrtaceae (*pp* = 1), dentro del clado formado por las especies de *Angophora* y *Corymbia* (*pp* = 1). Esta situación es parecida a la ya discutida para *Paropsis aff.*

*geographica* (árbol 47), en la que la posible asociación con *Angophora* se descartó por estar este género ausente de la flora de Australia occidental (Ladiges, 1997). *Corymbia*, el género restante del clado (*Eucalyptus*, (*Corymbia*, *Angophora*)), es el hospedador probable de esta especie. En el suroeste de Western Australia hay cuatro especies de *Corymbia* (FBWAF), pero en la localidad de colecta únicamente se ha citado la especie *C. haematoxylon* (FNSW), lo que la convierte en el candidato con mayor probabilidad de ser la planta hospedadora del ejemplar estudiado.

### ***Paropsisterna debilis* (Chapuis, 1877) (árbol 62)**

Se recupera una relación fuertemente soportada con la familia Myrtaceae ( $pp = 1$ ). La secuencia problema aparece junto a las especies de *Angophora* y *Corymbia* ( $pp = 1$ ), pero a diferencia del caso anterior ocupa una posición basal, aunque bien separada de *Eucalyptus*. Como las secuencias para el intrón *trnL* analizadas soportan muy bien la monofilia del clado que comprende a las especies *Corymbia* y *Angophora*, el alto nivel de soporte y la proximidad genética de estas plantas con la de la secuencia problema indican con casi total certeza que esta última pertenece a uno u otro género. Esta inferencia podría estar comprometida por la posición basal de la secuencia problema con respecto al clado de *Angophora* y *Corymbia*, pues esto podría indicar su pertenencia a cualquier otro género de Myrtaceae ausente en el análisis. Esta opción puede ser descartada pues la clara relación con el clado de *Angophora* y *Corymbia* es como mínimo indicativa de la pertenencia de la secuencia problema a la tribu Eucalypteae, ya que en el análisis se han incluido especies relativas a seis de los siete géneros de Eucalypteae sin que se recupere relación especial alguna con otro linaje que el de *Angophora* y *Corymbia*. El único género no incluido ha sido *Stockwellia*, si bien este hecho es irrelevante pues tan sólo consta de una única especie que es propia del noreste de Queensland (Australia) (Ladiges *et al.*, 2003). Aceptando *Angophora* y *Corymbia* como únicas alternativas, como ocurría con la anterior especie, aquí también encontramos que el espécimen de *P. debilis* estudiado procede de Beedelup National Park (Western Australia, Australia), donde *Angophora* no está presente (Ladiges, 1997). Así, podemos establecer con seguridad la pertenencia de la secuencia problema al género *Corymbia*. En el suroeste de Western Australia existen cuatro especies de *Corymbia*, de las cuales tan sólo dos presentan un área de distribución que incluye la localidad de colecta: *C. calophylla* y *C. haematoxylon* (FBWAF), lo que hace muy probable que alguna de ellas sea la planta hospedadora de esta especie de *Paropsisterna*.

***Paropsisterna obliterata* (Erichson ,1842)** (árbol 63) y ***P. aff. lignea* (Chapuis, 1877)** (JAJ151) (árbol 64)

El resultado para ambas especies muestra una relación con la familia Myrtaceae ( $pp = 1$ ), situándose la secuencia problema en posición basal (*P. obliterata*) o anidada (*P. aff. lignea*) al clado integrado por las especies de *Kunzea* y dos especies híbridas entre *Kunzea* y *Leptospermum* ( $pp = 1$ ), aunque estas últimas muy probablemente sólo representan información de *Kunzea*, por tratarse de un marcador cloroplástico y, por tanto, de herencia uniparental (Harris e Ingram, 1991) Este caso es complementario de algún modo con el presentado más arriba para *Paropsis minor* y *P. pictipennis*. En esta ocasión, sin embargo, las inferencias asociadas a Leptospermeae se basan en unos datos que no recuperan la secuencia de *Leptospermum* de la base de datos, mientras que en los otros eran las de *Kunzea* las que faltaban. Al final de este apartado se discutirán con mayor detalle estos resultados.

Aunque el soporte con *Kunzea* (o sus híbridos) es muy elevado, al no tener otra referencia externa que sitúe la secuencia problema, al menos en el caso de *P. obliterata*, no podemos descartar que ésta pertenezca a otro género de la misma (Leptospermeae) o de una tribu diferente.

El ejemplar de *P. obliterata* fue colectado sobre *Kunzea ambigua* en Darkes Forest (New South Wales, Australia), en la subdivisión botánica denominada "New South Wales Central Coast" donde se hallan diez de las 17 tribus de Myrtaceae que, a exclusión de Eucalypteae (con los que la secuencia problema no presenta relación), comprenden: Backhousieae (*Backhousia* y *Choricarpia*), Chamelaucieae (*Baeckea*, *Calytrix*, *Darwinia*, *Euryomyrtus*, *Micromyrtus* y *Triplarina*), Kanieae (*Tristaniopsis*), Leptospermeae (*Kunzea* y *Leptospermum*), Melaleuceae (*Callistemon* y *Melaleuca*), Myrteae (*Austromyrtus*, *Decaspermum*, *Gossia*, *Rhodamnia* y *Rhodomyrtus*), Syncarpieae (*Syncarpia*), Syzygieae (*Acmena* y *Syzygium*) y Tristanieae (*Tristania*) (FNSW). Leptospermeae es la única que aporta secuencias *trnL* para realizar alguna inferencia.

En la localidad de colecta viven las siguientes mirtáceas de estas tribus (excluyendo la anteriormente descartada tribu Eucalypteae): *Acmena smithii*, *Backhousia myrtifolia*, *Baeckea diosmifolia*, *B. imbricata*, *B. linifolia*, *Callistemon citrinus*, *Choricarpia leptopetala*, *Darwinia diminuta*, *D. fascicularis*, *D. grandiflora*, *Euryomyrtus ramosissima*, *Kunzea ambigua*, *Leptospermum arachnoides*, *L.*



*continentale*, *L. epacridoideum*, *L. grandifolium*, *L. juniperinum*, *L. laevigatum*, *L. morrisonii*, *L. parvifolium*, *L. polygalifolium*, *L. squarrosus*, *L. trinervium*, *Melaleuca deanei*, *M. hypericifolia*, *M. squamea*, *M. squarrosa*, *M. thymifolia*, *Rodamnia rubescens*, *Syncaria glomulifera*, *Syzygium oleosum*, *S. paniculatum*, *Tristania neriifolia*, *Tristaniopsis collina* y *T. laurina* (FNSW). Existen citas tróficas de *Paropsisterna* para prácticamente todos estos géneros (Reid, 2006), así que estas especies representan el conjunto de plantas con mayor probabilidad de servir de alimento al ejemplar analizado de *P. obliterata*, aunque apuntamos las de *Kunzea* o *Leptospermum* como mejores candidatos. Esta hipótesis trófica se ve reforzada por el hecho de haber colectado al insecto estudiado sobre la especie *Kunzea ambigua*, la cual con bastante probabilidad es la especie hospedadora.

Por su parte, el ejemplar de *P. aff. lignea* procede de Barrington Tops National Park (New South Wales, Australia), localidad ubicada en la subdivisión botánica conocida como "New South Wales North Coast", donde en relación a la tribu Leptospermeae únicamente se han citado especies de los géneros *Kunzea* y *Leptospermum* (FNSW). En el área de colecta no se ha encontrado ningún registro de *Kunzea*, conociéndose citas tan sólo de dos especies de *Leptospermum*, *L. argenteum* Joy Thomps y *L. poligalifolium* Salisb. (FNSW), que podrían representar la planta hospedadora en cuestión. No obstante, atendiendo a las relaciones observadas en el árbol recuperado, en realidad cabría esperar una relación con alguna especie de *Kunzea*.

***Paropsisterna semifumata* (Blackburn, 1901)** (árbol 65), ***P. aff. decolorata* (Chapuis, 1877)** (JAJ143) (árbol 66), y ***P. aff. intertincta* (Clark, 1865)** (JAJ145) (árbol 67), (JAJ147) (árbol 68) y (JAJ148) (árbol 69)

En todos estos casos, los resultados obtenidos establecen una clara relación filogenética de las secuencias *trnL* con los de integrantes de la familia Myrtaceae ( $pp = 1$ ), donde las secuencias problema aparecen situadas en posición basal al clado formado por las especies del género *Kunzea*, *Leptospermum* y dos especies híbridas entre ambos géneros ( $pp = 1$ ;  $pp = 0,93$  en el caso de *P. aff. decolorata*). A pesar de que cualitativamente todas estas inferencias son iguales, vamos a distinguir dos situaciones: por un lado, (i) la de *P. semifumata* y *P. aff. decolorata* (árboles 65 y 66) en que las secuencias problema aparecen bastante divergentes de un clado bien soportado de Leptospermeae ( $pp = 1$ ); y por otro, (ii) la de los individuos de la especie

o especies próximas a *P. intertincta* (árboles 67-69) en que las secuencias *trnL* son filogenéticamente más próximas a las de Leptospermeae, que recibe un menor soporte ( $pp = 0,50-0,55$ ). La posición basal de las secuencias problema con respecto a *Kunzea* y *Leptospermum* no permite establecer con total seguridad una relación trófica con ninguno de estos géneros, cabiendo la posibilidad de que las secuencias problema pudiesen pertenecer a otro género de la misma tribu (Leptospermeae) o de una tribu diferente, esto último muchísimo más probable en la primera situación que planteamos.

El material estudiado de *P. semifumata* procede de las inmediaciones de Woko National Park (New South Wales, Australia), localidad ubicada en la ya mencionada subdivisión botánica denominada "New South Wales North Coast" donde cabe encontrar especies relativas a diez de las 17 tribus que componen la familia Myrtaceae (FNSW). A continuación se listan las diez tribus junto a los géneros de las mismas que están presentes en la subdivisión botánica que nos ocupa: Backhousieae (*Backhousia* y *Choricarpia*), Chamelaucieae (*Babingtonia* Lindl., *Baeckea*, *Calytrix*, *Darwinia*, *Homoranthus*, *Mircromyrtus*, *Ochrosperma* Trudgen y *Triplarina*), Eucalypteae (*Angophora*, *Corymbia* y *Eucalyptus*), Kanieae (*Tristaniopsis*), Leptospermeae (*Kunzea* y *Leptospermum*), Lophostemoneae (*Lophostemon*), Melaleuceae (*Callistemon* y *Melaleuca*), Myrteae (*Archirhodomyrtus* (Nied.) Burret, *Austromyrtus*, *Decaspermum*, *Gossia*, *Lenwebbia* N.Snow et Guymmer, *Pilidiostigma* Burret, *Psidium* L., *Rhodamnia*, *Rhodomyrtus* y *Uromyrtus* Burret), Syncarpieae (*Syncarpia*) y Syzygeae (*Acmena*, *Anetholea* Peter G.Wilson, *Syzygium* y *Waterhousea* B.Hyland) (FNSW). Como siempre, de estas diez podemos eliminar Eucalypteae por descartarse fácilmente en la inferencia filogenética una relación con esta tribu (árbol 65).

Entre las nueve tribus restantes, para las que no hay información del marcador *trnL* en la base de datos, debe encontrarse la especie de la cual proviene la secuencia problema. Para este ejemplar en concreto de *P. semifumata* sabemos que fue colectado sobre una especie de Melaleuceae, así que es probable que la secuencia *trnL* obtenida, divergente de cualquier otra disponible en la base de datos, sea propia de esta tribu. El género *Paropsisterna* ha sido citado previamente sobre varios géneros de Melaleuceae, además de otros géneros de mirtáceas (Reid, 2006).

Por su parte, el ejemplar estudiado de *P. aff. decolorata* (árbol 66) procede de Denmark (Western Australia, Australia). En el suroeste de Western Australia únicamente es posible encontrar especies relativas a cuatro de las 17 tribus en que se

subdivide la familia Myrtaceae: Chamelaucieae, Eucalypteae, Leptospermeae y Melaleuceae; el resto de las tribus no están presentes en Western Australia o bien su distribución se restringe a la región de Kimberley, mucho más septentrional (FBWAF). De éstas, por los motivos expuestos en varios casos más arriba, podemos descartar con seguridad como potencial trofismo a la tribu Eucalypteae. Respecto a una asociación potencial con la tribu Leptospermeae, seis de los nueve géneros que la integran se pueden hallar en Western Australia. De ellos, únicamente *Homalospermum*, *Agonis*, *Kunzea* y *Leptospermum* (los tres últimos ya citados como alimento de *Paropsisterna*; Reid, 2006) cuentan con especies cuyas distribuciones son compatibles con el área de colecta del ejemplar de *P. aff. decolorata* (FBWAF). Conviene anotar que no se han incluido secuencias de *Agonis* ni de *Homalospermum* en el análisis. Ambos géneros son endémicos de la región sur occidental de Western Australia y han demostrado ocupar una posición filogenética (ver O'Brien *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2005) perfectamente compatible con la que ocupa la secuencia problema en nuestro árbol. Chamelaucieae y Melaleuceae incluyen los géneros *Baeckea*, *Callistemon*, *Darwinia* y *Melaleuca*, que han sido citados como plantas hospedadoras de *Paropsisterna* (Reid, 2006), aunque alguno de ellos no está presente en la zona donde se recolectó el ejemplar estudiado. Atendiendo a la filogenia molecular de la familia Myrtaceae obtenida por Wilson *et al.* (2005), la posición sistemática de estas dos tribus es compatible con el resultado obtenido a partir de *trnL*, por lo que sus miembros también deben ser considerados como posibles plantas hospedadoras de esta *Paropsisterna*.

Así, los potenciales alimentos de *P. aff. decolorata* en la zona de estudio pueden ser mirtáceas de las tribus Chamelaucieae, Leptospermeae y Melaleuceae: *Agonis sp.*, *Astartea fascicularis* (Labill.) DC., *Beaufortia decussata* R.Br., *Kunzea vestita* Schauer, *Melaleuca cuticularis* Labill., *M. densa* R.Br. y *M. raphiophylla* Schauer (FNSW). Pero la ya mencionada elevada divergencia respecto a Leptospermeae probablemente reduce el espectro a las cinco especies de las otras dos tribus. La inclusión de las secuencias de estas especies en la base de datos permitirá evaluar con precisión las relaciones existentes entre la secuencia problema y cada una de ellas.

*Paropsisterna aff. intertincta* (JAJ145) fue hallada cerca de Waroona (Western Australia, Australia) sobre una mirtácea sin identificar, el ejemplar JAJ147 se capturó en las proximidades de Karridale (Western Australia, Australia), y el ejemplar JAJ148 en las proximidades de Denmark (Western Australia, Australia). De nuevo, en estas

localidades de Western Australia sólo existen representantes de las tribus Chamelaucieae, Eucalypteae, Leptospermeae y Melaleuceae, y en cualquier caso nuestra inferencia se puede centrar en tres de ellas, excluyendo Eucalypteae (los dos géneros relevantes, *Corymbia* y *Eucalyptus*, están disponibles en la filogenia y no aparecen relacionados con las secuencias problema). A diferencia del caso de *P. semifumata* y *P. aff. decolorata*, aquí la tribu Leptospermeae es una candidata a tener muy en cuenta como trofismo potencial. Los géneros representantes de estas tribus presentes en la región de Western Australia donde se colectaron estos tres ejemplares son *Agonis*, *Homalospermum*, *Kunzea*, *Leptospermum* (Leptospermeae), *Actinodium* Schauer, *Astartea* DC., *Baeckea*, *Babingtonia*, *Beaufortia* R.Br, *Callistemon*, *Calothamnus* Labill., *Calytrix*, *Chamelaucium* Desf., *Darwinia*, *Hypocalymma* (Endl.) Endl., *Homalospermum*, *Melaleuca*, *Rinzia* Schauer, *Regelia* Schauer, *Scholtzia* Schauer, *Thryptomene*, *Triplarina* y *Verticordia* DC. nom. cons. (Chamelaucieae y Melaleuceae) (FBWAF), y todos, excepto *Homalospermum*, han sido citados como alimento de *Paropsisterna* (Reid, 2006). Como en anteriores casos, conociendo la flora de cada región analizada para estos grupos sistemáticos seleccionados se puede restringir mucho el trofismo potencial de los insectos. Además, una especie de *Paropsisterna* no estudiada en este trabajo perteneciente también al grupo de *P. intertincta* ha sido colectada sobre *Agonis* (tribu Leptospermeae) (C.A.M. Reid comunicación personal), lo cual refuerza la inferencia rónica obtenida.

En las inmediaciones de Waroona (ejemplar de *P. aff. intertincta* JAJ145) se han citado las siguientes especies de mirtáceas de las tribus Chamelaucieae, Leptospermeae y Melaleuceae: *Agonis flexuosa* (Willd.) Sweet, *Agonis grandiflora* Benth., *Agonis linearifolia* (DC.) Sweet, *Astartea fascicularis*, *Babingtonia camphorosmae* (Endl.) Lindl., *Calothamnus lateralis* Lindl., *Calothamnus quadrifidus* R.Br., *Calytrix flavescens* A.Cunn., *Calytrix fraseri* A.Cunn., *Chamelaucium uncinatum* Schauer, *Darwinia citriodora* (Endl.) Benth., *Hypocalymma angustifolium* (Endl.) Schauer, *H. cordifolium* Schauer, *H. robustum* (Endl.) Lindl., *Kunzea glabrescens* Toelken, *K. recurva* Schauer, *Melaleuca cuticularis*, *M. hamulosa* Turcz., *M. huegelii* Endl., *M. incana* R.Br., *M. lateriflora* Benth., *M. lateritia* A.Dietr., *M. parviceps* Lindl., *M. preissiana* Schauer, *M. raphiophylla*, *M. thymoides* Labill., *M. trichophylla* Lindl., *M. viminea* Lindl. y *Regelia ciliata* Schauer (FNSW). En las inmediaciones de Karridale (ejemplar de *P. aff. intertincta* JAJ147) las especies citadas son: *Agonis flexuosa*, *A. juniperina* Schauer, *A. parviceps* Schauer, *Beaufortia sparsa* R.Br., *Calothamnus crassus* (Benth.) Hawkeswood, *Homalospermum firmum* Schauer, *Hypocalymma ericifolium* Benth., *Kunzea recurva*, *Melaleuca acerosa* Schauer, *M. huegelii*, *M.*

*incana*, *M. lanceolata* Otto, *M. preissiana*, *M. systema* Craven y *M. thymoides* (FNSW). Y, finalmente, en la zona de Denmark (ejemplar de *P. aff. intertincta* JAJ148) las especies citadas son: *Agonis* sp., *Astartea fascicularis*, *Beaufortia decussata*, *Kunzea vestita*, *Melaleuca cuticularis*, *M. densa* y *M. raphiophylla* (FNSW). Cuando las secuencias de estas especies (o de representantes de cada género) estén disponibles en la base de datos, se podrá evaluar con precisión las relaciones existentes entre las secuencias problema y cada uno de los trofismos potenciales.

### ***Paropsisterna subcostata* (Chapuis, 1877) (árbol 70)**

En el caso de este ejemplar, únicamente pudimos secuenciar un fragmento de 129 pb correspondiente al extremo 3' del intrón *trnL*, por lo que la resolución obtenida no es suficientemente satisfactoria. El resultado muestra una relación con las familias Myrtaceae y Lythraceae Jaume Saint-Hilaire, nom. cons. ( $pp = 0,94$ ), ambas pertenecientes al orden Myrtales (Conti *et al.*, 1997; Soltis *et al.*, 2005). La relación trófica de *P. subcostata* con el género *Eucalyptus* está documentada (Nahrung y Allen, 2004), habiéndose citado las especies *E. obliqua* L'Her. y *E. regnans* como sus hospedadores (de Little, 1979b). Más concretamente, el ejemplar estudiado se recolectó en Florentine Valley (Tasmania, Australia) sobre *E. regnans* F.Muell. (planta identificada por D.W. de Little, comunicación personal). Aunque la inferencia filogenética no está soportada, la secuencia problema y las de especies del género *Eucalyptus* aparecen agrupadas en un mismo clado.

### ***Peltoschema* Reitter, 1880**

En dos de las once especies de *Peltoschema* analizadas en este trabajo se ha detectado una relación trófica con la familia Myrtaceae. Ésta constituye la tercera excepción hallada en este estudio a la alimentación exclusiva sobre Fabaceae que se había descrito para el género (Reid, 2006), y que se suma a las inferencias discutidas más arriba relacionando el trofismo de este género a las familias botánicas Apocynaceae y Asteraceae. En el mismo trabajo, Reid pone en tela de juicio la cita de *Peltoschema* sobre *Eucalyptus* registrada por Jolivet y Hawkeswood (1995). Nuestros resultados soportan la relación con dicha familia botánica, aunque el trofismo detectado se corresponde con otros géneros diferentes de *Eucalyptus*.

***Peltoschema mansueta* (Weise, 1901) (árbol 71)**

La filogenia basada en *trnL* sitúa la secuencia problema junto a los integrantes de la familia Myrtaceae incluidos en el análisis ( $pp = 1$ ), y más concretamente en el clado formado por los géneros *Leptospermum*, *Kunzea* y las dos especies híbridas entre estos dos géneros ( $pp = 1$ ), donde se detecta una estrecha relación con la única especie de *Leptospermum* presente en el análisis *L. scoparium* ( $pp = 0,89$ ).

La posición de la secuencia problema garantiza la pertenencia de ésta a la tribu Leptospermeae, donde *Kunzea* y *Leptospermum* están incluidos (Wilson *et al.*, 2005). En principio, el hecho de que tan sólo se haya empleado una sola especie de *Leptospermum* en el análisis deja abierta la posibilidad de que la planta hospedadora pueda pertenecer a otro género de la tribu Leptospermeae aunque muy relacionado con *Leptospermum*. El ejemplar estudiado fue colectado cerca de Wollongong (New South Wales, Australia), en la subdivisión botánica denominada "New South Wales Central Coast" y donde, de la tribu Leptospermeae, únicamente los géneros *Kunzea* y *Leptospermum* (FNSW). De estos, en la localidad de colecta tan sólo se han citado especies del género *Leptospermum*: *L. continentale*, *L. laevigatum*, *L. polygalifolium* y *L. rotundifolium* (Maiden *et* Betcher) F.Rodway *ex* Cheel. (FNSW) Estas cuatro especies constituyen la lista de candidatos más probables a representar la planta o plantas hospedadoras del ejemplar de *P. mansueta* analizado.

***Peltoschema* sp. (JAJ155) (árbol 72)**

Este ejemplar no identificado de *Peltoschema* permite inferir la relación de esta especie con la familia Myrtaceae ( $pp = 1$ ), situándose la secuencia problema en posición basal, aunque filogenéticamente divergente, al clado constituido por las secuencias de las especies de *Leptospermum*, *Kunzea*, y dos especies híbridas entre ambos géneros ( $pp = 0,93$ ). Esta situación es equivalente a la ya discutida para *Paropsisterna semifumata* (árbol 65) y *P. aff. decolorata* (árbol 66), en la que además de Leptospermeae, cualquier otra tribu de Myrtaceae (a excepción de Eucalypteae) es una candidata a la selección trófica del ejemplar, de hecho con mayor probabilidad que Leptospermeae. El material estudiado fue colectado en Waroona (Western Australia, Australia), donde las únicas tribus de Myrtaceae son Chamelaucieae, Leptospermeae, Melaleuceae y Eucalypteae (que no consideramos porque según la filogenia queda excluida una posible relación con *Corymbia* o *Eucalyptus*, únicos géneros presentes

en Western Australia) (FBWAF). De la tribu Leptospermeae sólo hay cuatro géneros con especies cuyas distribuciones son compatibles con el área de colecta: *Agonis*, *Homalospermum*, *Kunzea* y *Leptospermum* (FBWAF). Los dos primeros son endémicos de la región sur occidental de Western Australia y su posición filogenética sería compatible con la topología del árbol obtenido, es decir, basales al clado de *Kunzea* y *Leptospermum* (O'Brien *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2005). Por lo que hace a las otras dos tribus, Chamelaucieae y Melaleuceae, también es esperable que ocupen una posición basal y divergente a Leptospermeae (Wilson *et al.*, 2005). En conjunto, las tres tribus poseen un número relativamente elevado de especies en las inmediaciones de Waroona, y todas ellas constituyen trofismos potenciales para el individuo de *Peltoschema* sp. (JAJ155): *Agonis flexuosa*, *A. grandiflora*, *A. linearifolia*, *Astartea fascicularis*, *Babingtonia camphorosmae*, *Calothamnus lateralis*, *C. quadrifidus*, *Calytrix flavescens*, *C. fraseri*, *Chamelaucium uncinatum*, *Darwinia citriodora*, *Hypocalymma angustifolium*, *H. cordifolium*, *H. robustum*, *Kunzea glabrescens*, *K. recurva*, *Melaleuca cuticularis*, *M. hamulosa*, *M. huegelii*, *M. incana*, *M. lateriflora*, *M. lateritia*, *M. parviceps*, *M. preissiana*, *M. raphiophylla*, *M. thymoides*, *M. trichophylla*, *M. viminea* y *Regelia ciliata* (FNSW).

### ***Poropteromela* Lea, 1916**

#### ***Poropteromela epipleuralis* Lea, 1916 (árbol 73)**

*Poropteromela* es un género monotípico endémico de Australia, presente tan sólo en ciertos hábitats de bosque pluvial templado-frío del norte de New South Wales, y cuya alimentación se ha relacionado con mirtáceas de los géneros *Austromyrtus* y *Syzygium* (Reid, 2006). El resultado obtenido a partir de la secuencia *trnL* amplificada de un individuo de Dorrigo National Park (New South Wales, Australia), establece una clara relación de esta especie con la familia Myrtaceae ( $pp = 0,97$ ), situándose la secuencia problema en una posición basal no soportada con respecto al clado formado por el resto de los representantes de la familia. La localidad de colecta se sitúa en la subdivisión botánica denominada "New South Wales North Coast", donde cabe encontrar especies relativas a diez de las 17 tribus que componen la familia Myrtaceae (FNSW). De éstas podemos descartar al menos Eucalypteae, Leptospermeae y Lophostemoneae, pues los géneros de las mismas presentes en New South Wales están en la filogenia y sin embargo la secuencia problema no aparece relacionada con ninguno de ellos. Las siete tribus restantes junto con su

representación genérica (ninguna de las cuales tiene secuencias *trnL* disponibles) son: Backhouseieae (*Backhousia* y *Choricarpia*), Chamelaucieae (*Babingtonia*, *Baেকেa*, *Calytrix*, *Darwinia*, *Homoranthus*, *Mircromyrtus*, *Ochrosperma* y *Triplarina*), Kanieae (*Tristaniopsis*), Melaleuceae (*Callistemon* y *Melaleuca*), Myrteae (*Archirhodomyrtus*, *Austromyrtus*, *Decaspermum*, *Gossia*, *Lenwebbia*, *Pilidiostigma*, *Psidium*, *Rhodamnia*, *Rhodomyrtus* y *Uromyrtus*), Syncarpieae (*Syncarpia*) y Syzygeae (*Acmena*, *Anetholea*, *Syzygium* y *Waterhousea*) (FNSW). De éstas, en la localidad de colecta viven *Backhousia sciadophora* F.Muell., *Syzygium crebrinerve* (C.T.White) L.A.S.Johnson y *Tristaniopsis collina* (FNSW), convirtiéndose, por tanto, en los trofismos potenciales más probables para el ejemplar estudiado de *P. epipleuralis*. Esta especie se había citado previamente sobre *Austromyrtus* (Myrteae) y *Syzygium* (Syzygeae) (Reid, 2006), y la posibilidad de que la secuencia problema pueda provenir de alguna de sus especies es compatible con el resultado obtenido, con *S. crebrinerve* como candidato con mayor probabilidad de representar a la planta hospedadora del ejemplar estudiado.

### ***Rhaebosterna* Weise, 1916**

Se ha estudiado la especie tipo del género, detectando una relación trófica con las familias Asteraceae (discutida en un apartado anterior, página 317) y Myrtaceae. En el caso de la inferencia sobre Myrtaceae se ha recuperado tanto la secuencia para el intrón *trnL* como la correspondiente al *loop* P6.

### ***Rhaebosterna sciola* Weise, 1917 (árboles 74 y 75)**

*R. sciola* es la especie típica del género *Rhaebosterna*, para el que existen registros de su asociación con Myrtaceae, concretamente con los géneros *Melaleuca* y *Thryptomene* (Reid, 2006), aunque en este trabajo ya hemos citado la posibilidad de que además utilicen las Asteraceae como alimento (página 317, árbol 18). Para este ejemplar hemos investigado secuencias tanto del *trnL* como del *loop* P6 que han apoyado la asociación con Myrtaceae. Los árboles obtenidos para el intrón *trnL* (árbol 74) y el fragmento más pequeño del *loop* P6 (árbol 75) sitúan a la secuencia problema entre los miembros de la familia Myrtaceae ( $pp = 1$  y  $0,98$ , respectivamente); el primer marcador recupera además una posición basal al clado formado por los géneros *Leptospermum*, *Kunzea* y dos especies híbridas entre ambos ( $pp = 1$ ). De nuevo, la situación para este ejemplar es análoga a la que se ha explicado con anterioridad para



*Paropsisterna semifumata* (árbol 65), *P. aff. decolorata* (árbol 66) y *Peltoschema sp.* (JAJ155) (árbol 72), lo que implica que con toda probabilidad el trofismo de este ejemplar no se sitúa entre las Eucalypteae (todos los géneros relevantes están presentes en el análisis) y difícilmente entre Leptospermeae (la secuencia es demasiado divergente de *Leptospermum* y *Kunzea*).

El espécimen estudiado procede de Mildura (Victoria, Australia), localidad en el límite entre los estados de New South Wales y Victoria y perteneciente a la subdivisión botánica conocida como “New South Wales Southern Far Western Plains”. En esta región se pueden hallar especies relativas a cuatro de las 17 tribus que constituyen la familia Myrtaceae, dos tras la exclusión de Eucalypteae y Leptospermeae: Chamelaucieae (*Baeckea* y *Calytrix*) y Melaleuceae (*Melaleuca*) (FNSW). Ninguna de ellas tiene secuencias *trnL* disponibles para el análisis, pero al menos la última es consistente con los datos publicados sobre trofismo de esta especie (Reid, 2006). En relación a las tribus Chamelaucieae y Melaleuceae en la localidad de estudio únicamente se ha citado la especie *Melaleuca lanceolata* Otto. De hecho, el ejemplar fue colectado sobre *M. lanceolata*, lo que refuerza considerablemente la inferencia sobre esta especie de la tribu Melaleuceae.

Se necesita información procedente de secuencias *trnL* de los grupos no representados actualmente en las bases de datos para poder establecer correctamente la relación de la secuencia problema con los miembros de la familia Myrtaceae, aunque en función de la información disponible la hipótesis trófica más probable señala a *M. lanceolata* como hospedador del ejemplar de *Rhaebosterna* estudiado.

### ***Trachymela* Weise, 1908**

*Trachymela* es un género de crisomelino nativo de Australia bien conocido debido al carácter de plaga de eucaliptos que sus poblaciones pueden adquirir (ver Tribe y Cillié, 1997, 2000; Tribe 2000). En este estudio investigamos ocho especies de *Trachymela* y en todos los casos recuperamos una relación trófica con la familia Myrtaceae, confirmándose las citas previas disponibles (Reid, 2006). Aunque Jolivet y Hawkeswood (1995) han registrado *Trachymela* sobre *Acacia*, ninguno de nuestros resultados muestra esta asociación.

***Trachymela rugosa* (Chapuis, 1877)** (árbol 76), ***Trachymela sp.*** (196167) (árbol 77), ***Trachymela sp.*** (JAJ168) (árbol 78), ***Trachymela sp.*** (JAJ170) (árbol 79), ***Trachymela aff. seriata* (Germar, 1848)** (JAJ167) (árbol 80), ***Trachymela tincticollis* (Blackburn, 1896)** (árboles 81 y 82), ***Trachymela aff. tincticollis* (Blackburn, 1896)** (JAJ163) (árbol 83), (JAJ164) (árbol 84).

En todos los ejemplares de *Trachymela* analizados, la utilización de las secuencias *trnL* ha permitido obtener la misma inferencia situando la secuencia problema dentro de la familia Myrtaceae ( $pp = 1$ ) y, en particular, en el clado formado por las especies del género *Eucalyptus* ( $pp = 1$ ; 0,99 en *T. rugosa*), aunque nunca se ha recuperado una relación soportada con alguna especie concreta que permita una mayor precisión en la inferencia. Para cada uno de estos ejemplares, como hemos hecho hasta ahora, se propondrán posibles hospedadores en función de la región en que se capturaron.

El ejemplar estudiado de *T. rugosa* (árbol 76) fue colectado sobre una planta del género *Eucalyptus* en Mount Canobolas State Recreation Area (New South Wales, Australia). En esta localidad se han citado las siguientes 16 especies de *Eucalyptus*: *E. blakelyi*, *E. bridgesiana*, *E. canobolensis* (L.A.S.Johnson et K.D.Hill) J.T.Hunter, *E. dalrympleana* subsp. *dalrympleana* Maiden, *E. deanei* Maiden, *E. dives*, *E. goniocalyx*, *E. macrorhyncha*, *E. mannifera*, *E. pauciflora*, *E. polyanthemos* subsp. *polyanthemos*, *E. radiata* subsp. *radiata*, *E. rubida* subsp. *rubida*, *E. saxicola* J.T.Hunter, *E. stellulata* y *E. viminalis* (Hunter, 2002). De todas ellas, tan sólo *E. rubida* y *E. viminalis* han sido incluidas en el análisis sin que en ninguno de los dos casos se haya detectado una relación soportada con la secuencia problema, por lo que pueden ser descartadas como plantas hospedadoras del ejemplar analizado. La demás especies deben ser consideradas por igual como posibles hospedadores, al menos hasta que la disponibilidad de secuencias del intrón *trnL* en las bases de datos permita evaluar sus diferentes relaciones con la secuencia problema.

*Trachymela sp.* 1 (196167) (árbol 77) procede de las inmediaciones de Marulan (New South Wales, Australia) donde se han citado 32 especies de *Eucalyptus*: *E. agglomerata*, *E. aggregata*, *E. amplifolia*, *E. blaxlandii*, *E. bosistoana*, *E. bridgesiana*, *E. cinerea*, *E. dives*, *E. elata*, *E. eugenioides*, *E. globoidea*, *E. goniocalyx*, *E. macarthurii*, *E. macrorhyncha*, *E. maidenii*, *E. mannifera*, *E. melliodora*, *E. moluccana*, *E. moorei*, *E. muelleriana*, *E. ovata*, *E. paniculata*, *E. pauciflora*, *E. punctata*, *E. radiata*, *E. rossii*, *E. rubida*, *E. sclerophylla*, *E. sieberi*, *E. stellulata*, *E. stricta* y *E. tereticornis*

(FNSW). Podemos descartar como plantas hospedadoras a las especies *E. ovata* y *E. rubida*, ya que han sido incluidas en el análisis sin mostrar una relación soportada con la secuencia problema. El grupo de especies restante ha de ser considerado como el conjunto de plantas con mayor probabilidad de alojar al hospedador del ejemplar estudiado.

Los individuos de *Trachymela sp.* (JAJ168) (árbol 78) y *Trachymela sp.* (JAJ170) (árbol 79) proceden de Yalgorup National Park (Western Australia, Australia) donde se han citado las especies *E. calophylla* R.Br., *E. decipiens*, *E. foecunda* Schauer, *E. gomphocephala* D.C., *E. megacarpa* F.Muell., *E. petrensis* Brooker et Hopper y *E. rudis* (FNSW; Portlock et al., 1994) y entre las que es posible que se encuentren las plantas o plantas hospedadoras de estos ejemplares. Ninguna de estas especies ha sido incluida en el análisis por lo que sus diferentes relaciones con la secuencia problema no han podido ser evaluadas.

El ejemplar de *Trachymela aff. seriata* (JAJ167) (árbol 80) fue colectado cerca de Wooroloo (Western Australia, Australia) donde se han registrado las especies de *Eucalyptus*, *E. accedens*, *E. drummondii* subsp. *drummondii*, *E. marginata* subsp. *cinerascens*, *E. patens*, *E. rudis* y *E. wandoo* subsp. *wandoo* (FBWAF; FNSW), ninguna de las cuales ha sido incluida en el análisis y por tanto sus respectivas relaciones con la secuencia problema permanecen desconocidas.

El material estudiado de *T. tincticollis* (árboles 81 y 82) procede de Albany (Western Australia, Australia) donde se han citado 22 especies de *Eucalyptus*. La planta hospedadora de este ejemplar de *Trachymela* podría ser: *E. angulosa* Schauer, *E. angulosa* x *corneta* Labill., *E. annulata* Benth., *E. buprestium* F.Muell., *E. corneta*, *E. decipiens* subsp. *decipiens*, *E. decurva* F.Muell., *E. diversicolor*, *E. doratoxylon* F.Muell., *E. falcata* Turcz., *E. goniantha* Turcz., *E. guilfoylei* Maiden, *E. marginata* subsp. *marginata*, *E. marginata* subsp. *marginata* x *E. staeri* (Maiden) Kessell et C.A.Gardner, *E. megacarpa*, *E. occidentalis* Endl., *E. patens*, *E. pleurocarpa* Schauer, *E. preissiana* Schauer, *E. redacta* Brooker et Hopper ms, *E. staeri* y *E. uncinata* Turcz. (FBWAF; FNSW). *E. gomphocephala* ha sido citada como planta hospedadora de *T. tincticollis* (Tribe y Cillié, 1997, 2000; Tribe 2000). La distribución de esta planta se restringe a una franja dunar cercana a la costa que va desde Busselton hasta Yanchep (Western Australia, Australia) (Beadle, 1981; FBWAF), a más de 300 Km. en línea recta de la localidad de colecta del individuo analizado, por lo que parece probable que la especie pueda alimentarse sobre varias especies de *Eucalyptus*. (Para este mismo

ejemplar también se ha obtenido la secuencia del *loop* P6 del intrón *trnL* (árbol 82), detectándose una relación con la familia Myrtaceae ( $pp = 0,99$ ). Las relaciones intrafamiliares no aparecen soportadas probablemente debido a la corta longitud y consiguiente falta de información de este marcador molecular.)

Por último, en este género hemos investigado dos ejemplares afines a la anterior especie, *T. tincticollis*, de dos localidades en Western Australia: individuo (JAJ163) (árbol 83) colectado cerca de Jarrahdale (Western Australia, Australia) e individuo (JAJ164) (árbol 84) colectado en las inmediaciones de Balingup (Western Australia, Australia). En la primera localidad se han citado ocho especies de *Eucalyptus*: *E. gomphocephala* DC., *E. laeliae* Podger et Chippend., *E. lane-pooli* Maiden, *E. marginata* subsp. *cinerascens*, *E. marginata* subsp. *marginata*, *E. patens*, *E. rudis* y *E. wandoo* subsp. *wandoo* (FBWAF; FNSW). Puesto que no existe aún representación en la base de datos de las secuencias *trnL* de dichas especies, sus respectivas relaciones con la secuencia problema de *T. aff. tincticollis* (JAJ163) no han podido ser estudiadas. Sin embargo, es interesante mencionar aquí que esta especie de *Trachymela* muestra un elevado grado de similitud morfológica con *T. tincticollis*, plaga de *E. gomphocephala* (Tribe y Cillié, 1997, 2000; Tribe 2000), y que esta especie de *Eucalyptus* está presente en el área de estudio. En la segunda localidad sólo se han citado dos especies de *Eucalyptus* que constituyen las mejores hipótesis de alimento del ejemplar estudiado: *E. decipiens* subsp. *decipiens* y *E. marginata* subsp. *marginata* (FBWAF; FNSW).

### ***Canobolas nobilis* (Lea, 1917) (árboles 85 y 86)**

En este mismo espécimen se han hallado secuencias relativas a las familias Caryophyllaceae (ya discutida en un apartado anterior; página 320, árbol 20) y Solanaceae (ver más adelante, p. 112, árbol 105). Pero además, se han obtenido secuencias para el *loop* P6 del intrón *trnL* que lo relacionan con la familia Myrtaceae. Desafortunadamente, no se ha podido amplificar el fragmento mayor del intrón *trnL*, y por tanto la inferencia dentro de esta familia vegetal permanece bastante imprecisa.

Como resultado curioso a destacar, se han encontrado dos secuencias distintas para el *loop* P6, cuya principal diferencia estriba en su longitud (108 pb y 114 pb). Aparte del indel que las diferencia, existe una transversión G:T en la posición 25 y una transición G:A en la posición 74 del alineamiento, que muy probablemente indican

que provienen de plantas diferentes. En ambos casos se detecta una relación con la familia Myrtaceae ( $pp = 0,99$  y  $1$ , respectivamente), pero mientras que la secuencia más corta (árbol 85) aparece en posición basal al clado de esta familia botánica, la secuencia de mayor longitud (árbol 86), aparece situada en posición basal al clado de Leptospermeae constituido por las especies del género *Leptospermum*, *Kunzea* y dos especies híbridas entre ambos géneros ( $pp = 0,89$ ). En general, las restantes relaciones no aparecen soportadas, probablemente debido a la falta de información filogenética asociada a este marcador molecular de corta longitud. Lo único que podemos afirmar con certeza es que este ejemplar presenta una asociación trófica con mirtáceas, pero no podemos precisar mejor con qué tribu o tribus, aunque los datos parecen apuntar a Leptospermeae, al menos en el caso de una de las secuencias, y es probable que esta selección no sea sobre Eucalypteae por los motivos que se han discutido en varios de los anteriores ejemplos.

El ejemplar estudiado procede de Mount Canobolas State Recreation Area (New South Wales, Australia). La localidad de colecta se encuentra en el límite entre las subdivisiones botánicas denominadas “New South Wales Central Tablelands” y “New South Wales Central Western Slopes”, donde cabe encontrar especies relativas a once de las 17 tribus que se establecen para la familia Myrtaceae: Backhouseieae (*Backhousea*), Chamelaucieae (*Babingtonia*, *Baeckea*, *Calytrix*, *Chamelaucium*, *Darwinia*, *Homoranthus*, *Hypocalymma*, *Micromyrtus*, *Ochrosperma* y *Thryptomene*), Eucalypteae (*Angophora*, *Corymbia* y *Eucalyptus*), Kanieae (*Tristaniopsis*), Leptospermeae (*Kunzea* y *Leptospermum*), Lophostemoneae (*Lophostemon*), Melaleuceae (*Callistemon*, *Calothamnus*, *Melaleuca*), Myrteae (*Rhodamnia*), Syncarpieae (*Syncarpia*), Syzygeae (*Acmena* y *Syzygium*) y Tristanieae (*Tristania*) (FNSW). Pero en cualquier caso, el espécimen estudiado procede de la comunidad vegetal de pastizal de claros de bosque donde únicamente se han citado las siguientes especies de Myrtaceae: *Eucalyptus canobolensis*, *E. dalrympleana* subsp. *dalrympleana*, *E. pauciflora* y *Leptospermum myrtifolium* (Hunter, 2002). El mismo autor señala la especie *Kunzea parvifolia* como una especie oportunista en el ecosistema. Atendiendo a la topología obtenida, *Leptospermum myrtifolium* y *Kunzea parvifolia* son dos de las especies con mayor probabilidad de ser la planta hospedadora de este crisomelino.

### Apuntes adicionales sobre las inferencias en Myrtaceae

Trece de los resultados discutidos en relación a la familia Myrtaceae están directamente relacionados con uno o los dos géneros disponibles de Leptospermeae, *Kunzea* y *Leptospermum*. En varios casos (árboles 49, 49, 63 y 64) hemos detectado un fenómeno cuya posible repercusión sobre los resultados justifica estas líneas de discusión, pues puede ser interpretado como un artefacto metodológico que pudiera afectar a éstas y a las otras inferencias.

Las secuencias del intrón *trnL* disponibles en la base de datos para *Kunzea* y *Leptospermum* se caracterizan por poseer un indel de 19 nucleótidos en la porción central de la secuencia que permite diferenciar a las especies de un género de las del otro, siendo las secuencias de *Kunzea* las de mayor longitud. Esta variación estructural (común, por otra parte, en la evolución de este marcador) determina que *blastn* produzca resultados inconsistentes en la búsqueda de secuencias para obtener los alineamientos iniciales.

*Kunzea* y *Leptospermum* son géneros evolutivamente próximos (O'Brien *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2005), por lo que al hacer una búsqueda *blastn* partiendo de una secuencia problema perteneciente (o próxima) a la tribu Leptospermeae cabría esperar que las secuencias de las especies de ambos géneros existentes en la base de datos apareciesen con un valor de *score* destacado en la relación de especies resultantes. Sin embargo, en cuatro de los casos estudiados (árboles 48, 49, 63 y 64) esto no ha sucedido así. Hemos observado que en dos de ellos (árboles 48 y 49) el resultado de *blastn* recupera las secuencias de las especies de *Leptospermum* pero no las de *Kunzea*, mientras que en los otros dos casos (árboles 63 y 64) sucede exactamente lo contrario. Este fenómeno parece deberse principalmente a tres factores. Primero, la longitud del indel conlleva un elevado coste asociado con la apertura y extensión del gap que puede propiciar una baja puntuación durante la fase de evaluación del alineamiento por parte del algoritmo de *blastn*, de modo que el *score* final de la secuencia es lo suficientemente bajo como para que no aparezca entre las secuencias recuperadas. Segundo, la región abarcada por el indel constituye por sí una zona donde no se obtiene ninguno de los puntos que se asignan a la identidad entre las bases de las dos secuencias alineadas, y por consiguiente el *score* final es comparativamente más bajo que en los casos donde no existe el gap. Y tercero, la ubicación justamente en la porción central de la secuencia de un indel de tal magnitud puede favorecer que *blastn* identifique a los dos fragmentos en los que queda dividida

la secuencia como dos secuencias distintas, asignándoles a cada una un valor de *score* diferente y que naturalmente será inferior al obtenido por el resto de secuencias extraídas de la base de datos, analizadas sin ser fragmentadas.

Por defecto, *blastn* aplica unas penalizaciones por apertura y extensión de gaps de 5 y 2 respectivamente. Hemos observado que la reducción de los valores de estos parámetros permite recuperar en la búsqueda las secuencias que al emplear los valores por defecto no aparecían, de modo que se atenúa el efecto de disminución del *score*. Una posible solución al problema podría consistir en la modificación de estos parámetros como estrategia general antes de proceder a realizar la búsqueda *blastn*, aunque hemos de tener en cuenta que este caso parece ser una situación especial en la que el grupo de plantas de interés está escasamente representado y al tiempo presenta un indel particularmente singular. En las demás inferencias realizadas en nuestro estudio no se ha observado ningún otro caso parecido, por lo que creemos que el método empleado no necesita ser modificado.

De cara a realizar inferencias tróficas, el caso concreto de los representantes de la tribu Leptospermeae (Myrtaceae) es especial ya que son únicamente dos los géneros actualmente existentes en las bases de datos y la exclusión de uno de ellos de los análisis elimina automáticamente la posibilidad de establecer la pertenencia de la secuencia problema a dicha tribu, excepto en los casos donde la secuencia queda perfectamente integrada en el clado de las especies del género representado.

Para precisar mejor la pertenencia de las secuencias problema afectadas por este problema, hemos realizado un análisis adicional donde se incluyen todas las secuencias del intrón *trnL* de las especies *Kunzea* y *Leptospermum* de la base de datos junto a doce secuencias de este tipo relacionadas con Leptospermeae obtenidas por nosotros. La secuencia de *Lophostemon confertus* ha sido utilizada como grupo externo, ya que esta especie está reconocida como un linaje basal dentro de la familia Myrtaceae (Wilson *et al.*, 2005) y se ha empleado con el mismo fin en análisis filogenéticos de grupos muy relacionados con la tribu Leptospermeae (Ladiges *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2000, Brown *et al.*, 2001). En esta filogenia (árbol 87) por un lado se recupera un clado que representa el linaje más inclusivo que incorpora secuencias de *Kunzea* y *Leptospermum* (clado A; *pp* = 1), y que por tanto representa a la tribu Leptospermeae. Es por ello que podemos establecer con seguridad que las secuencias halladas en las especies *Faex notatipennis* (árbol 45), *Paropsis minor* (árbol 48), *P. pictipennis* (árbol 49), *Paropsisterna aff. lignea* (árbol 63), *P. obliterata*

(árbol 64) y *P. aff. intertincta* (JAJ145) (árbol 67), (JAJ147) (árbol 68) y (JAJ148) (árbol 69) pertenecen a especies de la tribu Leptospermeae. Dentro del clado A, el clado B está formado por las especies de *Kunzea*, *Paropsisterna aff. lignea* y *P. obliterata* ( $pp = 0,7$ ). La posición sistemática de estas dos últimas especies en el árbol también es compatible con la posición que podrían ocupar especies de otros géneros de la tribu Leptospermeae, por lo que en base a este resultado no podemos establecer con seguridad el trofismo de ambas sobre especies de *Kunzea*. Afortunadamente las dos especies proceden de New South Wales donde en relación a la tribu Leptospermeae no se han citado especies de otros géneros diferentes a *Kunzea* o *Leptospermum* (FNSW), lo que nos permite garantizar su trofismo sobre el primero. Conviene insistir aquí en que entre las especies incluidas existen dos híbridos de *Kunzea* y *Leptospermum*, y que atendiendo a la topología recuperada parece claro que en ambas la dotación genética cloroplástica es propia de las especies de *Kunzea*. El clado C parece ser el clado de las especies de *Leptospermum* ( $pp = 0,87$ ). En él se incluyen junto a la secuencia de *Leptospermum scoparium* las secuencias halladas en *Faex notatipennis*, *Paropsis minor* y *P. pictipennis*. Al igual que sucede con el clado B, estas tres especies fueron colectadas en New South Wales donde en relación a Leptospermeae tan sólo se conocen representantes de *Kunzea* y *Leptospermum* (FNSW), lo que combinado con el árbol obtenido garantiza el trofismo de estas especies sobre integrantes de *Leptospermum*. Por último, el clado D carece de soporte y en él se incluyen las secuencias obtenidas en tres ejemplares de *Paropsisterna aff. intertincta* de distintas localidades del suroeste de Western Australia y que podrían corresponder a cualquier otro género de Leptospermeae, por ejemplo *Agonis* o *Homalospermum*, ambos presentes en el área de captura de estos ejemplares (FBWAF). La observación de especies de este grupo de *Paropsisterna* sobre *Agonis* (C.A.M Reid, comunicación personal) refuerza considerablemente nuestra hipótesis trófica.

Por otro lado se recupera un clado constituido por las secuencias halladas en las especies *Paropsisterna aff. decolorata*, *P. semifumata*, *Peltoschema sp.* y *Rhaebosterna sciola* (clado E;  $pp = 1$ ). Estas secuencias podrían pertenecer a especies de Myrtaceae relativas a una tribu diferente a Leptospermeae. En particular, podría corresponder a Melaleuceae, pues sabemos que al menos *Paropsisterna semifumata* y *Rhaebosterna sciola* fueron colectadas sobre especies de esta tribu.

Resumiendo, el análisis pormenorizado que acabamos de discutir nos ha permitido profundizar aún más en las inferencias tróficas previamente realizadas en



cada una de las especies de manera individual, salvando el problema del sesgo en los resultados de *blastn* derivado de la particular idiosincrasia de las secuencias estudiadas.

## **NOTHOFAGACEAE Kuprianova**

Se ha detectado una relación trófica con la familia Nothofagaceae en los géneros *Ewanius* Reid, 2002 y *Novacastria* Selman 1983, congruente con lo que se conocía sobre la biología de estos insectos (Selman y Lowman, 1983; Reid, 2002; Daccordi y de Little, 2003). Se tiene constancia del trofismo sobre *Nothofagus* por parte de otros crisomélidos pertenecientes a las subfamilias Eumolpinae y Spilopyrinae Chapuis, 1874 (Jolivet y Hawkeswood, 1995), además del caso discutido previamente de *Araucanomela wellingtonensis* (página 301, árbol 1; ver la discusión de esta especie para más detalles sobre la sistemática del género *Nothofagus*).

### ***Ewanius* Reid, 2002**

#### ***Ewanius nothofagi* Reid, 2002 (árbol 88)**

*Ewanius* es un género endémico de Tasmania para el que únicamente se conoce la especie *Ewanius nothofagi* Reid, 2002, cuyo epíteto específico deriva del trofismo observado tanto en larvas como adultos sobre plantas del género *Nothofagus*, concretamente sobre las especies *N. cunninghamii* y *N. gunnii* (Reid, 2002). Los resultados hallados en nuestro estudio confirman y refuerzan tal relación, pues además de que el ejemplar fue colectado sobre *N. cunninghamii* en South West National Park (Tasmania, Australia), el resultado obtenido relaciona claramente a esta especie con la familia Nothofagaceae ( $pp = 1$ ) y sitúa a la secuencia problema en el clado conformado por las especies del subgénero *Lophozonia* ( $pp = 1$ ). La topología recuperada revela una relación no soportada con la especie *Nothofagus cunninghamii*.

El elevado valor de probabilidad posterior que vincula a la secuencia problema con el clado compuesto por las especies del subgénero *Lophozonia* sumado al hecho de que *N. cunninghamii* es la única especie de este subgénero que habita en Tasmania (Knapp *et al.*, 2005) es información suficiente para garantizar que la inferencia filogenética recupera la planta hospedadora de *E. nothofagi*. La relación con

*N. gunnii*, la otra especie de *Nothofagus* que habita en Tasmania, puede ser descartada ya que su secuencia ha sido incluida en el análisis sin que se aprecie relación especial alguna con la secuencia obtenida en el ejemplar analizado. De todas formas, conviene anotar aquí que existe una cita previa de esta especie sobre *N. gunnii* (Reid, 2002), aunque este trofismo ha sido cuestionado (Daccordi y de Little, 2003). Un análisis más comprensivo donde se incluya un mayor número de insectos procedentes de diferentes poblaciones podría contribuir a determinar el espectro trófico de este crisomelino.

#### ***Novacastria nothofagi* Selman, 1983 (árbol 89)**

El resultado obtenido establece una clara relación trófica con la familia Nothofagaceae ( $pp = 1$ ), concretamente con la especie *Nothofagus moorei* ( $pp = 0,98$ ). La secuencia problema se ubica en el clado del subgénero *Lophozonia*, para el cual se han incluido en el análisis las dos especies existentes en Australia. *Nothofagus moorei* es endémico de los hábitat de bosque pluvial templado-frío en el este de Australia, y se considera un árbol dominante en Barrington Tops (New South Wales, Australia), de donde proviene el ejemplar analizado, así como en el área de New England y en los Border Ranges entre New South Wales y Queensland (Groves, 1994). *Novacastria nothofagi* se alimenta exclusivamente de *Nothofagus moorei* (Selman y Lowman, 1983; Reid, 2002; Daccordi y de Little, 2003), y aunque ha sido demostrado que puede completarse su ciclo vital en el laboratorio proporcionándole hojas de la especie relacionada *Nothofagus cunninghamii* (de Little, 1985), no parece posible que esta situación pueda darse en condiciones naturales ya que la distribución de *Novacastria nothofagi* está supeditada a la de *Nothofagus moorei* y no existe solapamiento territorial entre ambas especies de *Nothofagus* (Groves, 1994).

#### **OLEACEAE Hoffmannsegg et Link, nom. cons.**

A nivel mundial son pocos los crisomélidos que se alimentan de oleáceas (Jolivet y Hawkeswood, 1995), aunque esta relación trófica ya se ha propuesto para Chrysomelinae australianos del género *Eulina* (Reid, 2006). Nosotros hemos podido estudiar una especie de este género y hemos inferido una alimentación consistente con este dato, aunque con un género de esta familia no reportado hasta ahora.

***Eulina Baly, 1855***

*Eulina* es un género con un reducido número de especies que se incluye en el denominado “grupo de *Phyllocharis*” (Reid, 2006). Existen otros miembros pertenecientes a este grupo de especies filogenéticamente cercanas cuya alimentación conviene destacar, como son *Chalcolampra* (Asteraceae: Reid, 2006; Pittosporaceae: este trabajo; Lamiaceae: Reid, 1993; y Scrophulariaceae: Reid, 1993), *Johannica* (Bignoniaceae: Monteith, 1991; Reid, 1991; este estudio), *Phola* (Verbenaceae: Jolivet y Hawkeswood, 1995; Reid, 2006) y *Phyllocharis* [Apocynaceae: este estudio; Solanaceae: Reid, 2006; y Lamiaceae (*Clerodendrum ex Verbenaceae*): Reid, 2006], ya que las familias Bignoniaceae, Lamiaceae, Oleaceae, Scrophulariaceae o Verbenaceae son también evolutivamente próximas perteneciendo al orden Lamiales (Soltis *et al.*, 2005).

***Eulina pulchra* Lea, 1929 (árbol 90)**

Reid (2006) cita esta especie sobre los géneros *Notelaea* Vent. (Oleaceae) y *Citriobatus* A.Cunn. (Pittosporaceae). El resultado obtenido a partir de la filogenia de *trnL* establece una relación trófica con la primera familia ( $pp = 0,8$ ). Sin embargo, la secuencia problema se sitúa en el clado formado por las especies del género *Ligustrum* L. ( $pp = 0,96$ ) mostrando una especial relación con las especies *L. ovalifolium* Hassk., *L. sinense* Lour. y *L. vulgare* L. ( $pp = 0,97$ ). El género *Ligustrum* aparece en el árbol como una entidad claramente monofilética reforzando los resultados publicados en estudios moleculares previos que han empleado los marcadores ETS, ITS, *rps16* y *trnL-F* (Wallander y Albert, 2000; Li *et al.*, 2002), lo que a la luz de la topología recuperada y los valores de probabilidad posterior que la soportan nos permite establecer con total seguridad la pertenencia de la secuencia problema a este género de Oleaceae.

El espécimen estudiado fue colectado en Leigh (New South Wales, Australia) donde se han citado dos especies de oleáceas: *Jasminum dallachii* F.Muell. y *Ligustrum sinense* (FNSW). El género *Jasminum* L. está muy bien representado y soportado en nuestro análisis (11 spp.;  $pp = 1$ ) por lo que la especie *J. dallachii* puede ser descartada de nuestra inferencia. En cuanto al género *Ligustrum*, a un nivel regional más amplio, en New South Wales se conocen otras dos especies de este género: *L. lucidum* Aiton y *L. vulgare* (APCD). Las áreas distribución de estas especies

incluyen la localidad de colecta, la cual se encuentra en una región dominada por hábitat de bosque pluvial templado-frío donde las especies *L. lucidum* y *L. sinense* encuentran condiciones muy favorables para su desarrollo (Harden, 1991). Las secuencias del intrón *trnL* de *L. sinense* y *L. vulgare* han sido incluidas en el análisis y aunque su proximidad a ambas es notoria, el resultado obtenido no permite establecer una relación directa con ninguna de ellas, por lo que las tres especies de *Ligustrum* citadas en New South Wales deberían ser consideradas como posibles candidatas a ser la planta hospedadora del ejemplar de *E. pulchra* estudiado.

Por añadidura, podemos descartar la pertenencia de la secuencia problema al género *Notelaea* sobre el que existen citas de *Eulina pulchra*, pues se ha demostrado que este género (subtribu *Oleinae*) es una entidad monofilética bien definida y filogenéticamente alejada de *Ligustrum* (subtribu *Ligustrinae*) (Wallander y Albert, 2000) tal y como se muestra en la topología recuperada en nuestro análisis.

Es importante anotar que el género *Eulina* es endémico del este de Australia (Reid, 2006), mientras que las especies de *Ligustrum* presentes en dicho continente son plantas introducidas por su utilidad en jardinería que se han naturalizado gracias a su carácter invasor (Harden, 1991; FNSW), lo que sugiere que *E. pulchra* posee un espectro trófico lo suficientemente amplio como para alimentarse de otras oleáceas diferentes a las que se encuentran en su hábitat de manera natural.

#### **PITTOSPORACEAE R.Br., nom. cons.**

Pittosporaceae es una pequeña familia de plantas en su mayor parte restringida a Australia (Chandler *et al.*, 2007), y a nivel mundial, es una familia sobre la que se alimenta un reducido número de Chrysomelidae (Jolivet y Hawkeswood, 1995).

Hasta la fecha, entre los crisomelinos australianos tan sólo los géneros *Eulina* y *Lamprolina* habían sido relacionados con este grupo de plantas (Reid, 2006). En nuestro estudio, dos de los géneros estudiados han mostrado una relación trófica con dicha familia, *Chalcolampra* y *Lamprolina* Baly, 1855. La inferencia trófica sobre Pittosporaceae obtenida en nuestro trabajo para el género *Chalcolampra* representa una nueva aportación al conocimiento de su biología y contribuye a reforzar su relación evolutiva con los géneros *Eulina* y *Lamprolina*, ya que los tres pertenecen al

conjunto de géneros filogenéticamente próximos informalmente denominado “grupo de *Phyllocharis*” (Reid, 2006).

(NOTA: Las especies *Cheiranthra linearis* A.Cunn. ex Lindl. y *Pittosporum ferrugineum* W.T.Aiton presentan sus respectivos nombres intercambiados entre sí en la base de datos (G.T. Chandler, comunicación personal). Este error ha sido detectado y tenido en cuenta a la hora de elaborar nuestros análisis, de manera que en los árboles presentados ambas secuencias están correctamente asociadas a sus respectivos nombres.)

### ***Chalcolampra* Blanchard, 1853**

Existe poca información sobre las plantas hospedadoras de *Chalcolampra* (Reid y Smith, 2004), que hasta ahora han sido atribuidas a las familias Asteraceae (*Senecio*), Lamiaceae (*Prostanthera* Labill.) y Scrophulariaceae (*Parahebe* W.R.B.Oliv. nom. cons.) (Reid, 2006). El resultado obtenido sobre Pittosporaceae representa una nueva aportación al conocimiento del comportamiento alimenticio de este género.

### ***Chalcolampra* sp. (JAJ131) (árbol 91)**

Este ejemplar de *Chalcolampra* permite recuperar una relación con la familia Pittosporaceae ( $pp = 1$ ), y más concretamente con el clado formado por las especies *Billardiera fusiformis* Labill., *B. longiflora* Labill., *B. fraseri* (Hook.) F.Muell., *B. cymosa* F.Muell., *B. heterophylla* (Lindl.) L.Cayzer et Crisp, *B. lehmanniana* (Putt.) F.Muell., *B. variifolia* DC., *Marianthus ringens* F.Muell. y *Cheiranthra linearis* ( $pp = 0,93$ ). Todas ellas pertenecen al informalmente denominado “clado de *Billardiera*”, que reúne los géneros *Bentleya* E.M.Benn., *Billardiera*, *Cheiranthra* A.Cunn. ex Brongn., *Marianthus* Hugel ex Endl. y *Sollya* Lindl. (Chandler et al., 2007). Ya que la secuencia *trnL* procedente del animal estudiado es totalmente idéntica a la de las especies *B. fraseri*, *B. fusiformis*, *B. heterophylla* y *B. longiflora*, podemos restringir con bastante seguridad la planta hospedadora de esta especie de *Chalcolampra* al género *Billardiera*.

*Billardiera* es un género constituido por 23 especies, once de las cuales se encuentran en Western Australia (Cayzer et al., 2004; FBWAF): *B. coriacea* Benth., *B. drummondii* (C.Morren) L.Cayzer et Crisp, *B. floribunda* (Putt.) F.Muell., *B. fraseri*, *B. fusiformis*, *B. heterophylla*, *B. laxiflora* (Benth.) E.M.Benn., *B. lehmanniana*, *B.*

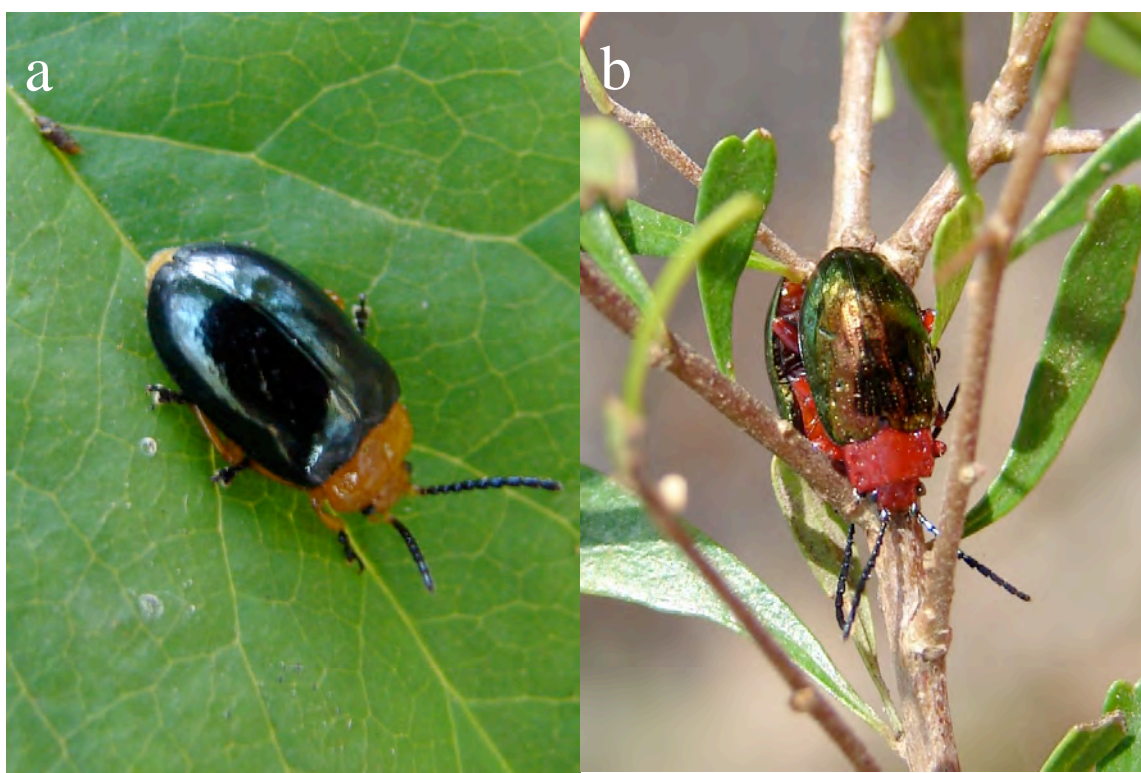
*speciosa* (Endl.) F.Muell., *B. variifolia* y *B. venusta* (Putt.) L.Cayzer et Crisp. El ejemplar de *Chalcolampra* estudiado procede de Stirling Range National Park (Western Australia, Australia) (Figura 4.3-12) donde únicamente se ha citado la especie *B. variifolia* (Pignatti et al., 1993). Pero de momento, todas las especies mencionadas pueden ser consideradas candidatas a ser la especie de la que proviene la secuencia problema. Identificar la especie concreta requeriría un análisis de secuencias provenientes de un marcador molecular de evolución más rápida que permitiese recuperar la divergencia específica de este conjunto de plantas.



**Figura 4.3-12.** Formaciones montañosas características de Stirling Range National Park (WA, Australia) (Fotografía: J. A. Jurado-Rivera)

***Lamprolina* Baly, 1855**

Se han estudiado tres especies diferentes de *Lamprolina* detectándose en todas ellas una relación trófica con la familia Pittosporaceae (Figura 4.3-13). Este género ha sido previamente citado sobre los géneros de Pittosporaceae *Bursaria* Cav., *Hymenosporum* R.Br. ex F.Muell. y *Pittosporum* Banks ex Gaertn., nom. cons. (Hawkeswood, 1986; Reid, 2006). Existe además una cita sobre *Tasmannia* R.Br. (Winteraceae Lindley) para una especie no descrita de *Lamprolina* (Reid, 2006). Nuestros resultados confirman los géneros *Bursaria* y *Pittosporum* como hospedadores de *Lamprolina*.



**Figura 4.3-13.** *Lamprolina* spp. en Cumberland State Forest (NSW, Australia) a) *Lamprolina simillima* sobre *Pittosporum undulatum* (Pittosporaceae) y b) *Lamprolina* sp. sobre *Bursaria spinosa* (Pittosporaceae) (Fotografías: J. A. Jurado-Rivera).

***Lamprolina* aff. *aeneipennis* (Boisduval, 1835) (196180) (árbol 92)**

Para esta especie de *Lamprolina* se recupera una relación trófica con la familia Pittosporaceae ( $pp = 1$ ), ubicándose la secuencia problema en el clado integrado por las especies del género *Bursaria* presentes en el análisis ( $pp = 0,97$ ), donde cabe destacar la especial relación con la especie *B. spinosa* Cav. ( $pp = 0,71$ ).

El espécimen estudiado fue colectado en un bosque de *Bursaria* en las proximidades de Bellbird (New South Wales, Australia) donde se han citado cuatro especies de Pittosporaceae: *B. spinosa* subsp. *spinosa*, *Hymenosporum flavum* (Hook.) F.Muell., *Pittosporum multiflorum* (A.Cunn. ex Loudon) L.W.Cayzer *et al.* y *P. revolutum* Dryand. ex W.T.Aiton (FNSW). En nuestro análisis las especies de *Bursaria* constituyen un clado monofilético y bien soportado, lo que nos permite descartar la pertenencia de la secuencia problema a cualquier especie de los géneros *Hymenosporum* o *Pittosporum*. Así, atendiendo a la información disponible, *B. spinosa* es el candidato con mayor probabilidad de ser la planta hospedadora del ejemplar de *L. aff. aeneipennis* estudiado.

#### ***Lamprolina simillima* Baly, 1855 (árbol 93)**

En el caso de *L. simillima*, el resultado obtenido pone de manifiesto de nuevo un trofismo sobre la familia Pittosporaceae ( $pp = 1$ ), pero en esta ocasión la secuencia problema aparece incluida en el clado formado por las especies *Pittosporum angustifolium* Lodd., *P. ferrugineum*, *P. ligustrifolium* A.Cunn. ex Putt. y *P. undulatum* Vent. ( $pp = 0,95$ ). La filogenia sitúa a la secuencia problema junto a la especie *P. undulatum*, aunque sin valores elevados de probabilidad posterior. Este dato es congruente con la observación de campo, pues el material estudiado procede de Cumberland State Forest (New South Wales, Australia) donde fue colectado sobre una rama de *P. undulatum* (planta identificada por L.W. Cayzer, comunicación personal) (Figura 4.3-13-a). *P. undulatum* es además la única especie de *Pittosporum* presente en la localidad de colecta (Fairley y Waterhouse, 2005; FNSW).

#### ***Lamprolina simplicipennis* Lea, 1916 (árbol 94)**

Para esta especie también podemos observar una relación con la familia Pittosporaceae ( $pp = 1$ ). Y aunque la secuencia problema aparece incluida en el clado constituido por las catorce especies de *Pittosporum* presentes en el análisis, esta relación no está soportada por valores significativos de probabilidad posterior. Esta ausencia de soporte para el clado de *Pittosporum* claramente condiciona la inferencia realizada, aunque el hecho de que todas las especies de este género conformen un único clado en el que se incluye la secuencia problema puede ser considerado como una evidencia a favor de una relación trófica con una de sus especies, lo que estaría



en sintonía con las citas tróficas disponibles en la literatura para el género *Lamprolina* (Hawkeswood, 1986; Reid, 2006).

El material estudiado procede de las proximidades de Thyringham (New South Wales, Australia) donde se han citado tres especies de Pittosporaceae: *Billardiera scandens* Sm., *P. multiflorum* y *P. revolutum* (FNSW). Estas especies, y en particular las de *Pittosporum*, han de ser consideradas como el conjunto de plantas con mayor probabilidad de albergar a la especie de la cual proviene la secuencia problema.

### **PLANTAGINACEAE Jussieu, nom. cons.**

A nivel mundial son muchos los crisomélidos que se alimentan de plantagináceas de manera natural o potencial. Ciertas especies de crisomelinos paleárticos pertenecientes a los géneros *Chrysolina* y *Timarcha* utilizan *Plantago* L. como planta nutricia (Jolivet y Hawkeswood, 1995). Hasta ahora ningún Chrysomelinae de la fauna australiana se había asociado a esta familia botánica, así que nuestros datos relacionándola con el género *Geomela* Lea, 1916 son inéditos.

### ***Geomela* Lea, 1916**

*Geomela* es un endemismo australiano cuya alimentación, al igual que el resto de su biología, permanece prácticamente desconocida. Reid (2006) propone una posible relación con los grupos Scrophulariaceae (género *Parahebe*) y Bryophyta, aunque en este último caso los datos existentes se refieren tan sólo a observaciones de presencia y no a citas de comportamiento alimenticio. El resultado obtenido en nuestro análisis pone de manifiesto la relación trófica de *Geomela* con el género *Plantago*.

La familia Scrophulariaceae *sensu lato* (s.l.) no es monofilética (Olmstead y Reeves, 1995), y diversos trabajos de índole filogenética y taxonómica han demostrado la existencia de siete grupos naturales constituidos en su mayor parte por especies antes consideradas como pertenecientes a la mencionada familia: Scrophulariaceae *s.str.*, Veronicaceae Cassel [=Plantaginaceae Jussieu, nom. cons. *in* Angiosperm Phylogeny Group II (2003)], Orobanchaceae Vent., nom. cons., Phrymaceae Schauer, nom. cons., Stilbaceae Kunth, nom. cons., Linderniaceae

Borsch, K. Müller, *et al.* Fischer y Calceolariaceae (D. Don) Olmstead (Tank *et al.*, 2006).

Las especies de *Parahebe* han sido recientemente sinonimizadas con el género *Veronica* L. en aras de establecer la monofilia de este último (Albach y Chase, 2004; Garnock-Jones *et al.*, 2007). Por su parte, los géneros *Veronica* y *Plantago* se consideran muy estrechamente relacionados (Olmstead y Reeves, 1995; Olmstead *et al.*, 2001; Albach *et al.*, 2005) y ambos pertenecen a diferentes subfamilias de la familia Veronicaceae [=Plantaginaceae *sensu* Angiosperm Phylogeny Group II (2003)] (Tank *et al.*, 2006). Esta proximidad evolutiva entre *Parahebe* (= *Veronica*) y *Plantago* hace que ambas citas tróficas se refuercen mutuamente otorgando robustez a la idea de que estos géneros se encuentran entre las plantas hospedadoras de *Geomela*.

***Geomela aff. blackburni* Lea, 1916 (JAJ59) (árbol 95)**

El resultado obtenido establece una relación con la familia Plantaginaceae (=Veronicaceae *sensu* Olmstead *et al.*, 2001) ( $pp = 0,87$ ), con la secuencia problema ubicada en el clado formado por las 44 especies del género *Plantago* presentes en el análisis ( $pp = 1$ ), mostrando una especial relación con el subclado integrado por las especies *Plantago debilis* R.Br., *P. spathulata* Hook.f. y *P. raoulii* Decne. ( $pp = 0,98$ ).

En cualquier caso, podemos descartar la pertenencia de la secuencia problema al género *Parahebe* (= *Veronica*) pues en tal caso cabría recuperar en el árbol una relación con el clado formado por las especies *Lagotis angustibracteata* P.C.Tsoong *et al.* H.P. Yang, *Veronicastrum liukiense* (Ohwi) T. Yamaz., *V. stenostachyum* (Hemsl.) T. Yamaz. y *Wulfenia orientalis* Boiss. ( $pp = 1$ ) todas ellas pertenecientes (al igual que *Parahebe*) a la subfamilia Veroniceae (Tank *et al.*, 2006).

Existen unas doscientas especies de *Plantago* en todo el mundo clasificadas en cinco subgéneros (Rahn, 1996; Rønsted *et al.*, 2002). De manera natural, en Australia tan sólo habitan especies del subgénero *Plantago* relativas a la sección Mesembrynia y a la sección Oliganthos serie Microcalyx (*sensu* Rahn, 1996). Las especies integrantes del clado inferido, *P. debilis*, *P. spathulata* y *P. raoulii* constituyen un linaje monofilético y pertenecen al conjunto de especies del subgénero *Plantago* sección Mesembrynia (Rahn, 1996; Rønsted *et al.*, 2002). De ellas, tan sólo *P. debilis* se encuentra en Australia, siendo *P. spathulata* y *P. raoulii* propias de Nueva Zelanda.

Podemos rechazar la pertenencia de la secuencia problema al subgénero *Plantago* sección Oliganthos ya que en el árbol obtenido no se recupera ninguna relación soportada con las especies de este grupo que sí están presentes en el análisis, *P. rigida* Hort. ex Roem. et Schult. y *P. uniglumis* Wallr. ex Walp.

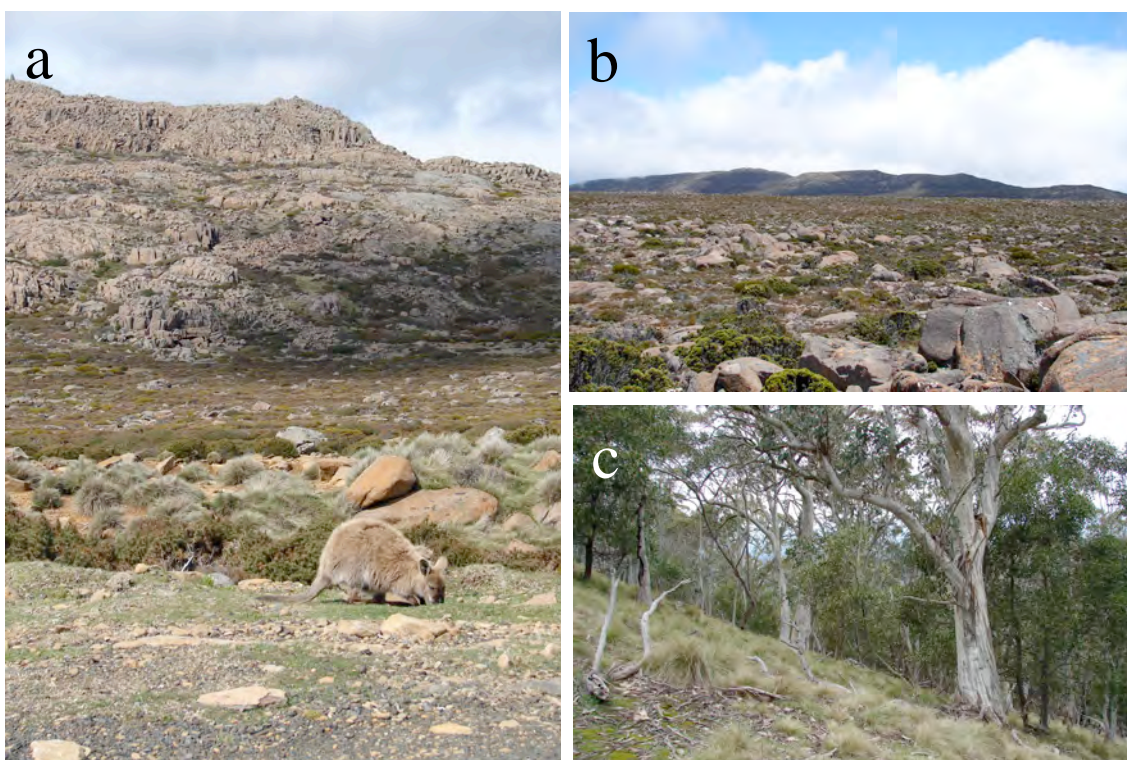
El espécimen estudiado procede de Mount Canobolas State Recreation Area (New South Wales, Australia), donde fue hallado al emplear el método de *grasstuffing* en el estrato herbáceo de una comunidad vegetal de pastizal en claros de bosque.

En New South Wales se han citado veinte especies de *Plantago* (FNSW), once de las cuales pertenecen al subgénero *Plantago* sección Mesembrynia: *P. alpestris* B.G.Briggs et al., *P. antarctica* Decne., *P. cladarophylla* B.G.Briggs et al., *P. cunninghamii* Decne., *P. debilis*, *P. drummondii* Decne., *P. euryphylla* B.G.Briggs et al., *P. gaudichaudii* Barneoud, *P. hispida* R.Br., *P. turrifera* B.G.Briggs et al. y *P. varia* R.Br. Atendiendo al rango de distribución de estas once especies, tan sólo *P. debilis*, *P. gaudichaudii*, *P. hispida*, *P. turrifera* y *P. varia* podrían potencialmente habitar la zona de colecta. Es importante anotar que *P. gaudichaudii*, *P. turrifera* y *P. varia* son filogenéticamente próximas a las especies del clado inferido en nuestro resultado (Rahn, 1996). En la localidad de colecta sólo se han citado dos especies de *Plantago*: *P. lanceolata* L. y *P. varia*, de las cuales tan sólo la segunda habita en el tipo de comunidad vegetal donde se capturó el ejemplar estudiado (Hunter, 2002). El trofismo sobre *P. lanceolata* queda descartado ya que esta planta pertenece al subgénero *Plantago* sección Lanceifolia (sensu Rahn, 1996), y además no sólo ha sido incluida en el análisis sin estar relacionada con la secuencia problema, sino que aparece significativamente agrupada con las demás especies de su misma y diferente sección: *P. argentea* Chaix, *P. lagopus* L. y *P. leiopetala* Lowe ( $pp = 0,86$ ).

El árbol filogenético obtenido, los conocimientos sobre la taxonomía del grupo botánico en cuestión y los registros florísticos de la zona de estudio señalan a la especie *P. varia* como la planta hospedadora más probable para el ejemplar de *Geomela* sometido a análisis, secundada por las especies del subgénero *Plantago* sección Mesembrynia de potencial presencia en el área de estudio.

**PROTEACEAE Jussieu, nom. cons.**

A nivel mundial son pocos los crisomélidos que se alimentan de proteáceas, existiendo tan sólo registros aislados de algunas especies pertenecientes a las subfamilias Alticinae, Chrysomelinae, Cryptocephalinae Gyllenhal, 1813 y Galerucinae (Jolivet y Hawkeswood, 1995; Reid, 2006). Entre los Chrysomelinae, hasta la fecha las citas de trofismo sobre proteáceas para la fauna australiana se refieren únicamente a los géneros *Ateratocerus* Blackburn, 1890 y *Pterodunga* Daccordi, 2000 (Reid, 2006). En nuestro trabajo hemos establecido esta asociación trófica en una especie no descrita del género *Palaeomela* Daccordi, 1996, lo que amplía la significación de esta familia como alimento de estos coleópteros.

***Palaeomela* Daccordi, 1996**

**Figura 4.3-14.** Algunos ejemplos de hábitat montañoso propio de las especies de *Palaeomela*. a) Ben Lomond National Park (Tasmania, Australia). b) Mount Wellington (Tasmania, Australia). c) Mount Canobolas State Recreation Area (NSW, Australia) (Fotografías: J. A. Jurado-Rivera).

*Palaeomela* es un género de reciente creación (Daccordi, 1996) integrado por dos especies descritas y al menos tres sin describir (Reid, 2006), y cuya biología es desconocida ya que son insectos difíciles de encontrar en el campo y que rara vez son colectados (Daccordi y de Little, 2003; observación personal) (Figura 4.3-14). No

existe información previa acerca del comportamiento alimenticio de *Palaeomela* (Reid, 2006) por lo que los resultados obtenidos en este trabajo, que además de Proteaceae incluyen a Rubiaceae como se discutirá más adelante, constituyen las primeras citas tróficas para el género.

***Palaeomela* sp.** (JAJ57) (árbol 96)

El resultado obtenido establece una relación con la familia Proteaceae ( $pp = 1$ ). La secuencia problema aparece incluida en el clado formado por las especies *Macadamia integrifolia* Maiden et Betche, *Neorites kevediana* L.S.Sm., *Orites lancifolia* F.Muell. y *Roupala montana* Aubl. ( $pp = 0,94$ ), todas ellas pertenecientes a la subfamilia Grevilloideae (Johnson y Briggs, 1975; Hoot y Douglas, 1998) y entre las que cabe destacar una especial relación con la secuencia de *O. lancifolia* ( $pp = 1$ ).

El material estudiado procede de Mount Kosciuszko National Park (New South Wales, Australia) donde se han citado únicamente tres especies de Proteaceae: *Grevillea australis* R.Br., *G. victoriae* F.Muell. subsp. *nivalis* V.Stajsik et W.Molyneux y *Orites lancifolia* (Costin, 1979). A nivel mundial se conocen nueve especies de *Orites*, siendo siete de ellas endémicas de Australia y de las cuales es posible encontrar dos en New South Wales, *O. excelsa* R.Br. y *O. lancifolia* (Harden, 1991).

La distribución de *O. excelsa* se restringe a la región más septentrional de Hunter Valley y al oeste de Barrington Tops, mientras que *O. lancifolia* es común entre rocas en áreas abiertas por encima de los 1300 metros de altitud en las zonas alpinas o subalpinas de las montañas al sur de Australian Capital Territory (FNSW), donde se ubica la localidad de colecta del espécimen estudiado. Esta información nos permite establecer con un alto grado de seguridad la relación trófica de esta especie de *Palaeomela* con la proteácea *Orites lancifolia*.

**RUBIACEAE Jussieu, nom. cons.**

A nivel mundial, relativamente pocos crisomélidos se alimentan de rubiáceas y en la mayoría de los casos las citas corresponden a especies con un amplio espectro trófico, de modo que la elección de este grupo de plantas no es específica (Jolivet y Hawkeswood, 1995). En relación a la familia Chrysomelinae, los mismos autores

aportan citas sobre Rubiaceae únicamente para dos géneros: *Ceralces* Gerstaecker, 1855 y *Timarcha*, aunque en el primer caso las citas parecen ser accidentales (*sic*). Entre los crisomelinos australianos, tan sólo el género *Chalcomela* ha sido previamente citado sobre este grupo botánico (Reid, 2006), y en nuestro trabajo ampliamos la importancia de este trofismo al proponerlo por primera vez para una de las dos especies estudiadas del género *Palaeomela*.

### ***Palaeomela Daccordi*, 1996**

#### ***Palaeomela punctifrons* (Lea, 1903) (árbol 97)**

Para esta especie se recupera una relación trófica con la familia Rubiaceae ( $pp = 1$ ), más concretamente con el clado integrado por los representantes de la subfamilia Rubioideae ( $pp = 0,91$ ). La posición de la secuencia problema no permite extraer una inferencia trófica directa sobre ninguna entidad taxonómica concreta de Rubioideae, por lo que la interpretación de los resultados se debe inferir a partir de otros datos. En todo caso, la relación trófica con alguno de los miembros de la subfamilia Rubioideae está garantizada.

Las especies de Rubioideae se distribuyen en 16 tribus (Bremer y Manen, 2000) diez de las cuales están representadas en el árbol obtenido: Anthospermeae Chamisso and Schlechtendal ex de Candolle, Argostemmateae Bremekamp ex Verdcourt, Coussareeae J.D.Hooker, en G.Bentham y J.D.Hooker, Morindeae Miquel, Ophiorrhizeae Bremekamp ex Verdcourt, Paederieae de Candolle, Psychotrieae Cham. y Schltldl, Spermacoceae Bercht. y J.Presl, Theligoneae Wunderlich ex S.Darwin y Urophyllaeae Bremekamp ex Verdocourt. Las tribus menores Coussareeae, Lasiantheae B.Bremer y Manen (no representada en nuestro análisis), Ophiorrhizeae y Urophyllaeae conforman una gradación basal con respecto al resto de la subfamilia, que consiste en dos ramas muy bien definidas informalmente denominadas alianzas Psychotrieae y Spermacoceae, donde se incluyen la mayoría de géneros y especies (Bremer y Manen, 2000).

Las tribus Ophiorrhizeae y Urophyllaeae representan los linajes más plesiomórficos de la subfamilia Rubioideae (Andersson y Rova, 1999; Bremer y Manen, 2000; Rova *et al.*, 2002). En el árbol obtenido observamos una robusta relación entre la secuencia problema y el gran clado que comprende a todos los

representantes de la subfamilia Rubioideae incluidos en el análisis a excepción de las especies propias de las tribus Urophyllaeae y Ophiorrhizeae ( $pp = 1$ ), por lo que podemos descartar la pertenencia de la secuencia problema a cualquiera de estos dos linajes.

La alianza Spermaceae está representada en nuestro resultado por cinco de las seis tribus que la integran (Rubieae no está incluida): Anthospermeae, Argostemmateae, Paederieae, Spermaceae y Theligoneae. La monofilia de este clado está robustamente soportada en el árbol ( $pp = 1$ ), aunque el bajo soporte que vincula a la secuencia problema con el clado hermano de Spermaceae ( $pp = 0,63$ ) no nos permite descartar la posible pertenencia de la secuencia problema a la mencionada tribu.

La alianza Psychotrieae la conforman cinco tribus de las cuales dos, Morindeae y Psychotrieae obtienen un elevado soporte ( $pp = 1$ ) mientras que las otras tres, Craterispermeae Verdc., Gaertnereae Bremekamp ex S.Darwin y Schradereae Bremekamp no están representadas en el análisis. Cualquier inferencia trófica sobre estas tres últimas tribus puede ser descartada ya que ninguna de sus especies habita en el continente australiano (APCD; Malcomber, 2002; Sánchez-González, 2003). La representación genérica y específica en relación a la alianza Psychotrieae es bastante baja en el análisis, sobre todo teniendo en cuenta que éste es uno de los linajes que contienen a la mayoría de las especies de la subfamilia Rubioideae, lo que puede haber influido en el resultado obtenido.

La tribu Coussareeae está presente en el análisis con dos especies claramente relacionadas *Faramea multiflora* A.Rich ex DC. y *Hindsia longiflora* (Cham.) Benth. ( $pp = 1$ ). El bajo soporte recuperado entre los miembros de dicha tribu y el clado de la alianza Psychotrieae ( $pp = 0,46$ ) es consistente con resultados de estudios moleculares previos elaborados a partir de los marcadores *atpB-rbcL*, *rbcL* y *rps16* (ver Bremer y Manen, 2000), por lo que no podemos considerar ambas entidades como grupos totalmente independientes. Por otro lado, la secuencia problema muestra a su vez una relación pobremente soportada con el clado conformado por la tribu Coussareeae y alianza Psychotrieae ( $pp = 0,63$ ). Estos valores de soporte en una zona tan crítica del árbol para nuestra inferencia nos obligan a considerar la posibilidad de que la secuencia problema pueda provenir de algún integrante tanto de las alianzas Psychotrieae y Spermaceae como de la tribu Coussareeae, pero como esta última

no está presente en Australia, la inferencia queda restringida a las alianzas Psychotriaceae y Spermatoceae.

El espécimen estudiado fue capturado en Mount Canobolas State Recreation Area (New South Wales, Australia) (Figura 4.3-14-c) mediante el empleo de la técnica *grasstuffing* en una comunidad vegetal de pastizal de claros de bosque. En la localidad de colecta se han citado las siguientes especies de Rubiaceae, todas ellas pertenecientes a la subfamilia Rubioideae y más concretamente a la alianza Spermatoceae: *Asperula conferta* Hook.f. (tribu Anthospermeae), *Coprosma quadrifida* (Labill.) B.L.Rob. (tribu Anthospermeae), *Galium aparine* L. (tribu Rubieae), *G. gaudichaudii* DC. (tribu Rubieae), *G. migrans* Ehrend. et McGill. (tribu Rubieae), *Nertera granadensis* Druce (tribu Anthospermeae) y *Pomax umbellata* (Gaertn.) Sol. ex A.Rich. (tribu Anthospermeae) (Hunter, 2002). Estas siete especies constituyen por tanto el conjunto de plantas con mayor probabilidad de albergar al hospedador del ejemplar de *P. punctifrons* estudiado. Es interesante señalar que *Palaeomela punctifrons* ha sido criada con *Asperula* L. en el laboratorio (C.A.M. Reid, comunicación personal) lo que señala a *A. conferta*, citada en la localidad de colecta, como el hospedador más probable.

#### **SAPINDACEAE Jussieu, nom. cons.**

En relación a la fauna mundial de Chrysomelidae, se tienen datos de trofismo sobre Sapindaceae para las subfamilias Alticinae, Cassidinae, Chlamisinae, Chrysomelinae, Eumolpinae, Galerucinae e Hispinae (Jolivet y Hawkeswood, 1995), lo que indica que las sapindáceas constituyen una importante fuente de recursos para esta familia de coleópteros. En nuestro trabajo, inferimos un trofismo sobre la familia Sapindaceae en cinco de los géneros de Chrysomelinae estudiados: *Callidemum*; *Oomela* Lea, 1916; *Paropsides* Motschulsky, 1860; *Philhydronopa* Weise, 1901 y *Platymela*. Todos ellos han sido citados con anterioridad sobre sapindáceas (Reid, 2006).



**Callidemum Blanchard, 1853*****Callidemum hypochalceum* (Germar, 1848) (árbol 98)**

La alimentación de *C. hypochalceum* ha sido descrita con anterioridad sobre *Dodonaea* en las regiones semi-áridas del sur de Australia (Reid, 2006). El material estudiado fue colectado sobre *Dodonaea* Mill. en Hattah-Kulkyne National Park (Victoria, Australia) (Figura 4.3-15), donde para este género únicamente se ha citado a la especie *D. viscosa* subsp. *angustissima* (DC.) J.G.West (FNSW; Murdoch, 2005). El resultado obtenido, basado en un fragmento incompleto del marcador *trnL* (313 pb), sitúa la secuencia problema junto a la familia Sapindaceae ( $pp = 0,71$ ) con una relación altamente soportada con la especie *Dodonaea viscosa* Jacq. ( $pp = 0,97$ ). La utilización de una secuencia más corta de lo habitual para este marcador podría explicar la falta de señal filogenética para obtener un soporte elevado del nodo que define a la familia Sapindaceae donde el valor de probabilidad posterior es bajo (ver sin embargo los resultados para *Oomela*). No obstante, el elevado soporte que refuerza la relación con la especie *D. viscosa* (junto con el conocimiento aportado por los datos de campo) despeja cualquier duda en relación a la pertenencia de la secuencia a la familia Sapindaceae, pues está claro que *Dodonaea* es una sapindácea (ver Harrington *et al.*, 2005).



**Figura 4.3-15.** *Dodonaea* sp. en Darkes Forest (NSW, Australia) (Fotografía: J. A. Jurado-Rivera)

**Oomela Lea, 1916**

Hemos estudiado tres especies de *Oomela*, hallando en todas ellas una relación trófica con la familia Sapindaceae. Este resultado es congruente con la información previa de Reid (2006), quien cita al género de sapindáceas *Alectryon* Gaertn. como planta hospedadora de este género de Chrysomelinae endémico del este de Australia. El mismo género de crisomélido ha sido citado por el mismo autor sobre *Toona* (Endl.) M.Roem. (Meliaceae Jussieu nom. cons.) y *Acronychia* J.R.Forst. et G.Forst. nom. cons. (Rutaceae).

***Oomela distincta* Lea, 1917** (árbol 99), ***O. elliptica* Lea, 1916** (árbol 100) y ***O. variabilis* Lea, 1916** (árbol 101)

Estas tres especies producen inferencias en el mismo clado formado por las especies de Sapindaceae *Aesculus x carnea* Hayne, *Allophylus longipes* Radlk. y *Serjania triquetra* Radlk. ( $pp = 0,75-0,99$ ). En el caso de *O. elliptica* la asociación es más inclusiva por aparecer relacionada con un soporte relativamente elevado ( $pp = 0,75$ ) tan sólo con las dos últimas (árbol 100). Este grupo de especies, junto a *Koelreuteria bipinnata* Franch., conforma uno de los dos clados en los que aparece segregada la familia Sapindaceae en los árboles obtenidos, aunque la validez de tal topología es muy cuestionable puesto que no está soportada por valores significativos de probabilidad posterior. Además parece claro que la familia Sapindaceae es un linaje monofilético (Harrington *et al.*, 2005).

Las especies del clado inferido se incluyen en la subfamilia Sapindoideae (*sensu* Harrington *et al.*, 2005) a excepción de *Aesculus x carnea*, cuya posición sistemática ha sido definida por los mismos autores junto a los géneros *Billia* Peyr. y *Handeliodendron* Rehder conformando la tribu Hippocastaneae dentro de la subfamilia Hippocastanoideae. *Aesculus x carnea* es un híbrido cultivado en Europa desde principios del siglo XIX resultante del cruzamiento entre la especie americana *A. pavia* L. y la europea *A. hippocastanum* L. (Hsiao y Li, 1973). En el análisis se han incluido otras dos especies de *Aesculus* L. cuyas respectivas posiciones en el árbol son coherentes con las propuestas por Harrington *et al.* (2005), lo que pone de manifiesto una incongruencia en la ubicación de *Aesculus x carnea* en el árbol inferido que podría deberse a una identificación incorrecta de la especie. Además, dicha secuencia es el único representante de *Aesculus* que junto a otras especies de sapindáceas emplearon Pfosser *et al.* (2002) como grupo externo en un análisis filogenético

centrado en especies del género *Acer* L. Estos mismos autores remarcan la elevada divergencia existente entre las secuencias de los grupos interno y externo, lo cual no deja de ser un hecho llamativo pues se ha demostrado que los géneros *Aesculus* y *Acer* son entidades taxonómicas filogenéticamente muy próximas (Harrington *et al.*, 2005), cabiendo esperar niveles de divergencia mucho menores. Obviando la secuencia de *Aesculus x carnea*, la inferencia trófica recuperada para las tres especies de *Oomela* quedaría restringida a los miembros de la subfamilia Sapindoideae.

Los ejemplares estudiados de *O. distincta* (árbol 99) y *O. elliptica* (árbol 100) proceden ambos de Red Cedar Flora Reserve (New South Wales, Australia), una región donde se dispone de registros florísticos para las especies de Sapindaceae *Alectryon subcinereus* (A.Gray) Radlk., *Cardiospermum grandiflorum* Sweet, *Castanospora alphandii* (F.Muell.) F.Muell., *Cupaniopsis baileyana* Radlk., *Diplogottis cunninghamii* (Hook.) Hook.f. ex Benth., *Dodonaea megazyga* (F.Muell.) F.Muell. ex Benth., *D. triquetra* J.C.Wendl., *D. viscosa*, *Elattostachys nervosa* (F.Muell.) Radlk., *Guioa semiglauca* (F.Muell.) Radlk., *Jagera pseudorhus* (A.Rich.) Radlk., *Mischocarpus pyriformis* (F.Muell.) Radlk., *Sarcopterix stipata* (F.Muell.) Radlk. y *Toechima dasyrrhache* Radlk. (FNSW). Estas sapindáceas, a excepción de las especies de *Dodonaea*, se incluyen en las tribus Cupanieae, Nephelieae y Paullinieae, todas ellas relativas a la subfamilia Sapindoideae (sensu Harrington *et al.*, 2005) y por tanto posibles candidatos a ser la planta nutricia de ambas especies de *Oomela*. Cómo *Oomela* ya ha sido citada sobre el género *Alectryon* (Reid, 2006), lo que es consistente con nuestra inferencia, la especie *A. subcinereus* se posiciona en un lugar prominente de la lista de posibles especies hospedadoras de estos dos ejemplares. El trofismo sobre el género *Dodonaea* puede ser descartado ya que la especie *D. viscosa* ha sido incluida en el análisis sin que se haya detectado ninguna relación soportada entre ésta y las secuencias problema. De las tres tribus citadas en el área de colecta, tan sólo Paullinieae está presente en el análisis, de manera que no podemos extraer una determinación precisa del clado de sapindáceas sobre el que se alimentan estas especies de crisomelinos hasta que no se incremente en la base de datos la representación de secuencias del intrón *trnL* para estas tribus de Sapindoideae. En todo caso, la relación trófica con algún miembro de la familia Sapindoideae queda garantizada.

El espécimen estudiado de *O. variabilis* por su parte (árbol 101) procede de Dorrigo National Park (New South Wales, Australia) donde únicamente se conocen las Sapindaceae *Cupaniopsis baileyana*, *Diplogottis cunninghamii*, *Guioa semiglauca*,

*Sarcopterix stipata* y *Toechima dasyrrhache* (FNSW). Estas especies se clasifican en la tribu Cupanieae (no representada en el análisis), subfamilia Sapindoideae (*sensu* Harrington *et al.*, 2005), y son por tanto posibles candidatos a ser la planta nutricia del ejemplar de *O. variabilis* analizado.

### ***Paropsides* Motzuschulsky, 1860**

Se ha estudiado una sola especie sin identificar de *Paropsides* en la que se ha detectado una relación trófica con la familia Sapindaceae. Las plantas hospedadoras de este género en Australia incluyen miembros de las familias Fabaceae, Myrtaceae, Rosaceae Jussieu nom. cons. y Sapindaceae (Reid, 2006).

### ***Paropsides* sp. (JAJ92) (árbol 102)**

El resultado obtenido establece una relación con el clado de la familia Sapindaceae formado por las especies *Aesculus x carnea*, *Allophylus longipes* y *Serjania triquetra* ( $pp = 0,96$ ). La topología obtenida es muy similar a la discutida para las tres especies de *Oomela* estudiadas (*vide supra*), y al igual que sucede en tales casos podemos limitar la inferencia a los miembros de la subfamilia Sapindoideae.

El material de estudio procede de Woko National Park (New South Wales, Australia) donde no se dispone de registros florísticos en relación a la familia Sapindaceae, aunque atendiendo a la distribución geográfica de esta familia en New South Wales es posible que puedan habitar el lugar de colecta (FNSW).

*Paropsides* ha sido citado sobre los géneros de la subfamilia Sapindoideae *Alectryon* y *Guioa* Cav. (Reid, 2006), pertenecientes a las tribus Nephelieae y Cupanieae respectivamente (*sensu* Harrington *et al.*, 2005), lo que refuerza la idea de que la secuencia problema pueda pertenecer a este grupo de sapindáceas.

### ***Philhydronopa* Weise, 1901**

#### ***Philhydronopa aeneipennis* (Chapuis, 1877) (árbol 103)**

Esta especie, la única que conforma el género *Philhydronopa*, ha sido citada con anterioridad sobre *Atalaya* Blume y *Heterodendrum* Desf. (Sapindaceae) (Reid, 2006), siendo la especie *Heterodendrum oleifolium* Desf. aquella sobre la que se recolectó el insecto investigado para este trabajo. La inferencia basada en *trnL* para este ejemplar lo relaciona con el clado integrado por las especies de Sapindaceae *Aesculus x carnea*, *Allophylus longipes*, *Koelreuteria bipinnata* y *Serjania triquetra* (*pp* = 0,90), donde se recupera una relación soportada con las secuencias de *Allophylus longipes* y *Serjania triquetra* (*pp* = 0,73). Esta inferencia limitada a la subfamilia Sapindoideae es idéntica a la de cualquiera de los géneros de Chrysomelinae discutidos hasta el momento en relación con esta familia botánica.

En la localidad de captura de este ejemplar, en las inmediaciones de Wemen (Victoria, Australia), se han citado las sapindáceas *Dodonea viscosa* y *Heterodendrum oleifolium* (= *Alectryon oleifolius* (Desf.) S.T.Reynolds) (APCD; FNSW), que pertenecen a las subfamilias Dodoneoideae y Sapindoideae, respectivamente.

En la matriz de datos se ha incluido una secuencia de la especie *D. viscosa* sin que se haya recuperado una relación soportada con la secuencia problema, por lo que podemos descartar el trofismo sobre esta especie de sapindácea. Por otro lado, la secuencia problema exhibe una disposición en el árbol inferido compatible con un trofismo sobre *Heterodendrum* (tribu Nephelieae), ya que aparece ubicada en la rama de la subfamilia Sapindoideae ocupando una posición basal al clado formado por las especies de *Serjania* Mill. (tribu Thouinieae) y *Allophylus* L. (tribu Paullinieae) (ver Harrington *et al.*, 2005). Conviene destacar que no todas las tribus de la subfamilia Sapindoideae cuentan con especies en la matriz analizada, de modo que la posible pertenencia de la secuencia problema al género *Heterodendrum* es tan sólo una hipótesis que podrá ser evaluada de manera más apropiada a medida que se mejore la representación taxonómica en relación a la citada subfamilia en la base de datos.

***Platymela* Baly, 1856**

Este género ya ha sido citado previamente sobre sapindáceas (Hawkeswood, 1988; Matthews y Reid, 2002; Reid, 2006) y en nuestro trabajo recogemos esta asociación para una de las dos especies de *Platymela* estudiadas (la otra se asoció con Fabaceae: página 341, árbol 43).

***Platymela* sp. (JAJ89) (árbol 104)**

La inferencia obtenida está basada en la secuencia del *loop* P6 del intrón *trnL* cuya corta longitud (50 pb) probablemente condiciona la resolución del árbol obtenido. La secuencia problema aparece junto a la sapindácea *Aesculus x carnea* ( $pp = 0,97$ ).

En secciones anteriores hemos cuestionado la vinculación de la secuencia de *Aesculus x carnea* al género *Aesculus*, aunque su inclusión en la familia Sapindaceae está clara si atendemos a la relación que se recupera entre ésta y las demás secuencias de sapindáceas que aparecen en los citados análisis. Esto nos permite concluir que el resultado obtenido demuestra una relación trófica entre esta especie de *Platymela* y algún miembro de la familia Sapindaceae.

**SOLANACEAE Jussieu, nom. cons.**

A nivel mundial, la familia Solanaceae constituye una importante fuente de alimento para muchas especies de Chrysomelidae pertenecientes a las subfamilias Alticinae, Cassidinae, Chrysomelinae, Clytrinae Kirby, 1837, Criocerinae Latreille, 1807, Cryptocephalinae, Eumolpinae y Galerucinae. En cuanto a la fauna mundial de Chrysomelinae, el trofismo sobre esta familia de plantas es común en los géneros neotropicales *Eugonycha* Chevrolat, 1843, *Leptinotarsa* Stål, 1858, *Platyphora* Gistel, 1857, *Proseicela* Chevrolat, 1837 y *Zygogramma* Chevrolat, 1837 (Jolivet y Hawkeswood, 1995). Entre los géneros de crisomelinos australianos, tan sólo *Phyllocharis* había sido citado previamente sobre solanáceas (Reid, 2006). En nuestro trabajo hemos detectado un solo caso de trofismo sobre Solanaceae, concretamente con la especie *Canobolas nobilis* para el cual hemos hallado también relación con las familias Caryophyllaceae (página 320, árbol 20) y Myrtaceae (página 371, árboles 85 y 86).

***Canobolas nobilis* (Lea, 1917) (árbol 105)**

Se ha estudiado la única especie colectada en relación a este nuevo género recientemente descrito de Chrysomelinae procedente del material colectado en la expedición a Australia de 2005. La secuencia analizada pertenece al *loop* P6 del intrón *trnL* cuya escasa longitud (84 pb) desafortunadamente limita la resolución de la filogenia y la inferencia, aunque permite establecer una relación trófica con la familia Solanaceae, subfamilia Solanoideae ( $pp = 1$ ). El establecimiento de una inferencia a los niveles genérico o específico no es posible.

El espécimen analizado procede de Mount Canobolas State Recreation Area (New South Wales, Australia), donde la única solanácea citada es la introducida *Datura stramonium* L. (Hunter, 2002). *Datura* L. también pertenece a la subfamilia Solanoideae, dentro de la cual ocupa una posición filogenética próxima a varios de los géneros recuperados en el alineamiento BLAST: *Atropa* L., *Lycium* L., *Nolana* L.f., *Physalis* L. y *Solanum* (Martins y Barkman, 2005). La relación existente entre la secuencia problema y *D. stramonium* no ha podido ser evaluada ya que no se disponía de secuencias para esta especie en el momento de extraer la información de la base de datos, por lo que no podemos descartar la existencia de una relación trófica con esta planta. En las inmediaciones del área de colecta se han citado especies de los géneros de Solanoideae *Physalis*, *Salpichroa* Miers y *Solanum*, entre las que también cabe la posibilidad de que figure la especie de la cual procede la secuencia problema.

**4.3.4.3.- Resumen de las inferencias**

La información relativa a los resultados obtenidos se encuentra resumida en las Tablas 4.3-3, 4.3-4 y 4.3-5.

El análisis realizado en las diez especies de Chrysomelinae de trofismo conocido generó el resultado correcto en todos los casos (verTabla 4.3-3). En total se han estudiado 25 géneros de Chrysomelinae australianos para los que se ha detectado una asociación con 15 familias de angiospermas diferentes. En siete de estos géneros se ha inferido un trofismo sobre más de una familia botánica, destacando la alimentación sobre cuatro familias por parte de las especies de uno de ellos (*Peltoschema*) (verTabla 4.3-4). En total se han elaborado 103 inferencias, por lo general resueltas con elevado soporte a nivel de familia, de las que el 36%

representan nuevas citas tróficas a nivel genérico (sin incluir los resultados obtenidos para el género y especie no descrito), bien aportando nuevos datos para casos de trofismo desconocido (*Geomela* en Plantaginaceae y *Palaeomela* en Proteaceae y Rubiaceae) o bien expandiendo el rango de plantas utilizadas dentro de la familia hospedadora (*Chalcolampra*, *Ethomela*, *Eulina*, *Peltoschema*, *Phyllocharis*, *Platymela* y *Rhaebosterna*). En los casos donde el trofismo era conocido al menos una inferencia fue siempre correcta.

A nivel infrafamiliar las inferencias están influidas por el sesgo taxonómico existente en la base de datos, aunque en muchos casos este tipo de inferencias se recuperaron con bastante precisión en función del grupo botánico en cuestión, llegando a establecer relaciones soportadas a nivel de tribu, grupos de géneros relacionados, géneros e incluso especies. Centrándonos en los análisis realizados exclusivamente con el intrón *trnL* (cebadores c y d), las inferencias a nivel de tribu y género fueron recuperadas con éxito en el 87% y 51% de los casos respectivamente (Tabla 4.3-4). Estos porcentajes son conservativos puesto que no incluyen los resultados donde se recuperó una asociación con una sola especie representante de un género o un solo género representante de una tribu. Por su parte, la corta secuencia del *loop* P6 (cebadores g y h) condiciona claramente la resolución taxonómica obtenida en los árboles obtenidos a partir de este marcador, si bien se pudo recuperar una inferencia a nivel de familia altamente soportada en todos los casos estudiados (Tabla 4.3-5), mientras que la resolución a nivel de género fue mucho menor (10%).

Varios individuos requirieron un proceso de clonación y secuenciado de clones (13,75%) para separar dos o más secuencias divergentes en algunos casos (36%). Cuatro de las muestras que fueron clonadas produjeron un único tipo de secuencia *trnL*, lo cual probablemente fue debido a una baja tasa de éxito en la fase de ligación del inserto al vector de clonación. En los individuos donde se recuperó más de un tipo de secuencia, éstas pertenecieron a diferentes familias botánicas en todos los casos menos en uno.

La elección de más de una especie vegetal como alimento ha sido demostrada al analizar más de una especie del mismo género de Chrysomelinae procedentes de áreas geográficas distintas. En total, siete géneros de Chrysomelinae australianos mostraron trofismo múltiple (uno de ellos, *Callidemum*, ya registrado en la literatura; Reid, 2006), destacando la alimentación sobre tres familias botánicas inferida en el



caso del género y especie no descritos y las cuatro familias hospedadoras puestas de manifiesto para el género *Peltoschema*.

**Tabla 4.3-3.** Especies de Chrysomelinae de trofismo conocido, generalmente registrado en sus respectivas descripciones original y confirmadas posteriormente por numerosas observaciones de campo.

<b>Especie</b>	<b>Lugar y Especie Vegetal de colecta</b>	<b>Planta Hospedadora (bibliografía)</b>	<b>Inferencia Filogenética</b>
<i>Araucanomela wellingtonensis</i>	Llanquihue, Chile / <i>Nothofagus betuloides</i>	Nothofagaceae ( <i>Nothofagus betuloides</i> )	Nothofagaceae (1.00), <i>Nothofagus gr. nitida</i> (0.98)
<i>Chrysolina americana</i>	Granada, Spain / <i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae ( <i>Rosmarinus spp.</i> , <i>Lavandula spp.</i> )	Lamiaceae-Mentheae (1.00), <i>Rosmarinus officinalis</i> (0.99)
<i>Chrysolina quadrigemina</i>	Bragança, Portugal	Clusiaceae ( <i>Hypericum spp.</i> )	Clusiaceae (1.00), <i>Hypericum sp.</i> (1.00)
<i>Chrysolina vitikana</i>	Granada, Spain / <i>Mentha sp.</i>	Lamiaceae ( <i>Mentha spp.</i> , <i>Salvia spp.</i> )	Lamiaceae-Mentheae (1.00), <i>Mentha gr. spicata-suaevolens-longifolia</i> (0.74)
<i>Chrysomela collaris</i>	Altai, Siberia	Salicaceae ( <i>Salix spp.</i> , <i>Populus spp.</i> )	Salicaceae (1.00), <i>Salix</i> (11 spp.) (0.79)
<i>Goniöctena olivace*</i>	Albacete, Spain / <i>Cytisus scoparius</i>	Fabaceae ( <i>Cytisus scoparius</i> )	Fabaceae, Caprifoliaceae y Loasaceae nom. cons. (sp = 1)
<i>Goniöctena variabilis</i>	Albacete, Spain / <i>Genista scorpius</i>	Fabaceae ( <i>Genista spp.</i> , <i>Retama spp.</i> , <i>Sarothamnus spp.</i> )	Fabaceae-Genisteae (1.00), <i>Genista scorpius</i> (0.99)
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Granada, Spain / <i>Solanum tuberosum</i>	Solanaceae ( <i>Solanum spp.</i> , <i>Lycopersicon spp.</i> )	Solanaceae (1.00), <i>Solanum-Lycopersicon</i> (1.00)
<i>Phytotara vitellinae</i>	Lleida, Spain / <i>Salix bicolor</i>	Salicaceae ( <i>Salix spp.</i> , <i>Populus spp.</i> )	Salicaceae (1.00), <i>Salix gr. alba-pentandra</i> (0.99)
<i>Plagiocdera versicolora</i>	Ourense, Spain / <i>Salix sp.</i>	Salicaceae ( <i>Salix spp.</i> , <i>Populus spp.</i> )	Salicaceae (1.00), <i>Salix gr. alba-pentandra</i> (0.99)

\* = inferencia obtenida a partir de la secuencia del loop P6 contenido en el interior del intrón *trnL*.

**Tabla 4.3-4.** Resumen de las inferencias tróficas obtenidas para 77 especies (79 individuos) de Chrysomelinae australianas basadas exclusivamente en secuencias del intrón *trnL* (cebadores c y d). Se muestran los valores de soporte obtenidos tanto para las diferentes familias botánicas como para los clados soportados mas inclusivos ( $pp > 0.70$ ) que contienen a la secuencia problema. Los árboles utilizados para las inferencias se pueden consultar en el Apéndice B.

Genero	N	Familia Botánica	Soporte (pp)	Grupo de Plantas más Inclusivo	Soporte (pp)	Arbol No.
<i>Callidemum</i>	2	Sapindaceae	0.71	hermano de <i>Dodonaea viscosa</i>	0.97	98
		Fabaceae	1.00	Acacia	0.83	21
<i>Calomela</i>	9	Fabaceae	0.86 - 1.00	Acacia	0.73 - 0.97	22-26
<i>Chalcolampa</i>	1	Pittosporaceae*	1.00	<i>Billardiera</i> , <i>Marianthus</i> y <i>Cheiranthera</i>	0.93	91
<i>Dicranosterna</i>	1	Fabaceae	1.00	Acacia	0.95	32
<i>Ethomela</i>	2 <sup>a</sup>	Asteraceae <sup>tb</sup>	0.85 - 1.00	Asteraceae <sup>b</sup>	-	15
				<i>Craspedia</i>	1.00	16
		Fabaceae*	1.00	Acacia	0.88	33
<i>Eulina</i>	1	Oleaceae	0.80	<i>Ligustrum</i> *	0.97	90
<i>Ewanus</i>	1	Nothofagaceae	1.00	<i>Nothofagus</i> subgénero <i>Lophozonia</i>	1.00	88
<i>Faax</i>	1	Myrtaceae	1.00	tribu Leptospermeae hermano de <i>Leptospermum scoparium</i>	0.90	45
<i>Geomela</i>	1	Plantaginaceae*	1.00	<i>Plantago</i> subgénero <i>Plantago</i> sección <i>Mesembrynia</i>	0.98	95
<i>Johannica</i>	1	Bignoniaceae <sup>b</sup>	-	hermano de <i>Pandorea</i>	0.89	19
<i>Lamprolina</i>	3	Pittosporaceae	1.00	<i>Bursaria</i> hermano de <i>B. spinosa</i>	0.71	92
				<i>Pittosporum</i>	0.95	93
				Pittosporaceae	-	94
<i>Novacaestria</i>	1	Nothofagaceae	1.00	<i>Nothofagus</i> subgénero <i>Lophozonia</i> hermano de <i>N. moorei</i>	0.98	89
<i>Ormela</i>	3	Sapindaceae <sup>b</sup>	-	<i>Allophylus</i> , <i>Serjania</i> y <i>?Aesculus</i>	0.75 - 0.96	99-101
<i>Palaeomela</i>	2	Proteaceae*	1.00	hermano de <i>Orites lancifolia</i>	1.00	96
		Rubiaceae*	1.00	Rubiaceae	1.00	97
<i>Paropsisides</i>	1	Sapindaceae <sup>b</sup>	-	<i>Allophylus</i> , <i>Serjania</i> y <i>?Aesculus</i>	0.96	102
<i>Paropsis</i>	4	Myrtaceae	1.00	<i>Angophora</i> y <i>Corymbia</i>	1.00	47
				<i>Eucalyptus</i>	1.00	46
				hermano de <i>Leptospermum scoparium</i>	1.00	48-49
<i>Paropsisterna</i>	19	Myrtaceae	1.00	<i>Angophora</i> y <i>Corymbia</i>	1.00	61
				hermano de <i>Angophora</i> y <i>Corymbia</i>	1.00	62
				basal y próximo a la tribu Leptospermeae	1.00	63, 67-69
				basal y divergente a la tribu Leptospermeae	0.93 - 1.00	65-66
				<i>Eucalyptus</i>	0.88 - 1.00	50-51, 53-55, 57-60
		Myrtaceae-Lythraceae <sup>c</sup>	0.94	Myrtaceae-Lythraceae	0.94	70
				<i>Kunzea</i>	1.00	64

**Tabla 4.3-4.** Continuación.

<i>Peltoschema</i>	11 <sup>a</sup>	Apocynaceae*	1.00	<i>Artia, Parsonsia y Prestonia</i>	0.84	12
		Asteraceae <sup>tb</sup>	0.95	Asteraceae	-	17
		Fabaceae	0.93 - 1.00	Acacia	0.76 - 1.00	34, 36, 38-42
		Myrtaceae	1.00	<i>Daviesia*</i>	1.00	37
<i>Phillydronopa</i>	1	Sapindaceae <sup>b</sup>	-	basal y divergente a la tribu Leptospermeae*	0.93	72
<i>Phyllochairs</i>	3	Apocynaceae*	1.00	tribu Leptospermeae hermano de <i>Leptospermum scoparium</i>	0.89	71
		Lamiaceae <sup>tb</sup>	-	<i>Allophylus</i> y <i>Serjania</i>	0.73	103
		Fabaceae*	0.94	<i>Artia, Parsonsia y Prestonia</i>	0.93	14
		Myrtaceae	0.97	hermano de <i>Parsonsia eucalyptophylla</i>	0.70	13
<i>Platymela</i>	1	Asteraceae <sup>tb</sup>	-	Subfamilia Teucrioideae hermano de género <i>Ajuga</i>	1.00	44
<i>Poropteromela</i>	1	Myrtaceae	0.97	<i>Acacia</i>	0.79	43
<i>Rhaebosterna</i>	1 <sup>a</sup>	Myrtaceae	1.00	Myrtaceae	-	73
		Myrtaceae	1.00	Asteraceae	-	18
<i>Trachymela</i>	8	Myrtaceae	1.00	basal y divergente a la tribu Leptospermeae	1.00	74
				<i>Eucalyptus</i>	1.00	76-81, 83-84

<sup>a</sup> Especímenes de los cuales se han obtenido dos secuencias (tras clonar); <sup>b</sup> Parafilético; \* secuencia corta (129 pb) \* nueva asociación trófica; pp: probabilidad posterior bayesiana.

**Tabla 4.3-5.** Resumen de las inferencias tróficas obtenidas para 7 especies de Chrysomelinae australianas basadas exclusivamente en secuencias *loop* P6 contenido en el intrón *trnL* (cebadores g y h). Se muestran los valores de soporte obtenidos tanto para las diferentes familias botánicas como para los clados soportados mas inclusivos ( $pp > 0.70$ ) que contienen a la secuencia problema. Los árboles utilizados para las inferencias se pueden consultar en el Apéndice B.

Genero	N	Familia Botánica	Soporte (pp)	Grupo de Plantas más Inclusivo	Soporte (pp)	Arbol No.
<i>Calomela</i>	1	Fabaceae	0.99	Fabaceae	0.99	31
Gen. y sp. no descritos	4 <sup>a</sup>	Caryophyllaceae	1.00	Género <i>Stellaria</i>	0.78	20
		Myrtaceae	0.99-1.00	Basal y próximo a la tribu <i>Leptospermeae</i>	0.89	85
		Solanaceae	1.00	Myrtaceae	0.99	86
<i>Paropsisterna</i>	1	Myrtaceae-	0.99	Subfamilia Solanoideae	1.00	105
		Combretaceae		Myrtaceae-Combretaceae	0.99	52
<i>Peltoschema</i>	1	Fabaceae	1.00	Fabaceae	1.00	35
<i>Platymela</i>	1	Fabaceae-	1.00	<i>Aesculus x carnea</i>	1.00	104
		Rosaceae-				
		Sapindaceae				
<i>Rhaebosterna</i>	1	Myrtaceae	0.98	Myrtaceae	0.98	75
<i>Trachymela</i>	1	Myrtaceae	0.99	Myrtaceae	0.99	82

\*Especimen para el que se han obtenido cuatro secuencias diferentes tras clonar; *pp*: probabilidad posterior bayesiana.

#### 4.3-5.- Discusión General

##### 4.3.5.1. Aportaciones del método aquí desarrollado

El marcador molecular seleccionado para este trabajo proporciona un elevado éxito en cuanto a su amplificación mediante PCR probablemente debido a la robustez que ofrecen unos cebadores universales altamente conservados en todo el Reino Vegetal como son los que amplifican el intrón *trnL*. El éxito en la amplificación podría atribuirse también a la aplicación de un programa de PCR tipo *touchdown* desarrollado específicamente para el presente trabajo, y que tras varias pruebas demostró una eficacia notablemente superior a la de un programa de PCR convencional. En esta misma línea, un aspecto importante que podría condicionar el éxito en la amplificación del marcador está relacionada con el grado de manipulación de las muestras previo a la fase de PCR, que en nuestro caso se reduce al mínimo. En este respecto, otros autores realizan un lavado del insecto (e.g., Staudacher *et al.*, 2011; Wallinger *et al.*, 2013) para su posterior disección y aislamiento del sistema digestivo con el fin de evitar posibles contaminaciones relacionadas con restos vegetales externos que el animal pueda llevar adheridos (e.g., Matheson *et al.*, 2008). Este procedimiento parece en principio bien justificado, si bien los ensayos preeliminares ejecutados por nosotros en las especies de trofismo conocido y los resultados obtenidos en los Chrysomelinae australianos para los que también se conocen las plantas hospedadoras han demostrado que la extracción directa de ADN a partir del animal completo es perfectamente eficaz. Con toda seguridad minimizar la manipulación de las muestras evita los daños que los procesos de lavado e hidratación ejercen sobre el ADN vegetal, que ya de por sí está presente en reducidas cantidades y previamente ha sido sometido a un intenso proceso de degradación en el sistema digestivo del insecto. En todo caso, recomendamos una minuciosa inspección visual de las superficies del insecto antes de proceder a la extracción de ADN, prestando cuidadosa atención a las articulaciones y muy especialmente a aquellas estructuras típicamente expuestas al contacto con el sustrato como son los tarsos y las uñas tarsales. Una fuente ubicua de contaminación potencial es el polen de las angiospermas, pero éste no constituye en principio un riesgo elevado en cuanto a contaminación se refiere, ya que la inmensa mayoría de estas plantas transmiten sus cloroplastos a la descendencia por la línea materna (Tilney-Bassett, 1978; Sears, 1980), siendo poco frecuentes los casos donde se ha descrito una potencial herencia de tipo biparental (Zhang *et al.*, 2003). No sucede lo mismo en el caso de las gimnospermas, donde el grano de polen sí que

alberga cloroplastos. En nuestro estudio únicamente hemos detectado un caso de contaminación con gimnosperma en la especie *Chrysolina viridana*, una especie de crisomelino que no se alimenta de este grupo de plantas (o al menos este trofismo nunca ha sido reportado) y para la cual se recuperó una secuencia perteneciente al género *Cupressus* L., abundante en el área de colecta del insecto. Esta limitación del método ha de ser tomada en cuenta de cara a su aplicabilidad en estudios de insectos que se alimentan de gimnospermas.

Además, el marcador molecular escogido permite la obtención de secuencias relativamente largas (500 pb), lo que posiblemente repercuta de manera positiva en la cantidad de información filogenética disponible para los análisis y por tanto en el nivel de resolución de los árboles obtenidos. Por otro lado, las secuencias del intrón *trnL* se caracterizan por poseer una alternancia de regiones conservadas que por una parte facilitan el alineamiento de las secuencias y regiones variables, estas últimas con una elevada dinámica de sustituciones y de eventos de inserción-delección.

Otra ventaja adicional del método presentado en este trabajo consiste en el uso que hacemos de las bases públicas de secuencias de ADN y en el carácter filogenético del método de inferencia empleado, en contraposición al procedimiento estrictamente fenético con el que comúnmente se analizan los datos (e.g.; Matheson *et al.*, 2008; García-Robledo *et al.*, 2013). La fenética es una aproximación cuantitativa a la sistemática basada en la comparación de organismos atendiendo exclusivamente a su semejanza. El principal parámetro analizado en los análisis fenéticos es la “medida de distancia”, que es un indicativo del grado de similitud existente entre los datos sometidos a estudio. Al contrario de lo que sucede en los métodos filogenéticos, los métodos fenéticos no distinguen entre caracteres homólogos y homoplásicos, por lo que los resultados obtenidos no necesariamente reflejan las relaciones evolutivas existentes entre los taxones sometidos a estudio, y ya se ha visto que la sistemática filogenética vegetal aporta información relevante para las inferencias tróficas. Una práctica común en este sentido consiste en ejecutar para cada muestra una búsqueda BLAST en las bases de datos y organizar los resultados obtenidos atendiendo a un criterio puramente fenético como es el parámetro *Maximum Identity* (i.e. el tanto por ciento de similaridad entre la secuencia problema y cada una de las secuencias recuperadas en la búsqueda), generando un árbol de distancias con un método también fenético como es el método de Neighbour Joining. En el contexto actual donde las bases de datos son aún incompletas esta aproximación no es apropiada, ya que existe una elevada probabilidad tanto de que la especie vegetal de la cual

proviene la secuencia problema no se encuentre representada para el marcador sometido a estudio en las bases públicas de secuencias de ADN como de que dicha especie ni siquiera haya sido descrita aún. Sin embargo, en nuestra implementación filogenética, el método es entendido como una herramienta predictiva. Esto significa que se asumen las limitaciones en cuanto a representación taxonómica de las bases de datos y se explota la información disponible en aras de identificar el linaje evolutivo más inclusivo al cual pertenece la planta hospedadora del insecto estudiado, en lugar de perseguir la identificación de una especie concreta cuya presencia en la base de datos es incierta. Para ello reducimos al mínimo el número de decisiones basadas en criterios fenéticos, siendo la búsqueda BLAST el único paso del protocolo de análisis de secuencias donde se aplican. Aún así, intentamos diluir al máximo el efecto de esta decisión fenética inicial extrayendo las 100 primeras secuencias de la búsqueda para posteriormente situarlas en un contexto eminentemente filogenético como es el que subyace a la inferencia de tipo bayesiana. Es de esperar que en este grupo de 100 secuencias se incluyan algunas especies evolutivamente cercanas a la especie de la cual proviene la secuencia problema. El número 100 es un valor arbitrario establecido por nosotros como resultado del compromiso existente entre la reducción de decisiones basadas en criterios fenéticos y las limitaciones computacionales en términos de tiempo impuestas por las dimensiones de la matriz a analizar. Este valor puede ser modificado libremente por el investigador en función de la capacidad computacional disponible, siempre teniendo en cuenta que un análisis ideal incluiría todas las secuencias existentes en la base de datos para el marcador en cuestión, caso en el que la búsqueda BLAST pasaría a ser innecesaria. Un método de identificación de tipo fenético tan sólo debería ser utilizado a partir del momento en el que la totalidad de la biodiversidad vegetal haya sido descrita y secuenciada, y contando siempre con la disponibilidad de un marcador molecular ideal que permita una correspondencia unívoca entre la secuencia problema y una de las especies depositadas en la base de datos.

Finalmente, la implementación de nuestro método ha permitido la obtención de numerosas citas tróficas desconocidas hasta el momento para el conjunto de Chrysomelinae estudiado.

#### 4.3.5.2. Poder de predicción y precisión del método

Aunque el número de secuencias depositadas en las bases de datos públicas se encuentra en una fase crecimiento rápido y continuo (Benson *et al.*, 2007; Brooksbank *et al.*, 2014), aún falta mucho por hacer hasta que la enorme diversidad vegetal existente esté genéticamente representada de manera parcial (i.e. distintas regiones genómicas aisladas) o total (i.e. genomas completos). Además, dentro del conjunto de especies ya secuenciadas existe un sesgo taxonómico en favor de ciertos grupos botánicos con interés económico (e.g. Poaceae, Solanaceae). Como ya se ha comentado en el apartado anterior, estas limitaciones constituyen una importante fuente de error en cualquier estudio basado en métodos fenéticos de identificación, ya que desde el momento en que la especie de la cual proviene la secuencia problema no cuenta con una secuencia del marcador estudiado en las bases de datos no es posible establecer la identificación. En este sentido, una solución comúnmente adoptada consiste en la elaboración de una base de datos de secuencias a partir de la totalidad de plantas presentes en el área de estudio para así poder recuperar identificaciones tróficas precisas (e.g., Hereward y Walter, 2012; García-Robledo *et al.*, 2013). Sin embargo, esto no solamente es elevadamente costoso en términos de tiempo y recursos, sino que además requiere de un amplio y profundo conocimiento taxonómico vegetal. En un estudio como el nuestro centrado en la extensa región australiana, la elaboración de una base de datos de este tipo constituye por el momento un proyecto inabarcable. El método que aquí proponemos tiene en cuenta las mencionadas limitaciones actuales de las bases de datos, de modo que al emplear una aproximación filogenética de cara a la identificación del material vegetal contenido en el sistema digestivo de los insectos fitófagos, podemos conocer el linaje botánico sobre el que se alimenta un individuo concreto con una precisión que dependerá, en cada caso, tanto del nivel resolutivo inherente al marcador molecular utilizado como de la representación taxonómica de secuencias en las bases de datos. En cuanto al poder resolutivo del marcador empleado se refiere, existe heterogeneidad a lo largo de los diferentes grupos vegetales. Mientras que el intrón *trnL* es altamente discriminatorio en algunos casos (e.g. Nothofagaceae), existen otros grupos botánicos donde parece encontrar dificultades a la hora de recuperar la monofilia de linajes bien establecidos (e.g. Astereae, Bignonicaceae, Sapindaceae) o donde ni siquiera muestra una estructura para los miembros que los constituyen (e.g. Mimosoideae). Pero incluso en este tipo de situaciones problemáticas, y teniendo en cuenta la elevada probabilidad de que exista alguna especie evolutivamente próxima en la matriz, la secuencia problema será ubicada correctamente en su linaje independientemente de



que dicho clado reciba o no soporte. El hecho de que un taxón vegetal no represente un grupo natural tampoco supone ningún problema para nuestra metodología, ya que la secuencia problema se posicionará igualmente en la rama evolutiva adecuada. Por otro lado, el efecto derivado del sesgo en la representación taxonómica de las secuencias existentes en las bases de datos puede generar un continuo de situaciones comprendidas entre dos extremos: aquella en la cual una vez seleccionadas las secuencias tras la búsqueda BLAST se genera una matriz donde se incluye información relativa a grupos botánicos muy diversos cada uno de ellos pobremente representado en la base de datos, y aquella otra donde existe un elevado número de secuencias de una misma especie o grupo de especies. En el primero de los casos el problema puede ser resuelto únicamente con el progresivo crecimiento de la base de datos en cuanto a número de secuencias depositadas, mientras que en la segunda situación bastará con incrementar el número de secuencias extraídas a partir de la búsqueda BLAST para elaborar la matriz.

Existe otra posible fuente de error que es totalmente independiente de nuestro método y cuya última responsabilidad recae sobre los autores que producen y depositan las secuencias en las bases de datos. Durante la elaboración del presente trabajo hemos detectado secuencias anómalas que afectaron a nuestras inferencias, bien debido a una identificación taxonómica errónea (e.g., Sapindaceae identificada como *Cyripedium*, Cyripedioideae, o Apocynaceae determinada como *Sesamum*, Pedaliaceae; nombres intercambiados entre *Pittosporum* y *Cheiranthra*, ambas Pittosporaceae [G.T. Chandler, comunicación personal]; asignación genérica sospechosa para *Aesculus x carnea*) o porque eran claramente artefactos (e.g., *Acacia usumatensis*, *Tragopogon spp.*) y quimeras (e.g., *Pentaphylax euryoides*). Los problemas derivados de la inclusión de estas secuencias tan sólo eran puestos de manifiesto tras una cuidadosa inspección de las inferencias obtenidas que revelaban relaciones filogenéticas sospechosas, y que requerían una reevaluación tras eliminar los datos problemáticos de la matriz.

#### 4.3.5.3.- Comparación entre marcadores: intrón trnL completo y loop P6

Existen diferencias importantes entre los dos marcadores moleculares empleados tanto en términos de producción de datos como de resolución de las inferencias obtenidas a partir de estos. El éxito de amplificación y secuenciación del loop P6 es considerablemente menor que el alcanzado en el caso del intrón *trnL*

completo, lo cual probablemente se puede achacar a la corta longitud de su secuencia (50 pb como promedio frente a los 500 pb del intrón *trnL*) o a la menor “universalidad” de los cebadores. Esta misma causa afecta también al nivel taxonómico alcanzado en las inferencias generadas con el *loop* P6, que en todos los casos quedaron muy bien soportadas únicamente hasta el nivel de familia, constituyendo las especies para las que se obtuvieron secuencias para ambos marcadores a partir de un mismo individuo un claro ejemplo de ello (*Calomela ruficeps*, *Peltoschema cardinalis*, *Paropsisterna geniculata*, *Phratora vitellinae*, *Rhaebosterna sciola* y *Trachymela tincticollis*). Una de las inferencias recuperadas en el caso del género y especie no descritos (árbol 20) constituye una excepción a esta falta de resolución del *loop* P6, ya que el clado recuperado está relativamente bien definido y soportado llegándose a alcanzar el nivel de género en la inferencia.

A pesar de los inconvenientes que parece mostrar el empleo del *loop* P6 en este tipo de estudios, es importante señalar que este corto marcador puede llegar a ser ventajoso en determinadas situaciones, por ejemplo aquéllas donde el ADN de la muestra está muy fragmentado a causa de los procesos de degradación sufridos durante la digestión, que pueden llegar a ser extremos en ejemplares conservados en seco y/o durante largos periodos de tiempo. Además, la resolución a nivel de familia botánica que este marcador aporta es sin duda muy valiosa y significativa.

#### 4.3.5.4.- Evidencias utilizadas para la elaboración de las inferencias tróficas

Además de la información obtenida en los árboles filogenéticos se han empleado otros cuatro tipos de evidencia que en la mayoría de los casos han permitido restringir el círculo de potenciales plantas hospedadoras a un número reducido de candidatos (y para aumentar la confianza en la utilidad del método). Cuando estaban disponibles, estas evidencias se han interpretado siempre de manera complementaria al cuerpo principal de la inferencia, es decir, el árbol filogenético recuperado.

En primer lugar se han tenido en cuenta los registros florísticos de la zona estudiada para cada especie. El riesgo de emplear esta información es que no existe certeza absoluta de que las identificaciones sean correctas ni de que el catálogo para el área de interés sea completo. En principio, el primero de estos problemas no es significativo pues las fuentes consultadas suelen proceder de botánicos profesionales

expertos, mientras que el segundo si que podría afectar a la inferencia trófica propuesta en el caso de que la especie hospedadora no haya sido incluida en el catálogo florístico, aunque es de esperar que con el tiempo estos registros se vayan mejorando hasta alcanzar una representación total. Sin embargo las ventajas son notables, pues basta con consultar las especies pertenecientes al clado inferido que habitan la zona para extraer un listado de posibles plantas hospedadoras para contrastar con el resultado filogenético.

Otro tipo de evidencia empleada se basa en la información filogenética disponible acerca del grupo botánico en cuestión. Conocer las relaciones evolutivas de las especies que conforman el grupo taxonómico inferido es de gran utilidad a la hora de interpretar la posición de la secuencia problema en el árbol recuperado, especialmente en los casos donde la representación en la base de datos de especies y géneros próximos a dichas secuencia es reducida. Además es interesante conocer las relaciones y los valores de soporte que se obtienen con otros marcadores moleculares para el grupo botánico de interés, de modo que es posible confirmar o cuestionar los obtenidos en nuestro análisis.

Las citas tróficas previas publicadas en la bibliografía también son una importante fuente de información que en la mayoría de los casos estuvo en sintonía con los resultados obtenidos. Estos registros deben ser tomados con precaución porque a menudo se basan en observaciones de campo que no necesariamente han de reflejar una relación trófica real, ya que las plantas son mucho más que simplemente alimento para los insectos, de modo que a lo largo de sus ciclos vitales pueden utilizar determinadas especies botánicas para otros fines además de los estrictamente alimenticios.

Un último tipo de evidencia consiste en las observaciones de campo por parte del recolector de los insectos. Como se ha comentado en relación a las referencias bibliográficas previas, no siempre los insectos fitófagos se colectan sobre sus plantas hospedadoras, así que el dato de campo no es concluyente. Por otro lado, también existe la posibilidad de cometer un error en la identificación de la especie vegetal ya que por regla general el colector suele ser entomólogo y no botánico, lo cual se ve acentuado cuando el investigador trabaja en regiones donde la flora del lugar le es desconocida. No obstante, en este sentido conviene señalar que en varios de los casos estudiados en el presente trabajo se han realizado consultas a diferentes especialistas en taxonomía vegetal para confirmar las observaciones de campo. En

nuestros resultados se disponía de este tipo de observaciones para el 37% de las especies estudiadas, siendo todos los registros coherentes con la información bibliográfica previamente disponible y con las inferencias recuperadas en los árboles filogenéticos (en dos de estos casos, además de la familia botánica conocida se infirió una segunda familia inédita para el insecto).

#### 4.3.5.5.- *Polifagia y estenofagia*

Una de las características principales de nuestro método es que analiza el comportamiento trófico de un individuo concreto. Si el animal estudiado se alimentase de más de una especie vegetal, esto podría ser fácilmente puesto de manifiesto mediante técnicas de clonación como hemos demostrado en este trabajo. Los estudios que caracterizan el trofismo de una especie empleando diferentes individuos (especialmente si estos provienen de diferentes localidades) podrían confundir polifagia con casos de especiación incipiente ligada a especialización divergente. Esta situación ha sido descrita para el crisomelino *Chrysomela lapponica* Linnaeus, 1758, que históricamente había sido asociada con especies de *Betula* L. (Betulaceae Gray, nom. cons.) y *Salix* (Salicaceae) hasta que se ha demostrado que existen barreras reproductivas entre poblaciones que explotan ambos recursos (Gross *et al.*, 2004).

#### 4.3.5.6.- *La alimentación de los Chrysomelinae australianos*

En el presente trabajo se presentan los primeros datos moleculares sobre el comportamiento trófico de un considerable número de géneros y especies de Chrysomelinae australianos, y se demuestra en algunos casos la existencia de una selección trófica múltiple. Este estudio pone de manifiesto además el formidable espectro trófico de los crisomelinos australianos.

El aislamiento tectónico de Australia (ca 25 m.a.) y los cambios en las corrientes marinas que a continuación tuvieron lugar favorecieron la transición hacia un clima más seco, frío y estacional en el continente, transformando el bioma húmedo representado por formaciones homogéneas de bosque lluvioso en el singular bioma esclerófilo australiano dominado por unos pocos linajes vegetales entre los que se incluyen las acacias y los eucaliptos (Crisp *et al.*, 2004). No es sorprendente que la mayoría de las especies de crisomelinos australianos, y particularmente aquellas que

pertenecen a los géneros más especiosos, se alimenten sobre alguno de estos grupos botánicos altamente diversificados (Reid, 2006). Por ejemplo, las especies de *Calomela*, *Trachymela* o *Paropsisterna* exhiben una dieta estricta sobre estos taxones vegetales, como sería el caso de los dos primeros en *Acacia* y *Eucalyptus* respectivamente (Reid, 2006). Nuestras inferencias reflejan dichas relaciones tróficas. Otros géneros como *Peltoschema* albergan representantes capaces de explotar familias botánicas bastante divergentes. Para este último género y algunos otros (*Ethomela* y *Rhaebosterna*) hemos detectado un espectro trófico basado en una especie arbórea dominante en el entorno (Fabaceae o Myrtaceae) y una elección alternativa sobre una especie herbácea que siempre se trata de una Asteraceae. Ya que estas inferencias han sido obtenidas a partir de un solo individuo en cada caso, podemos interpretar que el mismo animal se ha alimentado de los dos tipos de planta en un corto periodo de tiempo previo a su colecta. Esto podría estar indicando bien una verdadera polifagia o bien un uso oportunístico de una planta herbácea durante la dispersión entre hospedadores o durante los ciclos diarios de subida y bajada del árbol para alimentarse y refugiarse.

En el presente trabajo se establecen nuevas asociaciones tróficas para ocho de los géneros de Chrysomelinae australianos estudiados. En la mayoría de los casos se trata de géneros para los que se posee un escaso conocimiento acerca de su biología, probablemente debido a que sus especies son de pequeño tamaño, con poblaciones reducidas y que habitan lugares remotos (e.g. *Chalcolampra*, *Ethomela*, *Geomela*, *Palaeomela* y *Rhaebosterna*), o a que siendo más conspicuos son propios de hábitats con una elevada densidad y complejidad vegetal que los hace difícilmente accesibles (e.g. *Phyllocharis*). Las aportaciones tróficas obtenidas para este tipo de insectos representan una valiosa oportunidad para ampliar la información que acerca de ellos disponemos, ya que generalmente el principal problema que un investigador encuentra a la hora de estudiar a estos animales, consiste en la enorme dificultad que entraña su localización en el medio natural, problema que sin duda se ve paliado en gran medida al conocer las plantas o grupo de plantas hospedadoras sobre las que cada uno de ellos se alimenta.

Las nuevas aportaciones tróficas detectadas para el género *Peltoschema* no solamente expanden su rango de hospedadores conocido para la familia Fabaceae al recuperar una inferencia sobre el género *Daviesia* para la especie *P. festiva*, sino que además amplían hasta cuatro el número de familias hospedadoras para las que previamente se tenía constancia. Nuestros resultados están en sintonía con la idea de

que la elevada variabilidad morfológica exhibida por *Peltoschema* podría ser indicativa de su polifilia (Reid y Ślipiński, 2001).

El trofismo inferido para *Eulina pulchra* sobre *Ligustrum* es interesante pues constituye una evidencia de la capacidad de adaptación trófica de esta especie, ya que en Australia *Ligustrum* es un género alóctono que se ha naturalizado tras su introducción con fines ornamentales.

La alimentación complementaria sobre Asteraceae inferida para *Ethomela*, *Peltoschema* y *Rhaebosterna* pone de manifiesto un comportamiento alimenticio hasta el momento insospechado y sin duda tiene un carácter revelador en relación a sus respectivas biología.

#### 4.3.5.7.- Aplicación en material seco de colección

En el presente trabajo hemos demostrado que el intrón *trnL*, probablemente debido a su moderada longitud y a la universalidad de sus cebadores, es un marcador molecular apropiado para estudios donde el ADN de la muestra se encuentra sometido a procesos de degradación. En nuestro caso los ejemplares utilizados fueron colectados en fresco y preservados de inmediato en alcohol con el fin de minimizar el deterioro del material genético hasta el momento de su procesado en el laboratorio, pero por lo general éstas no suelen ser las condiciones en las que se trabaja con insectos. Tradicionalmente las colecciones entomológicas han sido conservadas en seco, siendo raras (aunque cada vez más frecuentes) las situaciones donde los especímenes son preservados en alcohol. La desecación y el paso del tiempo sobre muestras preservadas supone un incremento en el nivel de degradación del material genético, que dependerá en cada caso concreto de factores tan decisivos como son el método empleado en el sacrificio del animal (i.e. sustancias químicas agresivas con el ADN) y el tiempo transcurrido desde entonces. Aunque los resultados no se muestran en este trabajo debido a que los insectos empleados eran Chrysomelidae no pertenecientes a la subfamilia Chrysomelinae, creemos que es importante señalar que hemos conseguido amplificar y realizar inferencias tróficas a partir de material de colección conservado en seco (datos no mostrados). Esto representa un avance interesante ya que no siempre es posible disponer de material fresco y/o conservado en alcohol de las especies cuyo trofismo se desea estudiar (i.e. especies raras o amenazadas, regiones biogeográficas alejadas, hábitats de difícil acceso, etc.) por lo

que la posibilidad de utilizar ejemplares desecados, por lo general fácilmente accesibles e inventariados en las colecciones, supone una considerable ventaja. Además, el estudio del material vegetal contenido en insectos raros de biología desconocida o bajo sospecha de extinción puede facilitar en gran medida la localización de sus poblaciones desde el momento en que se conocen sus respectivas plantas hospedadoras.

#### 4.3.5.8.- *Ventajas del método*

El método que aquí presentamos ofrece ventajas que sin duda lo sitúan muy por encima de las prácticas clásicas de determinación de plantas hospedadoras. Tal vez una de las principales ventajas consista en la rapidez de su aplicación, ya que la manipulación y procesado de las muestras previos a la extracción de ADN son prácticamente nulos. Esta particularidad, sumada a los continuos avances en los campos de la secuenciación de ADN y de la inferencia filogenética, permite la obtención de un gran volumen de resultados en un breve periodo de tiempo. Otra gran ventaja consiste en la posibilidad de detectar múltiples plantas hospedadoras en un único individuo gracias a la aplicación de técnicas de clonación a partir de productos de PCR. Además, el método permite trabajar independientemente de que se disponga o no de las estructuras morfológicas que generalmente se emplean para la determinación de las especies vegetales (e.g. estructuras reproductoras, frutos), lo cual se convierte en una gran ventaja si consideramos la enorme dificultad que entrañaría la necesidad de contar con un especialista para cada grupo botánico en cuestión. Este problema es especialmente significativo en el caso de los insectos fitófagos, ya que una gran proporción de estos se alimenta sobre plantas jóvenes e inmaduras y que por tanto carecen de las estructuras reproductoras diagnósticas. Otro punto a tener en cuenta es la posibilidad de establecer relaciones tróficas a partir el material que típicamente se colecta de forma masiva e indiscriminada (e.g. fumigación de dosel forestal) en campañas de estudio de biodiversidad, lo cual puede proporcionar una información muy valiosa sobre los ecosistemas estudiados y sobre la biología de las especies fitófagas que en ellos habitan. Por último, como ya se ha discutido en un apartado anterior, la posibilidad de la aplicación de la técnica en insectos de colección conservados en seco abre también todo un mundo de posibilidades en el campo de la investigación de las relaciones tróficas.

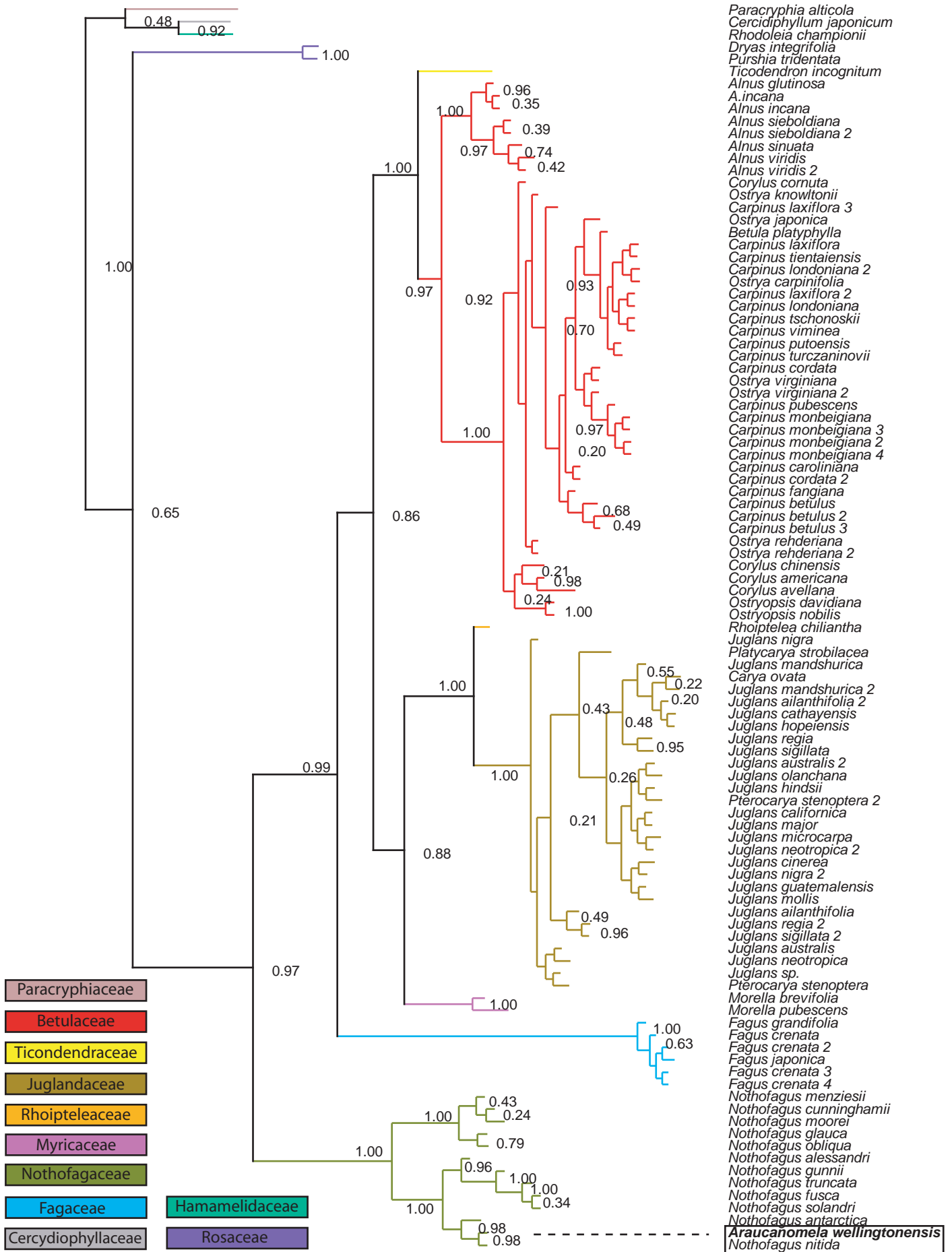
#### 4.3.5.9.- *Potenciales beneficiarios*

La extensión de las interacciones insecto-planta tanto en número de especies involucradas como en términos de biomasa total representada por ambos grupos es tal que es difícil enumerar todas las disciplinas biológicas que podrían beneficiarse de la aplicación de este método. Sin duda que la entomología tanto básica como aplicada se enriquecerá con este tipo de técnicas. Son muchas las especies de insectos fitófagos que aún quedan por describir y una técnica como la aquí propuesta contribuirá en gran medida al conocimiento de sus respectivas biología. Desde el punto de vista aplicado, el método puede ser muy interesante a la hora de escoger posibles insectos fitófagos candidatos para el control biológico de plantas invasoras dentro de los planes de manejo de plagas. Por otro lado, son muchas las ramas de la ecología que podrían beneficiarse del método (e.g. ecología de redes tróficas, dinámica de ecosistemas). El método también puede ser interesante en estudios centrados en las relaciones evolutivas de los diferentes grupos que interactúan (e.g. filogenia animal y vegetal, coevolución, radiación adaptativa). Otros campos donde la aplicación de estos métodos será interesante comprenden áreas diversas como pueden ser entre otras la botánica, la etología, la fisiología tanto animal como vegetal y la bioquímica.



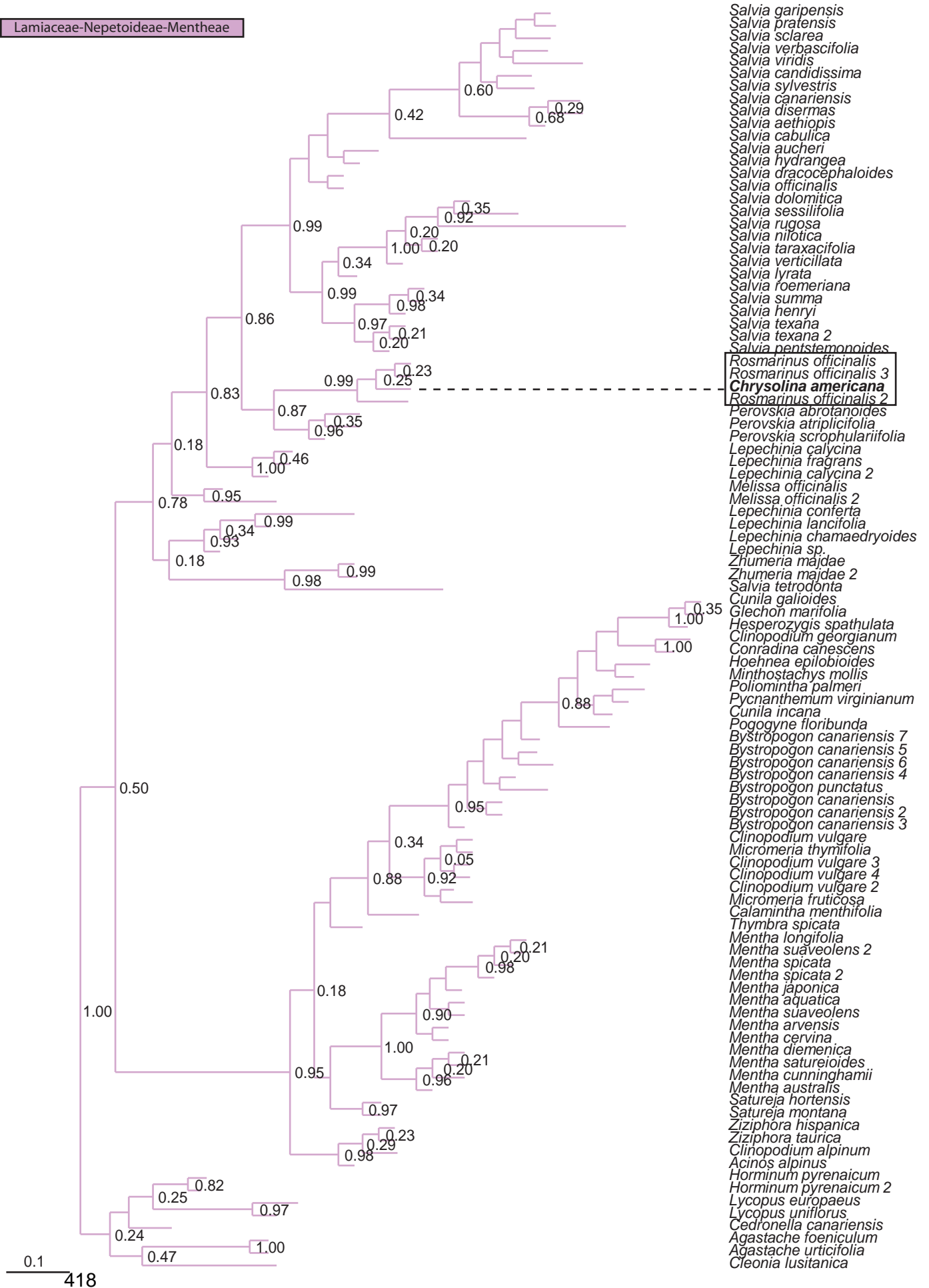
#### **4.3.6.- Apéndice A: Árboles filogenéticos**

*Araucanomela wellingtonensis* Bechyné y Bechyné, 1973  
trnL intrón



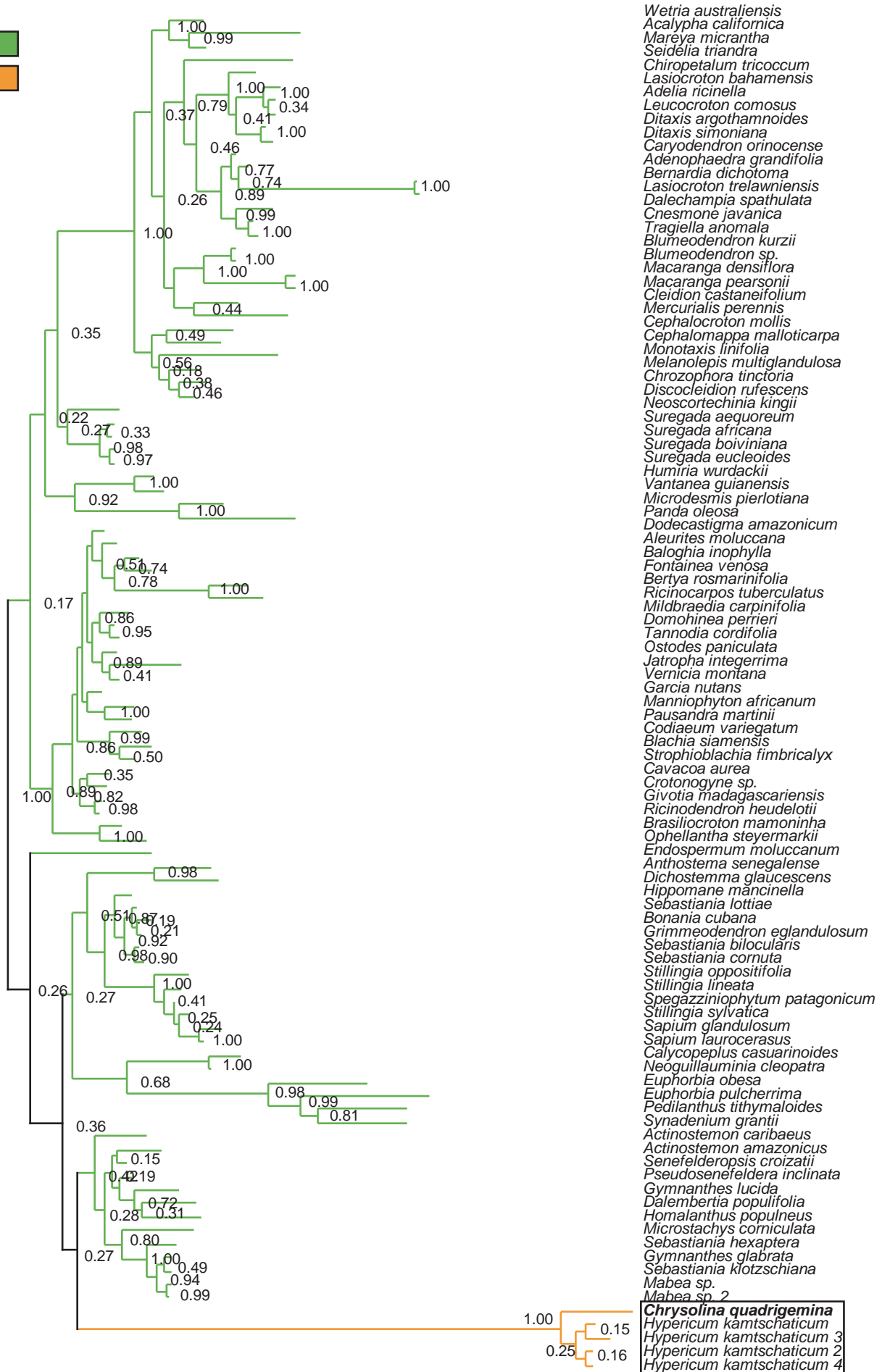
*Chrysolina americana* (L., 1758)  
trnL intrón

Lamiaceae-Nepetoideae-Mentheae



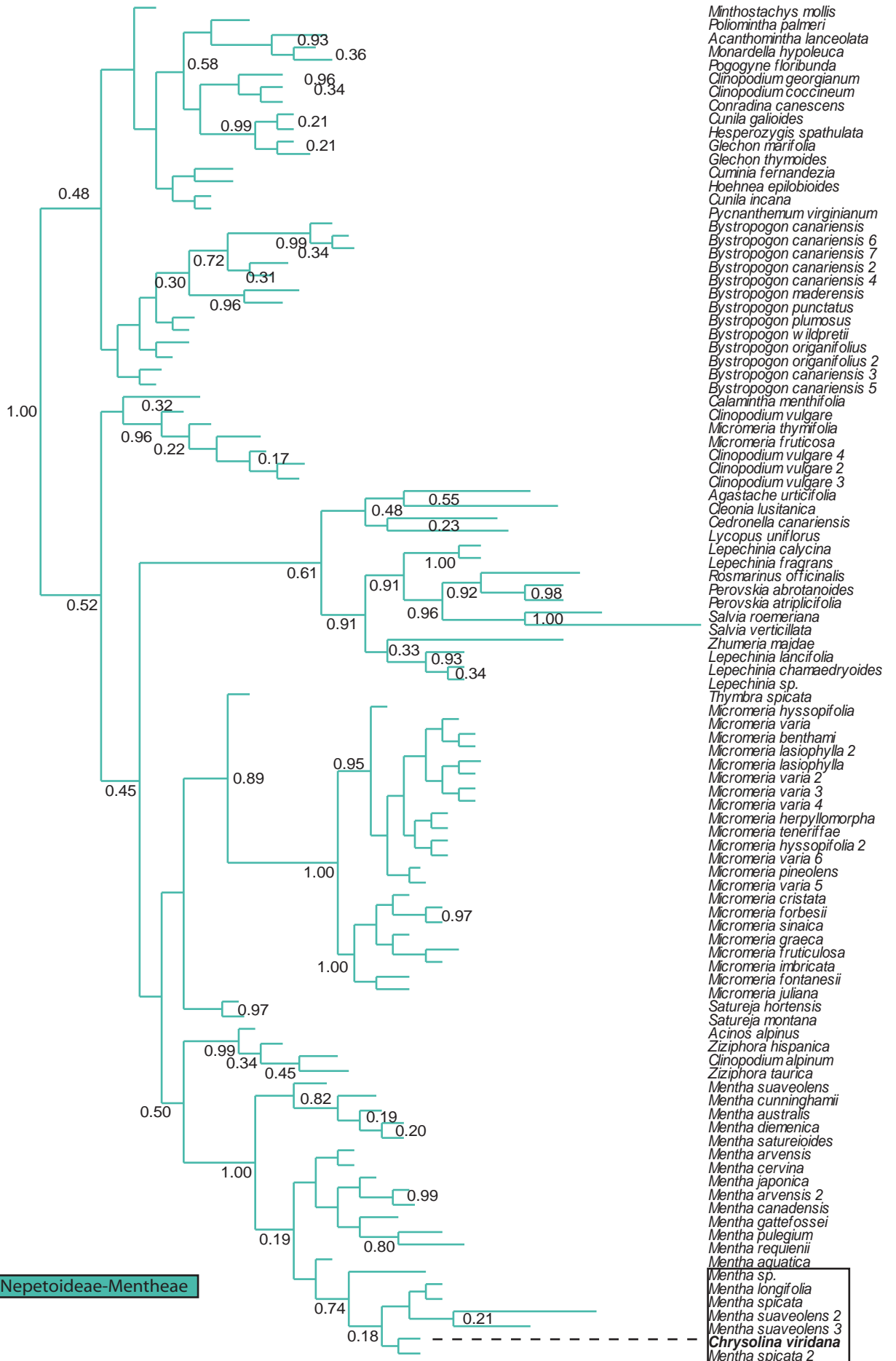
*Chrysolina quadrigemina* (Suffrian, 1851)  
trnL intrón

Euphorbiaceae  
Clusiaceae



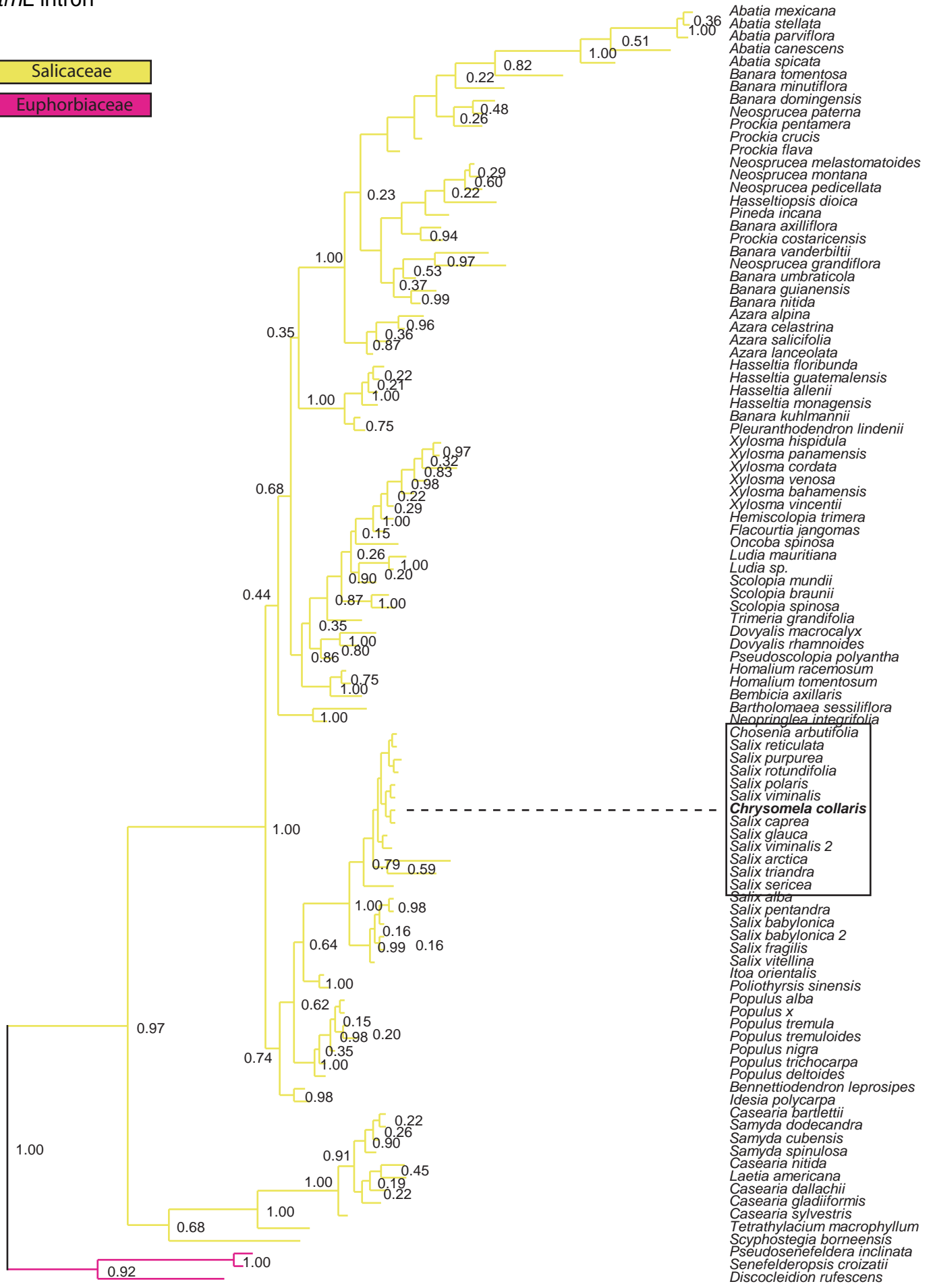
0.1

*Chrysolina viridana* (Küster, 1844)  
trnL intrón



*Chrysomela collaris* L., 1758  
trnL intrón

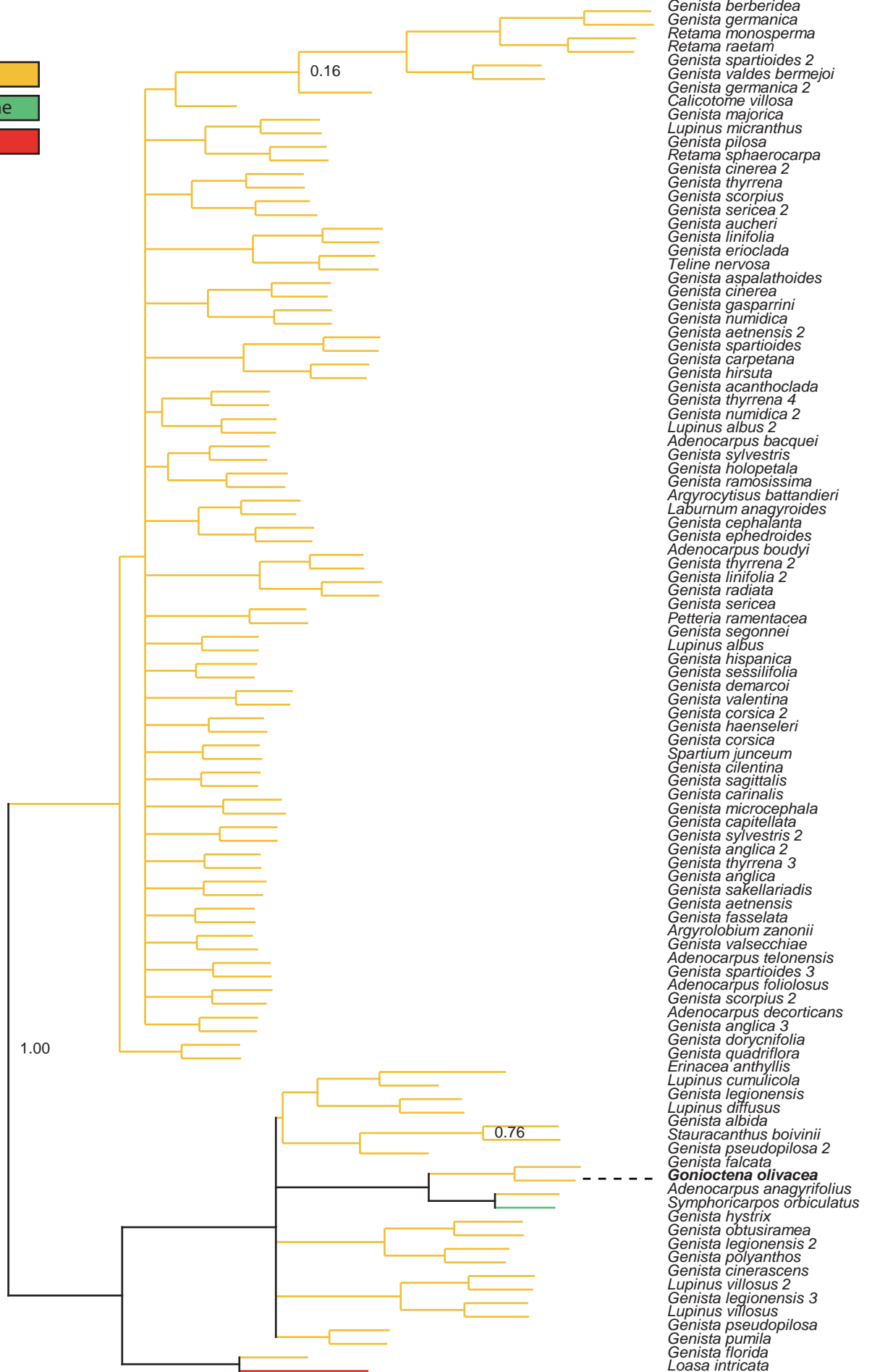
Salicaceae  
Euphorbiaceae



0.1

*Gonioctena olivacea* (Forster, 1771)  
trnL intron loop P6

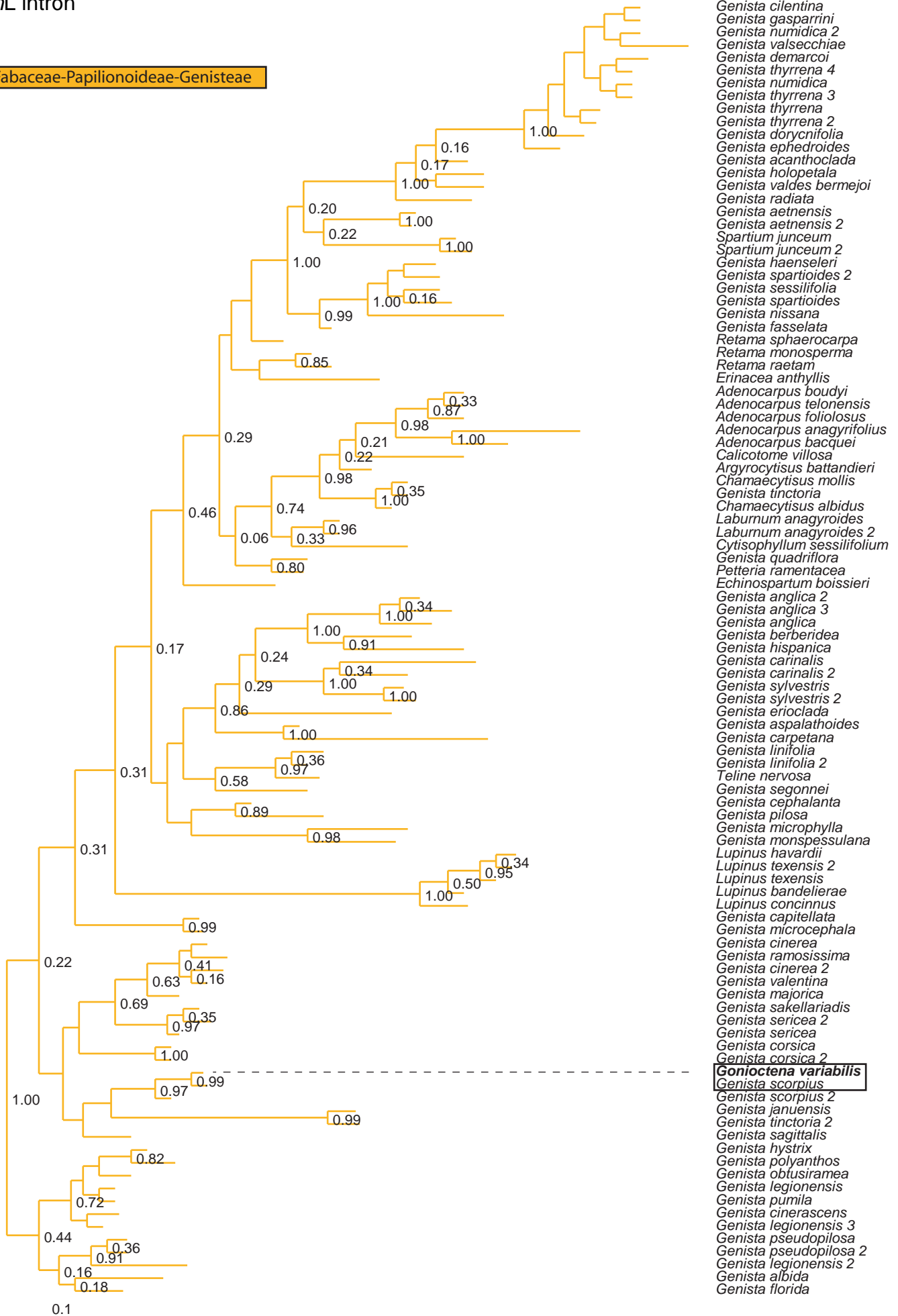
- Fabaceae
- Caprifoliaceae
- Loasaceae



0.1

*Gonioctena variabilis* (Olivier, 1790)  
trnL intrón

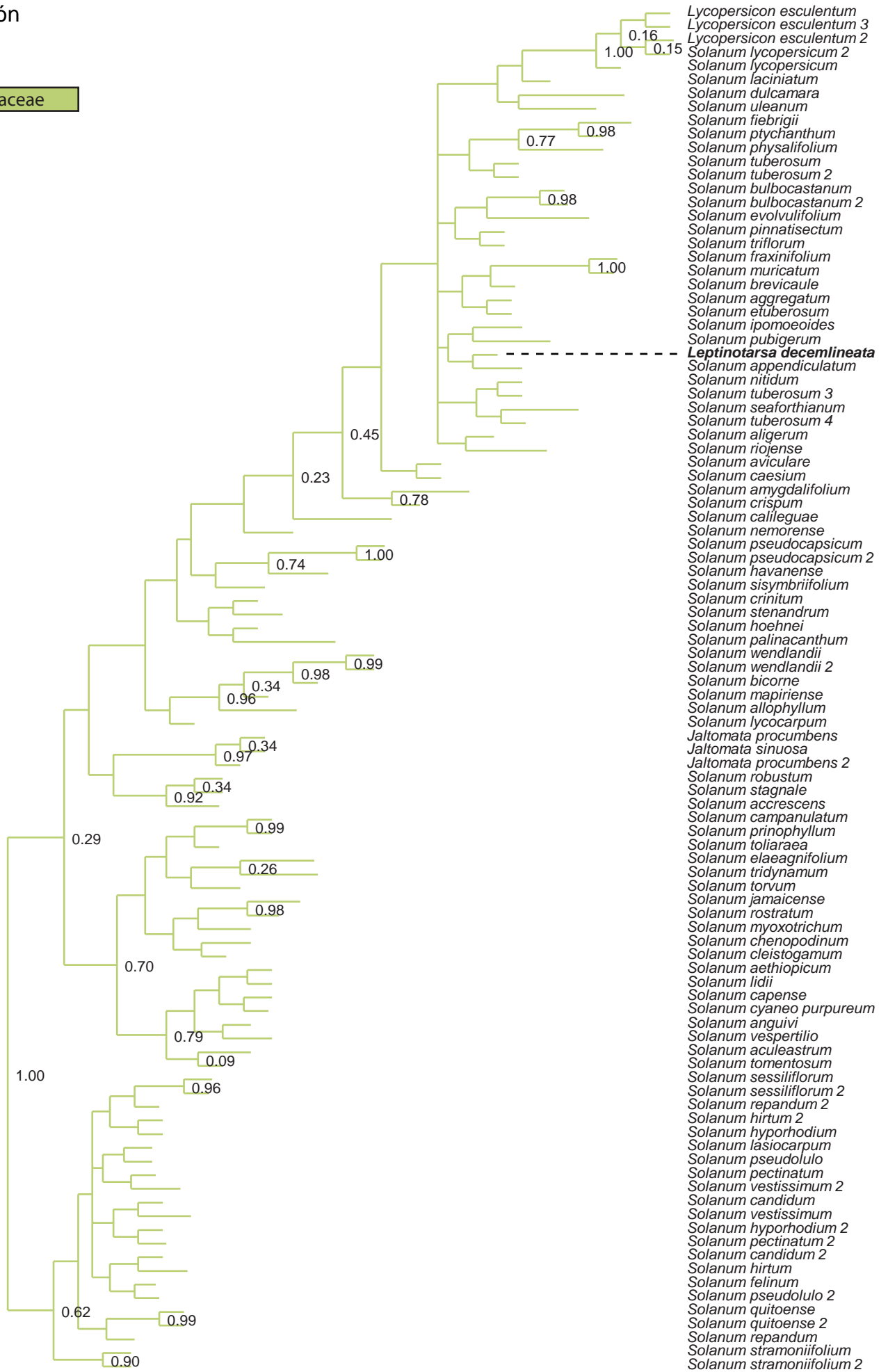
Fabaceae-Papilionoideae-Genisteae





*Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824)  
*trnL* intrón

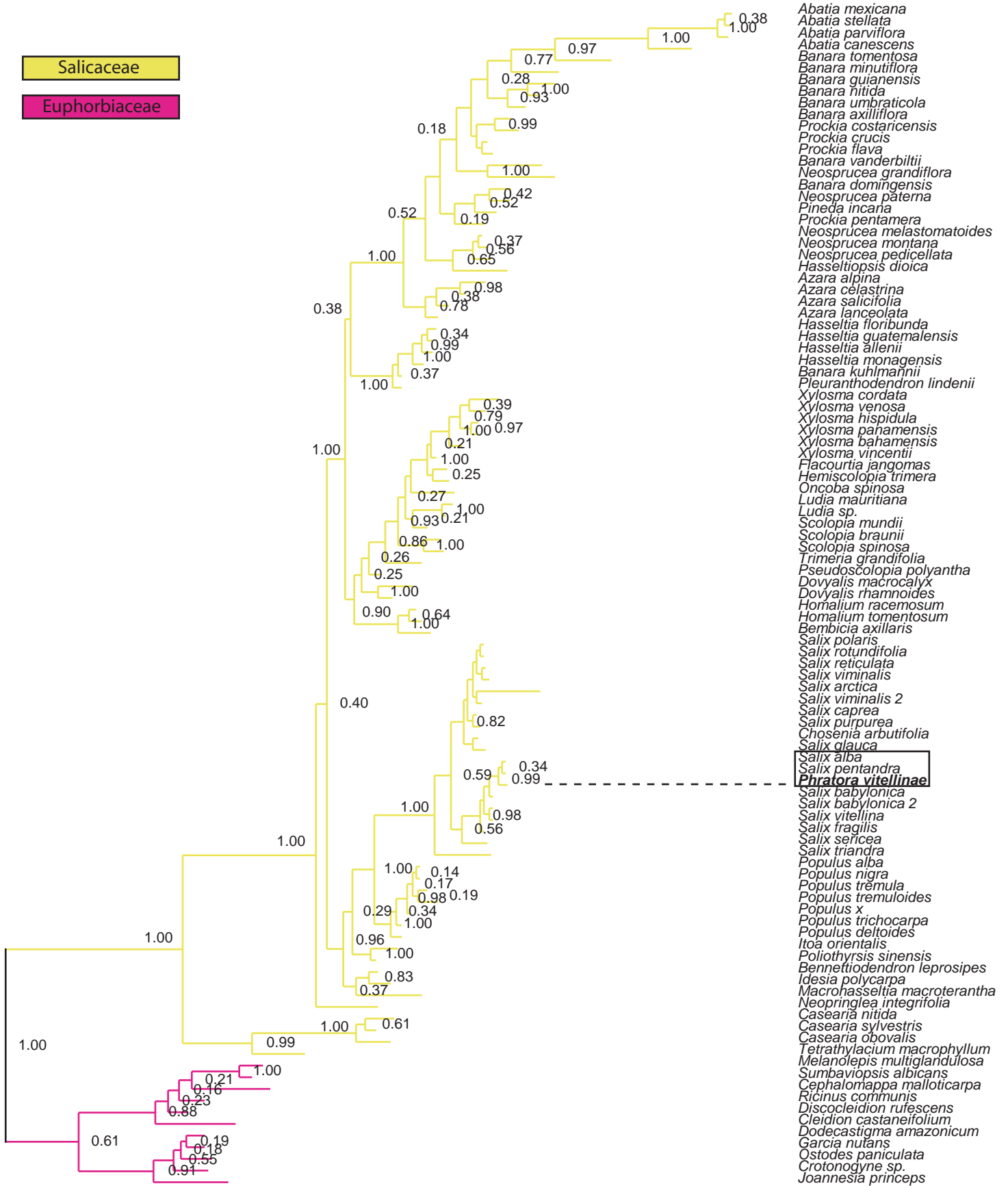
Solanaceae



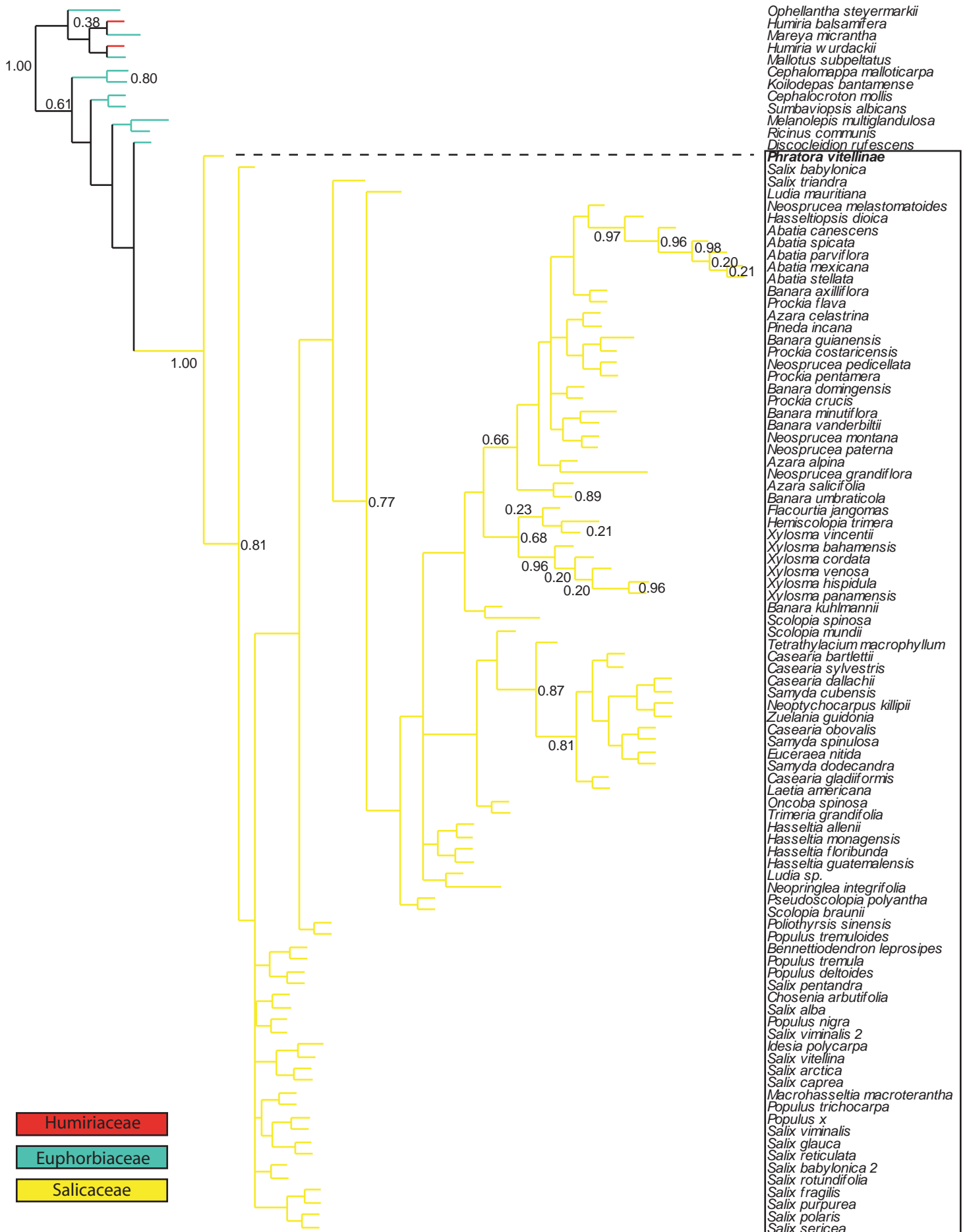
*Phratora vitellinae*  
*trnL* intron

Salicaceae

Euphorbiaceae

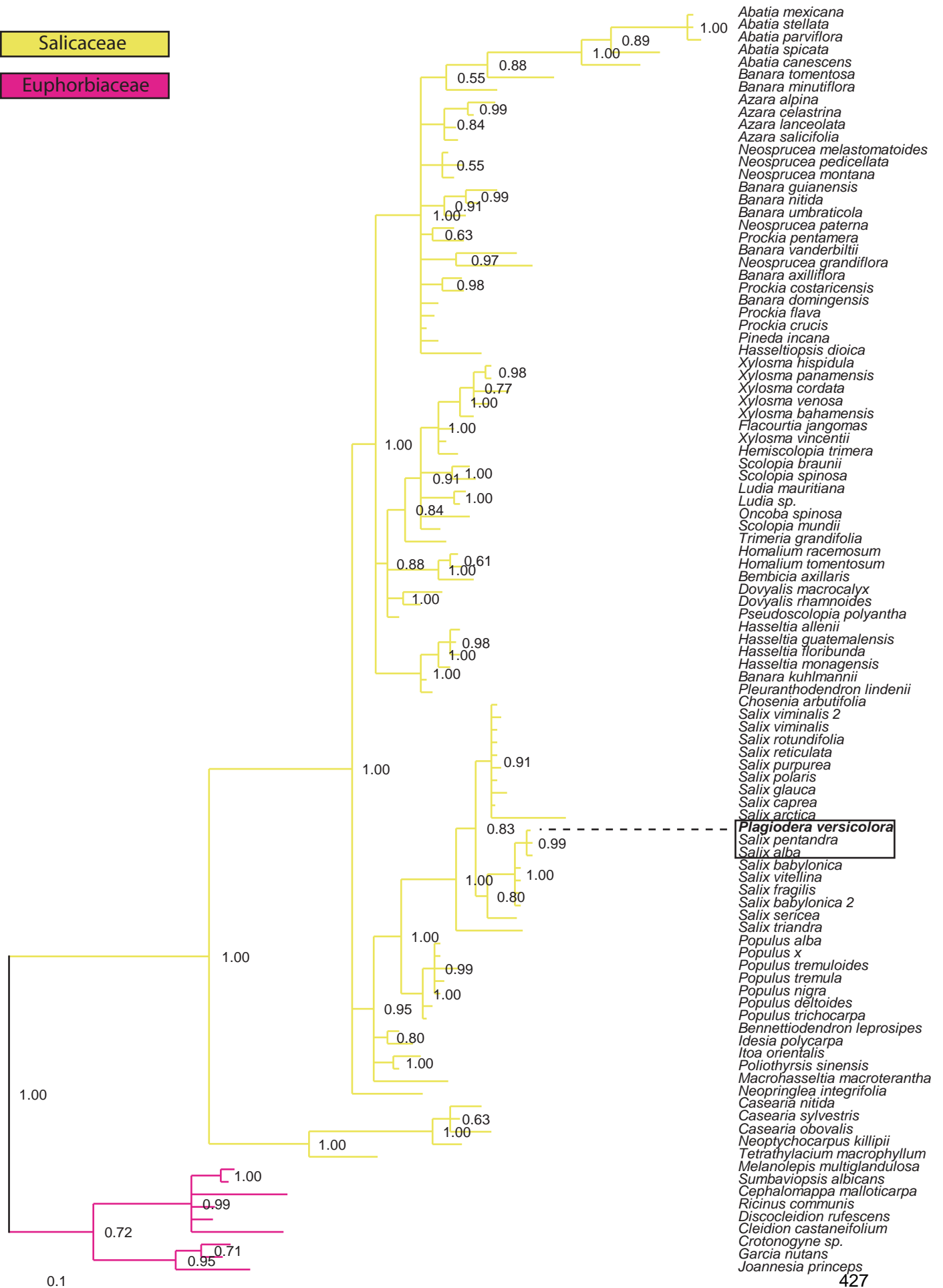


*Phratora vitellinae* (L., 1758)  
trnL intrón loop P6



*Pagiodera versicolora* (Laicharting, 1781)  
trnL intrón

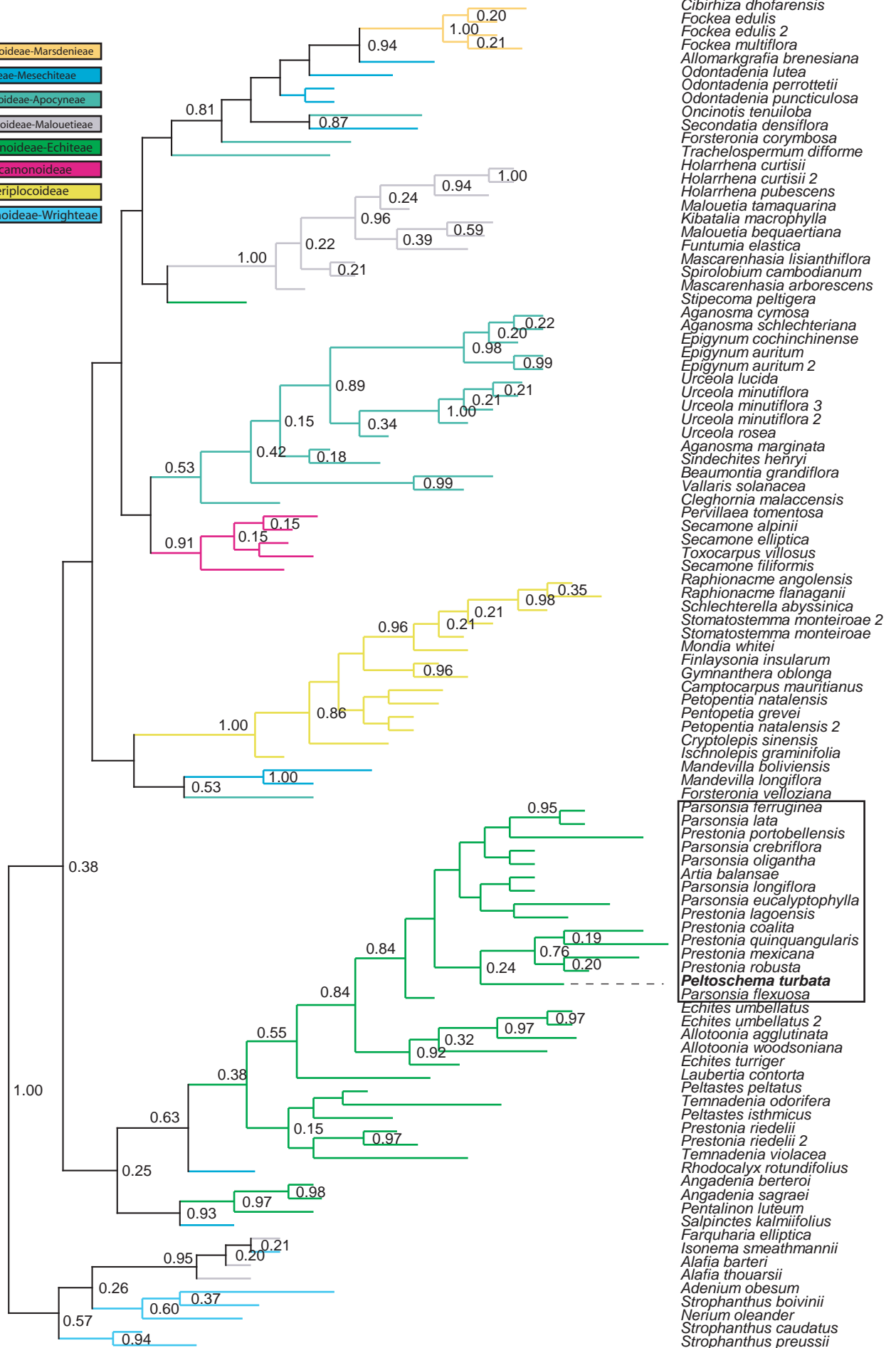
Salicaceae  
Euphorbiaceae



*Peltoschema turbata* (Chapuis, 1877)

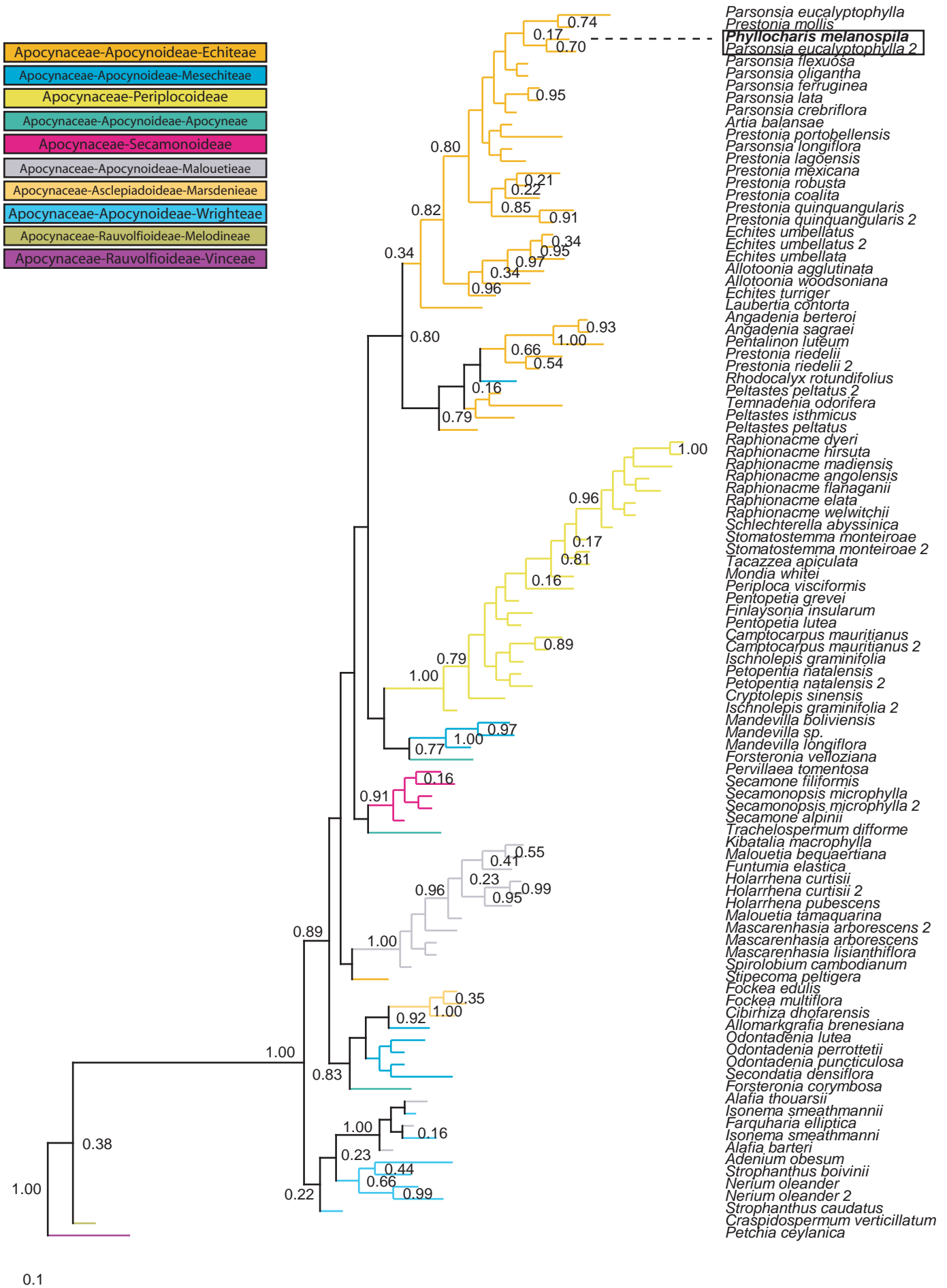
*trnL* intrón

- Apocynaceae-Asclepiadoideae-Marsdenieae
- Apocynaceae-Apocynoideae-Mesechiteae
- Apocynaceae-Apocynoideae-Apocynae
- Apocynaceae-Apocynoideae-Malouetieae
- Apocynaceae-Apocynoideae-Echiteae
- Apocynaceae-Secamonoideae
- Apocynaceae-Periplocoideae
- Apocynaceae-Apocynoideae-Wrighteae

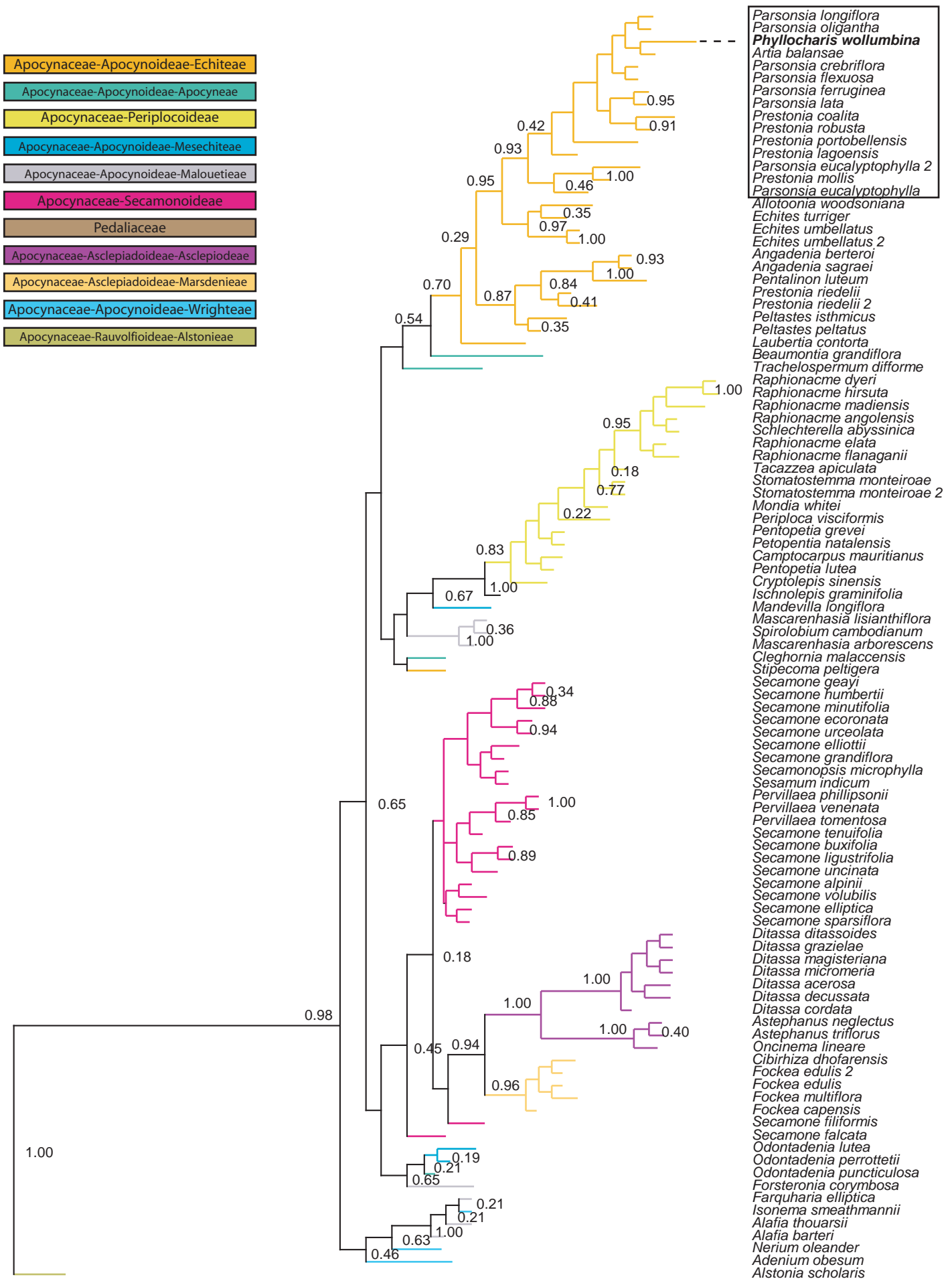


- Cibirhiza dhofarensis*
- Fockea edulis*
- Fockea edulis* 2
- Fockea multiflora*
- Allomarkgrafia brenesiana*
- Odontadenia lutea*
- Odontadenia perrottetii*
- Odontadenia puncticulosa*
- Oncinotis tenuiloba*
- Secondatia densiflora*
- Forsteronia corymbosa*
- Trachelospermum difforme*
- Holarrhena curtisii*
- Holarrhena curtisii* 2
- Holarrhena pubescens*
- Malouetia tamaquarina*
- Kibatalia macrophylla*
- Malouetia bequaertiana*
- Funtumia elastica*
- Mascarenhasia lisianthiflora*
- Spirolobium cambodianum*
- Mascarenhasia arborescens*
- Stipecoma peltigera*
- Aganosma cymosa*
- Aganosma schlechteriana*
- Epigynum cochinchinense*
- Epigynum auritum*
- Epigynum auritum* 2
- Urceola lucida*
- Urceola minutiflora*
- Urceola minutiflora* 3
- Urceola minutiflora* 2
- Urceola rosea*
- Aganosma marginata*
- Sindechites henryi*
- Beaumontia grandiflora*
- Vallaris solanacea*
- Cleghornia malaccensis*
- Pervillaea tomentosa*
- Secamone alpinii*
- Secamone elliptica*
- Toxocarpus villosus*
- Secamone filiformis*
- Raphionacme angolensis*
- Raphionacme flanaganii*
- Schlechterella abyssinica*
- Stomatostemma monteiroae* 2
- Stomatostemma monteiroae*
- Mondia whitei*
- Finlaysonia insularum*
- Gymnanthera oblonga*
- Camptocarpus mauritianus*
- Petopentia natalensis*
- Pentopetia grevei*
- Petopentia natalensis* 2
- Cryptolepis sinensis*
- Ischnolepis graminifolia*
- Mandevilla boliviana*
- Mandevilla longiflora*
- Forsteronia velloziana*
- Parsonsia ferruginea***
- Parsonsia lata***
- Prestonia portobellensis***
- Parsonsia crebriflora***
- Parsonsia oligantha***
- Artia balansae***
- Parsonsia longiflora***
- Parsonsia eucalyptophylla***
- Prestonia lagoensis***
- Prestonia coalita***
- Prestonia quinquangularis***
- Prestonia mexicana***
- Prestonia robusta***
- Peltoschema turbata***
- Parsonsia flexuosa***
- Echites umbellatus*
- Echites umbellatus* 2
- Allotoonia agglutinata*
- Allotoonia woodsoniana*
- Echites turriger*
- Laubertia contorta*
- Peltastes peltatus*
- Temnadenia odorifera*
- Peltastes isthmicus*
- Prestonia riedelii*
- Prestonia riedelii* 2
- Temnadenia violacea*
- Rhodocalyx rotundifolius*
- Angadenia berteroi*
- Angadenia sagraei*
- Pentalinon luteum*
- Salpinctes kalimifolius*
- Farquharia elliptica*
- Isonema smeathmannii*
- Alafia barteri*
- Alafia thouarsii*
- Adenium obesum*
- Strophanthus boivinii*
- Nerium oleander*
- Strophanthus caudatus*
- Strophanthus preussii*

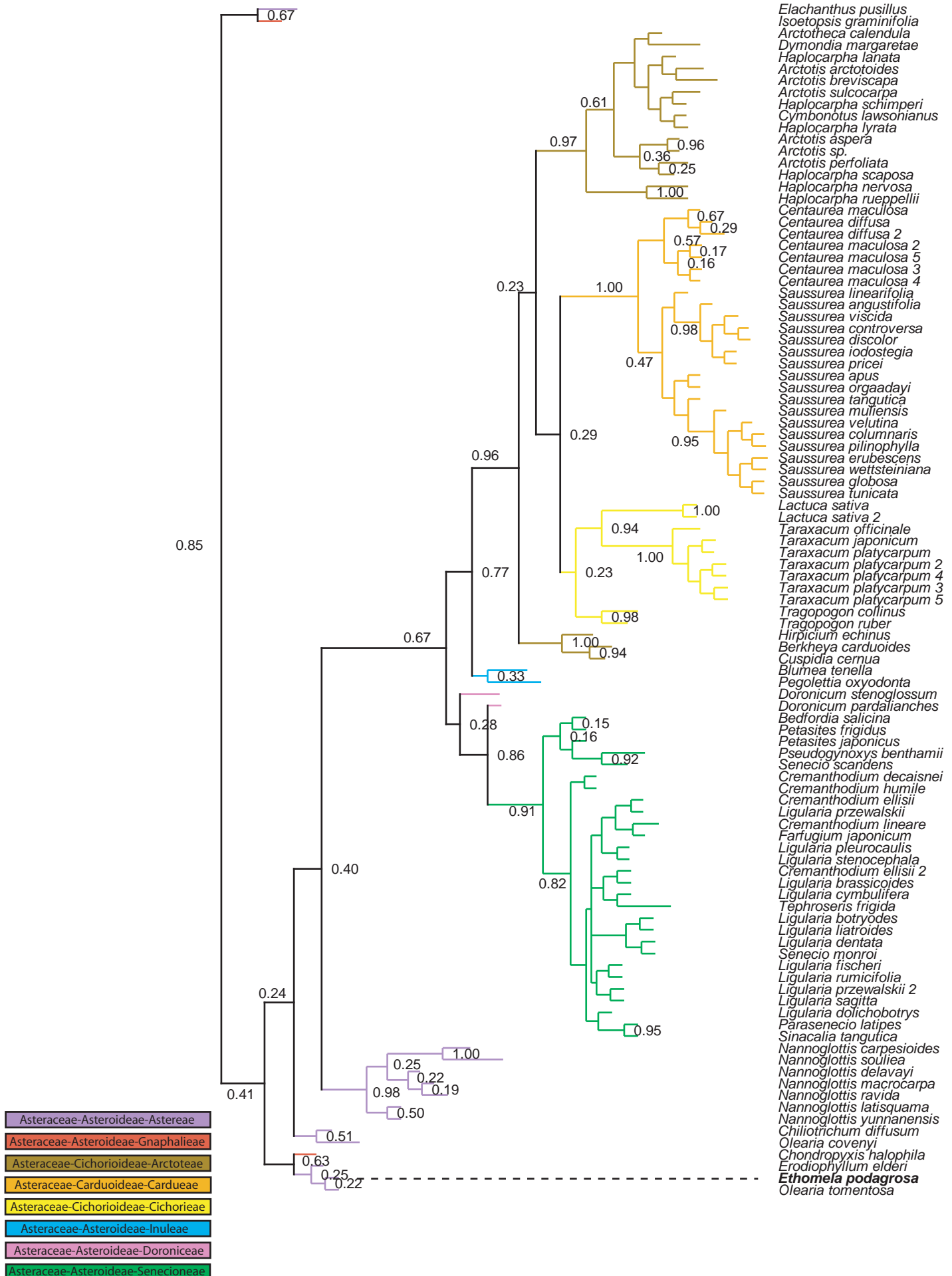
*Phyllocharis melanospila* Baly, 1862  
trnL intrón



*Phyllocharis wollumbina* (Daccordi, 2003)  
trnL intrón



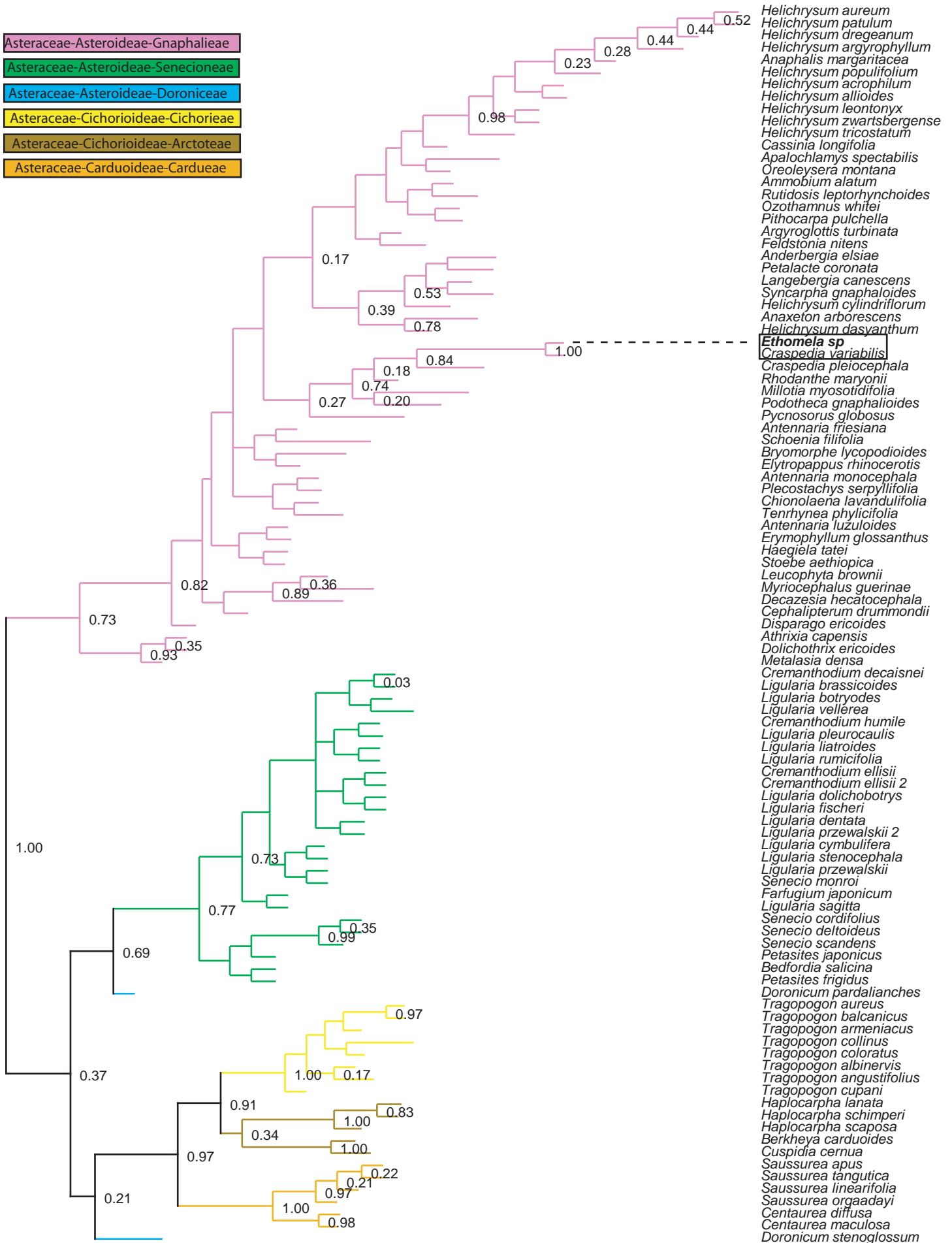
*Ethomela podagrosa* (Lea, 1903)  
trnL intrón





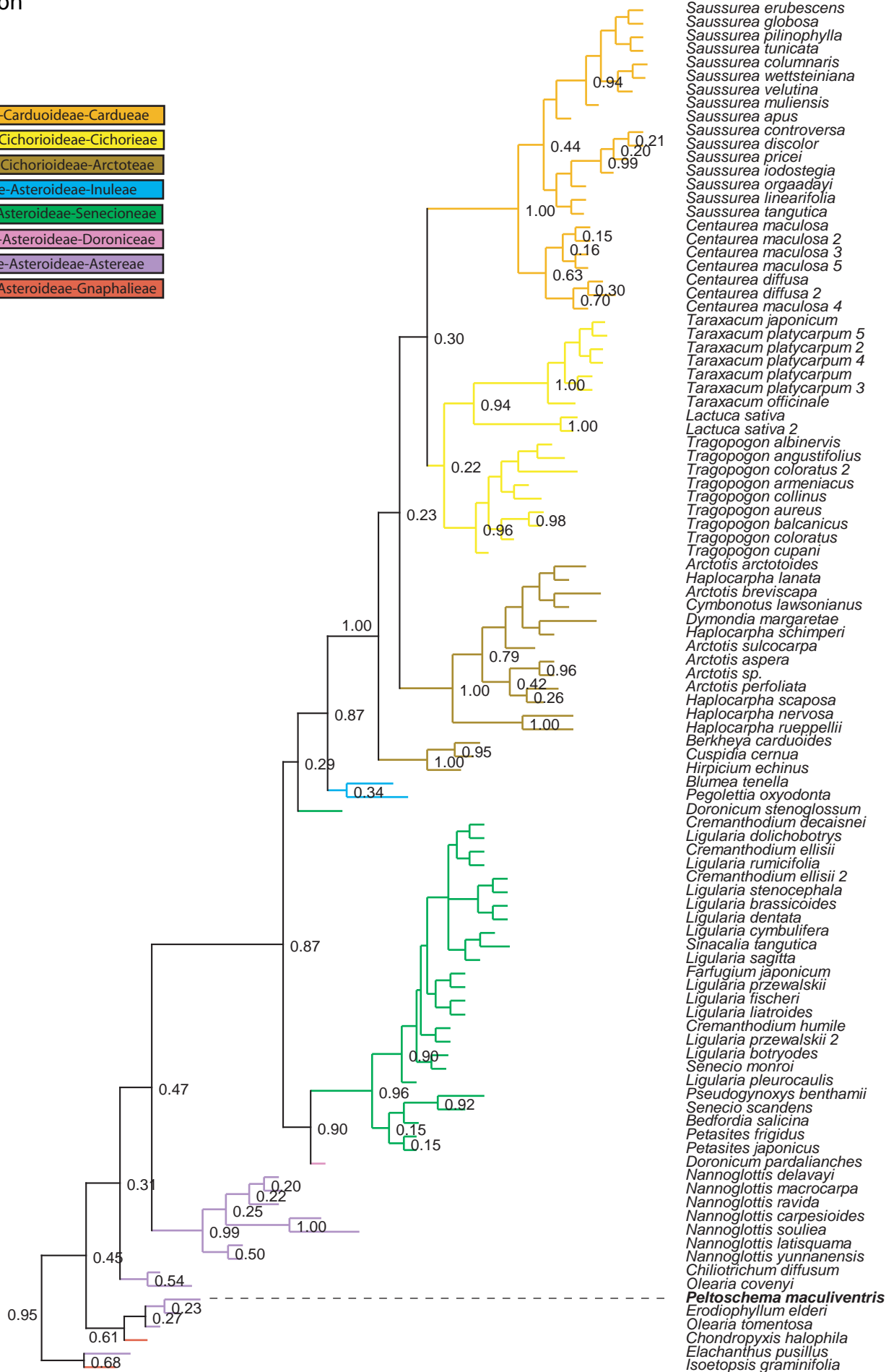
*Ethomela* sp (JAJ63)  
trnL intrón

- Asteraceae-Asteroideae-Gnaphalieae
- Asteraceae-Asteroideae-Senecioneae
- Asteraceae-Asteroideae-Doronicaeae
- Asteraceae-Cichorioideae-Cichorieae
- Asteraceae-Cichorioideae-Arcoteae
- Asteraceae-Carduoideae-Cardueae

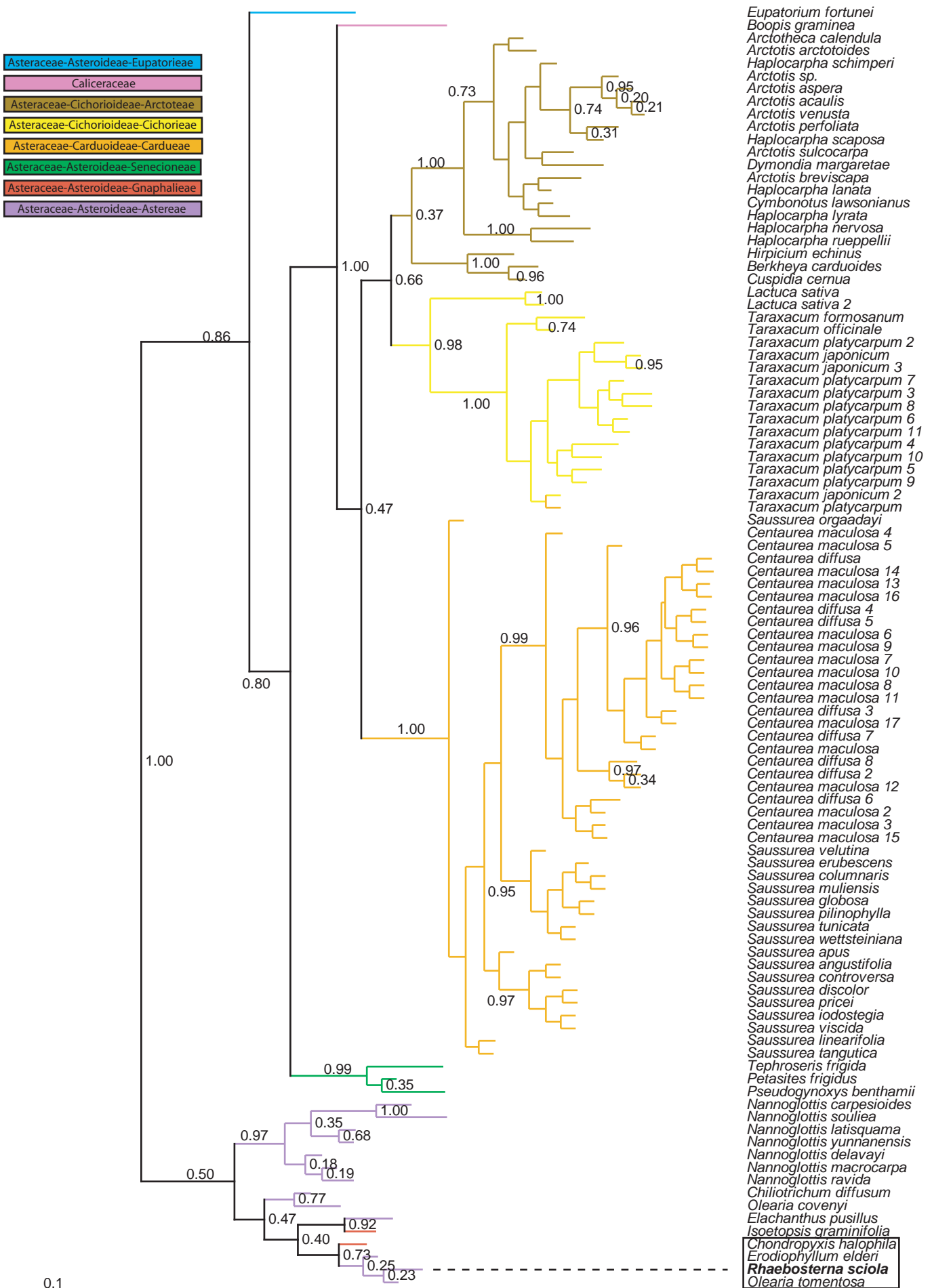


*Peltoschema maculiventris* (Lea, 1924)  
trnL intrón

- Asteraceae-Carduoideae-Cardueae
- Asteraceae-Cichorioideae-Cichorieae
- Asteraceae-Cichorioideae-Arctoteae
- Asteraceae-Asteroideae-Inuleae
- Asteraceae-Asteroideae-Senecioneae
- Asteraceae-Asteroideae-Doronicaceae
- Asteraceae-Asteroideae-Astereae
- Asteraceae-Asteroideae-Gnaphalieae

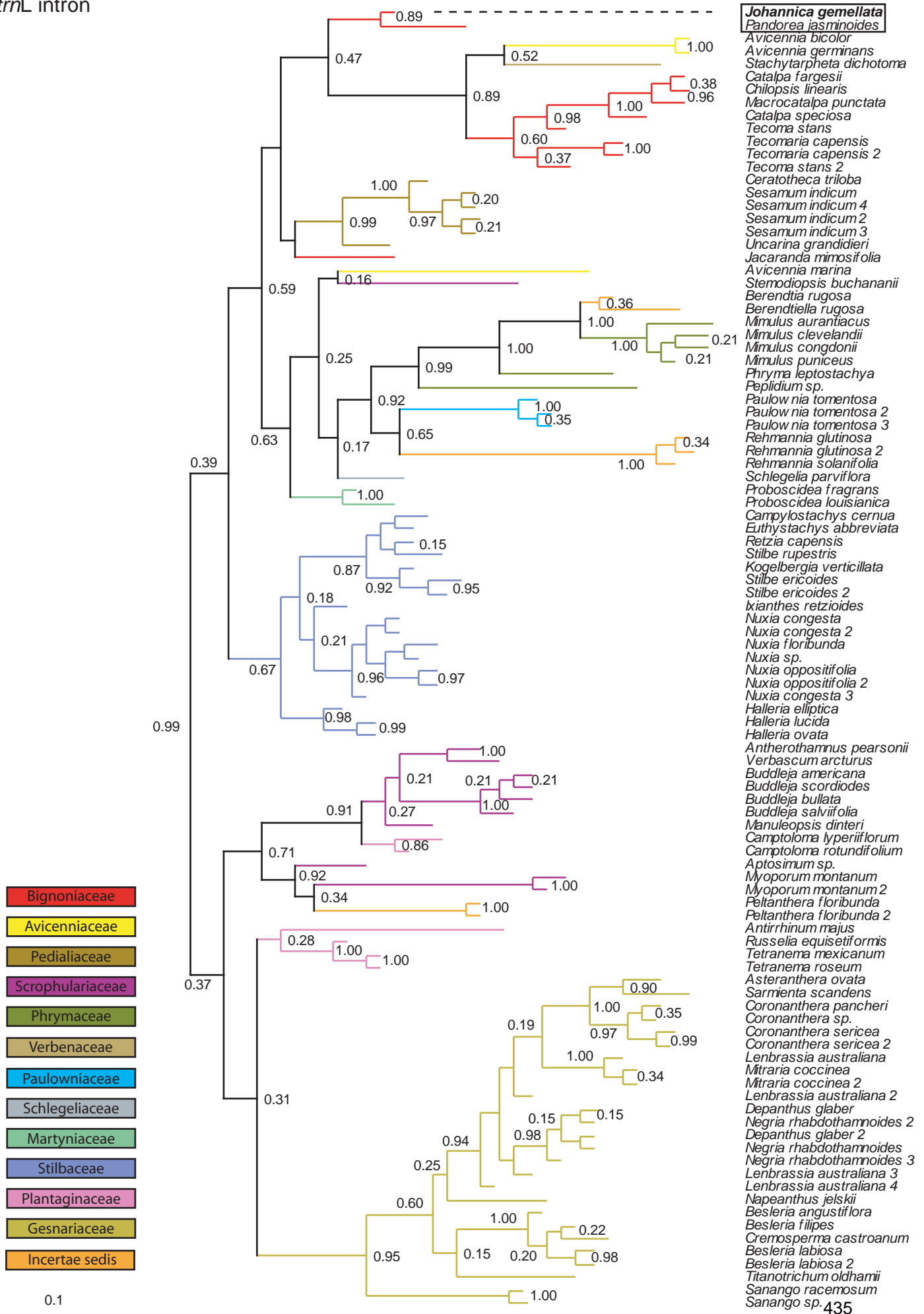


*Rhaebosterna sciola* Weise, 1917  
trnL intrón



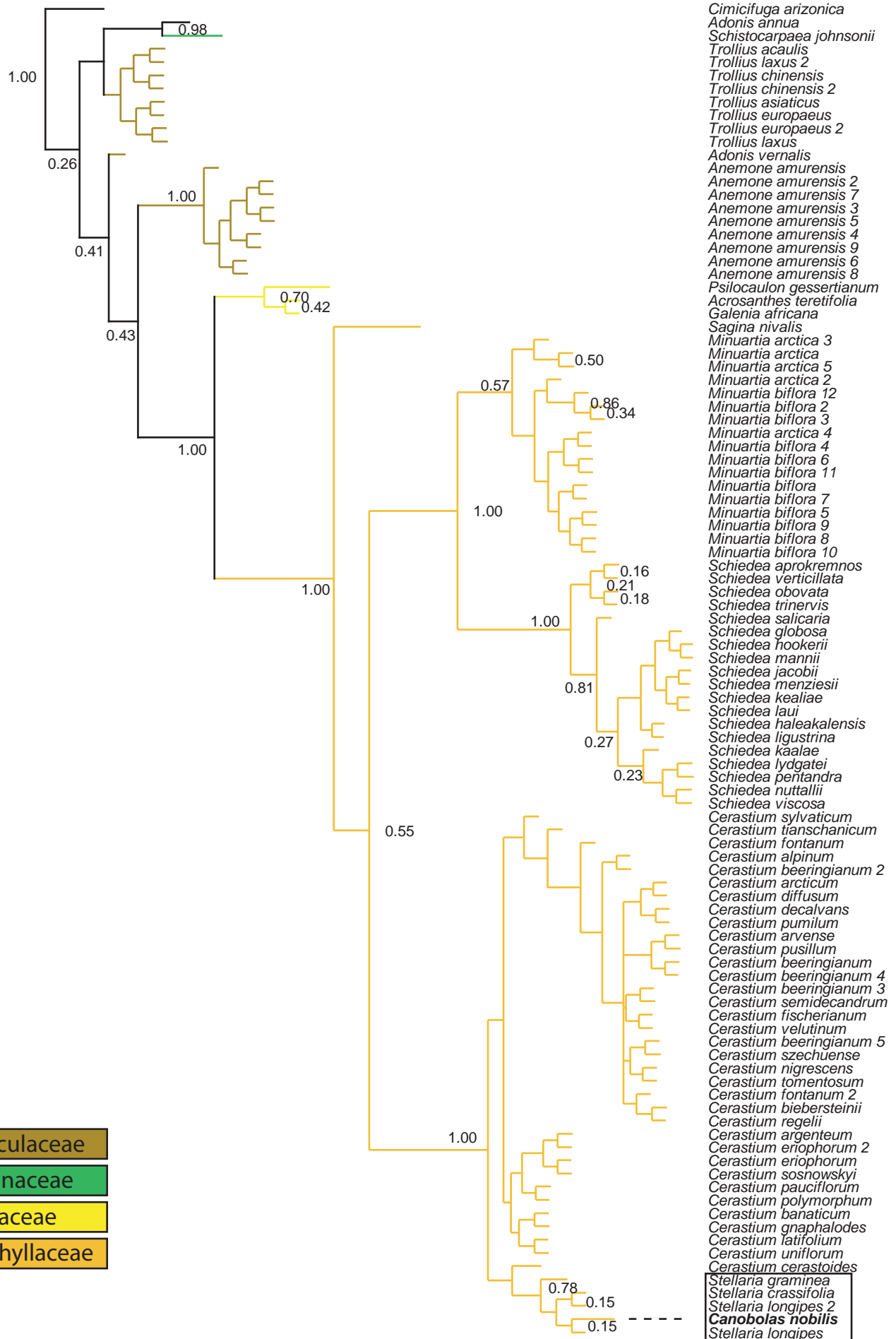
*Johannica gemellata* (Westwood, 1849)

trnL intrón

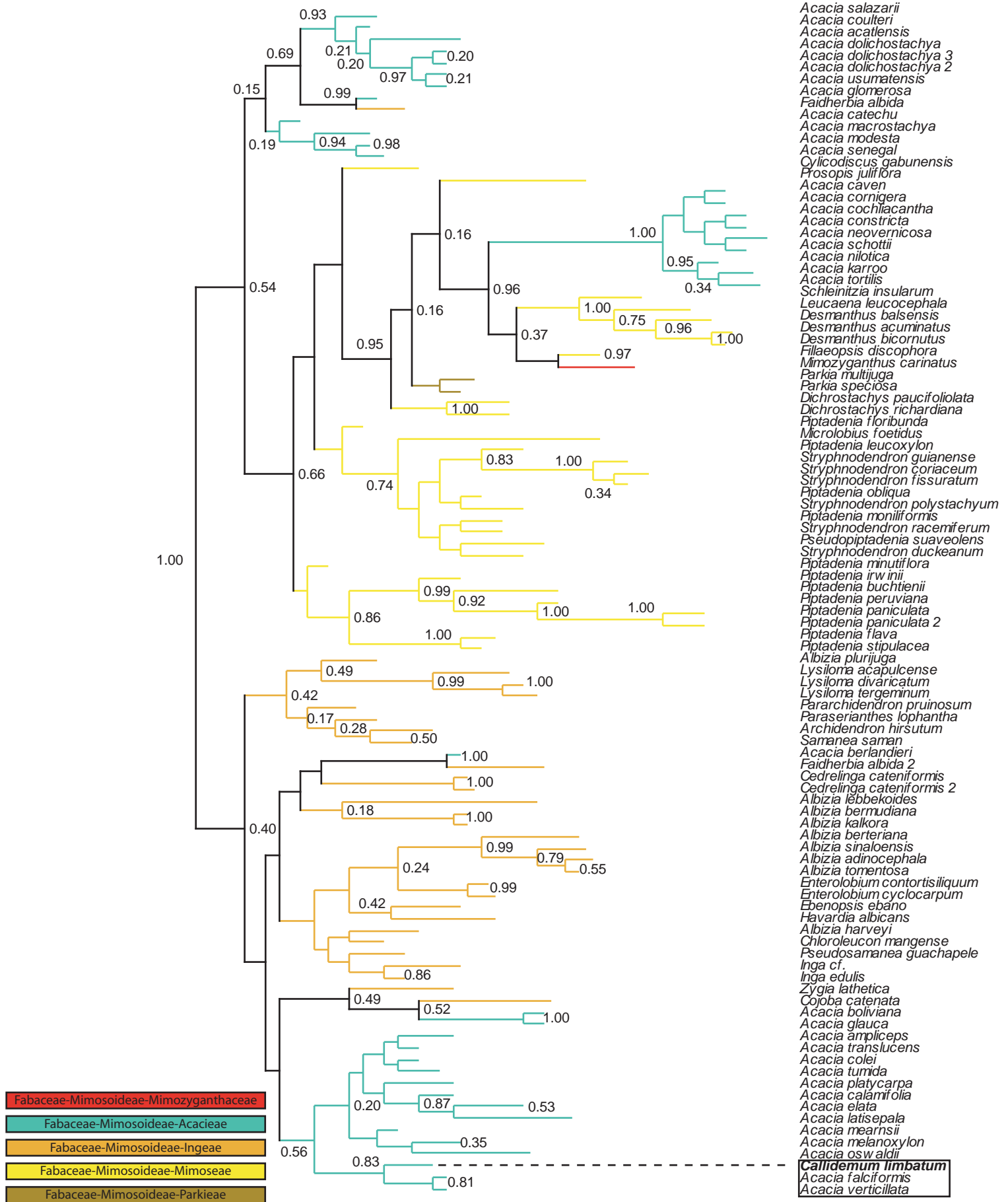


0.1

*Canobolas nobilis* (Lea, 1917)  
trnL intrón loop P6

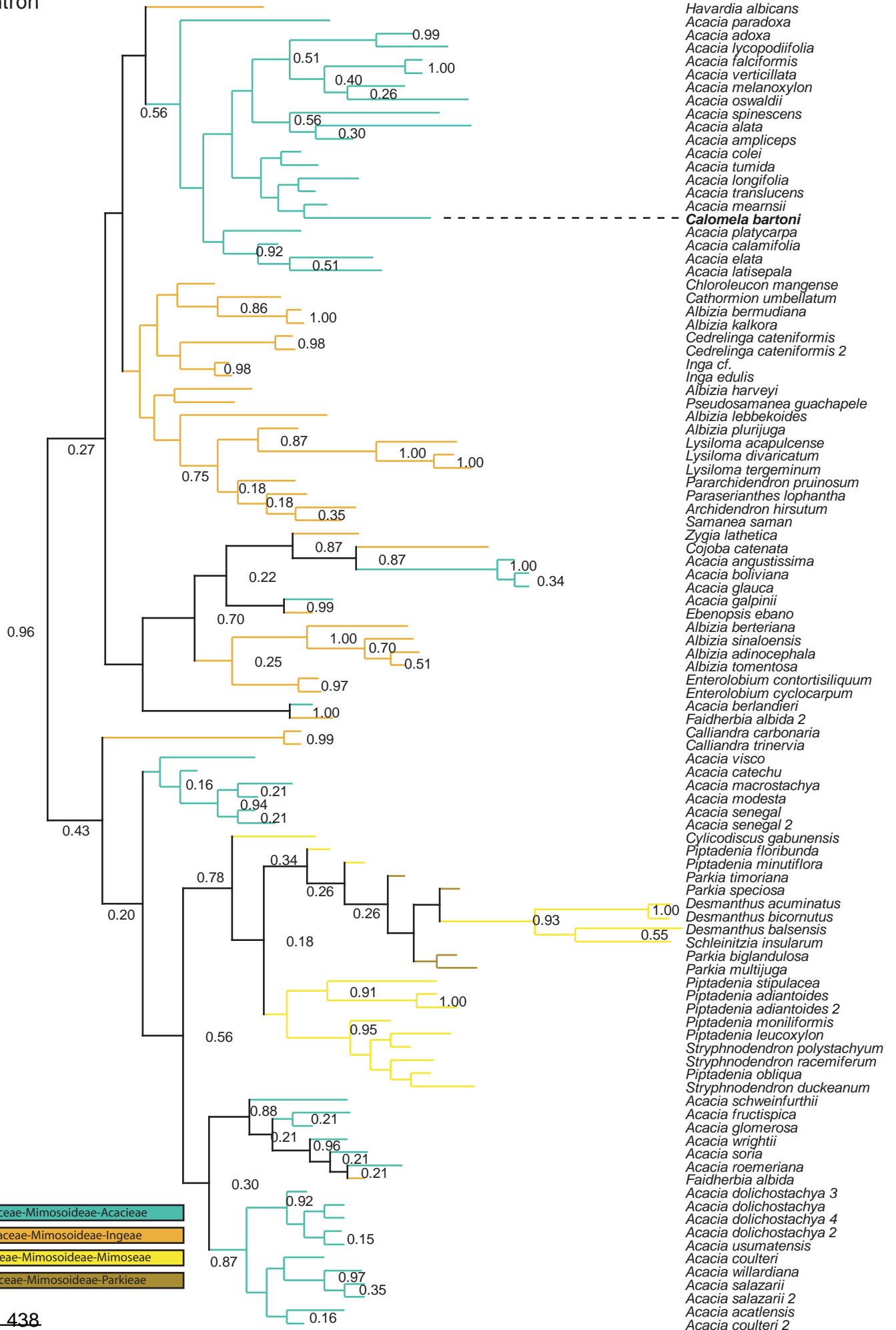


*Callidemum limbatum* (Baly, 1875)  
trnL intrón

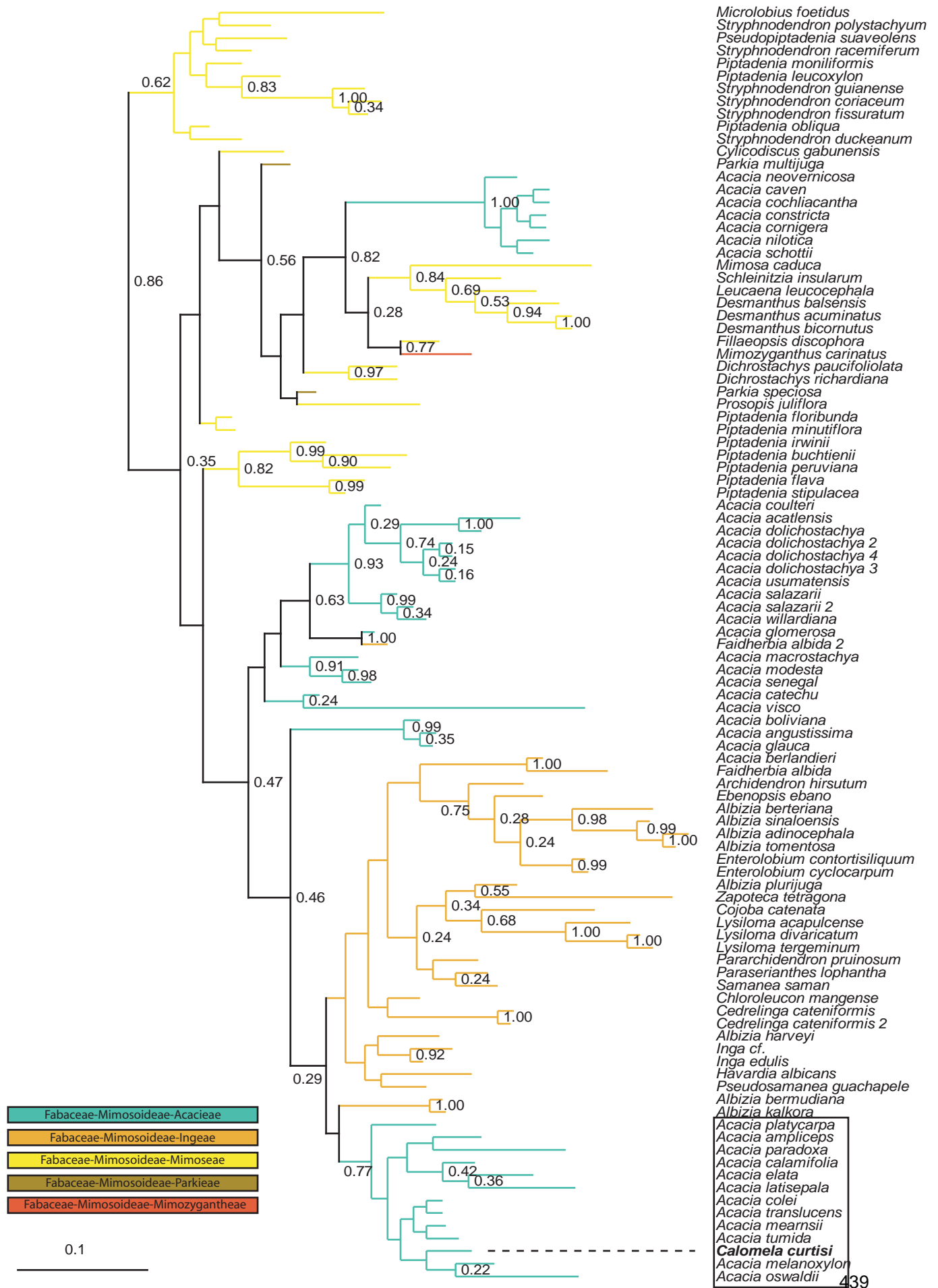


*Calomela bartoni* (Baly, 1856)

*trnL* intrón



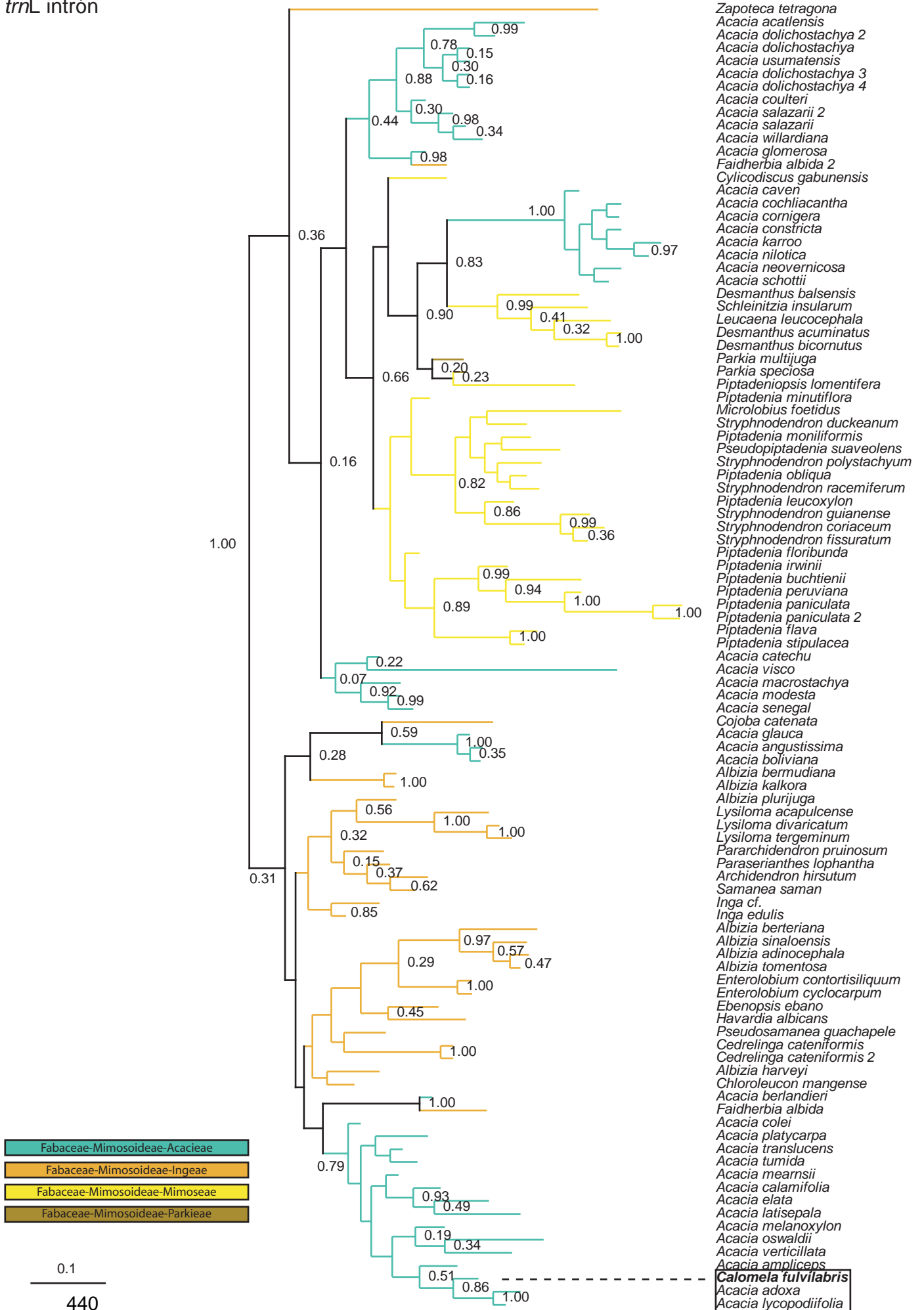
*Calomela curtisi* (Kirby, 1818)  
trnL intrón





*Calomela fulvilabris* (Germar, 1848)

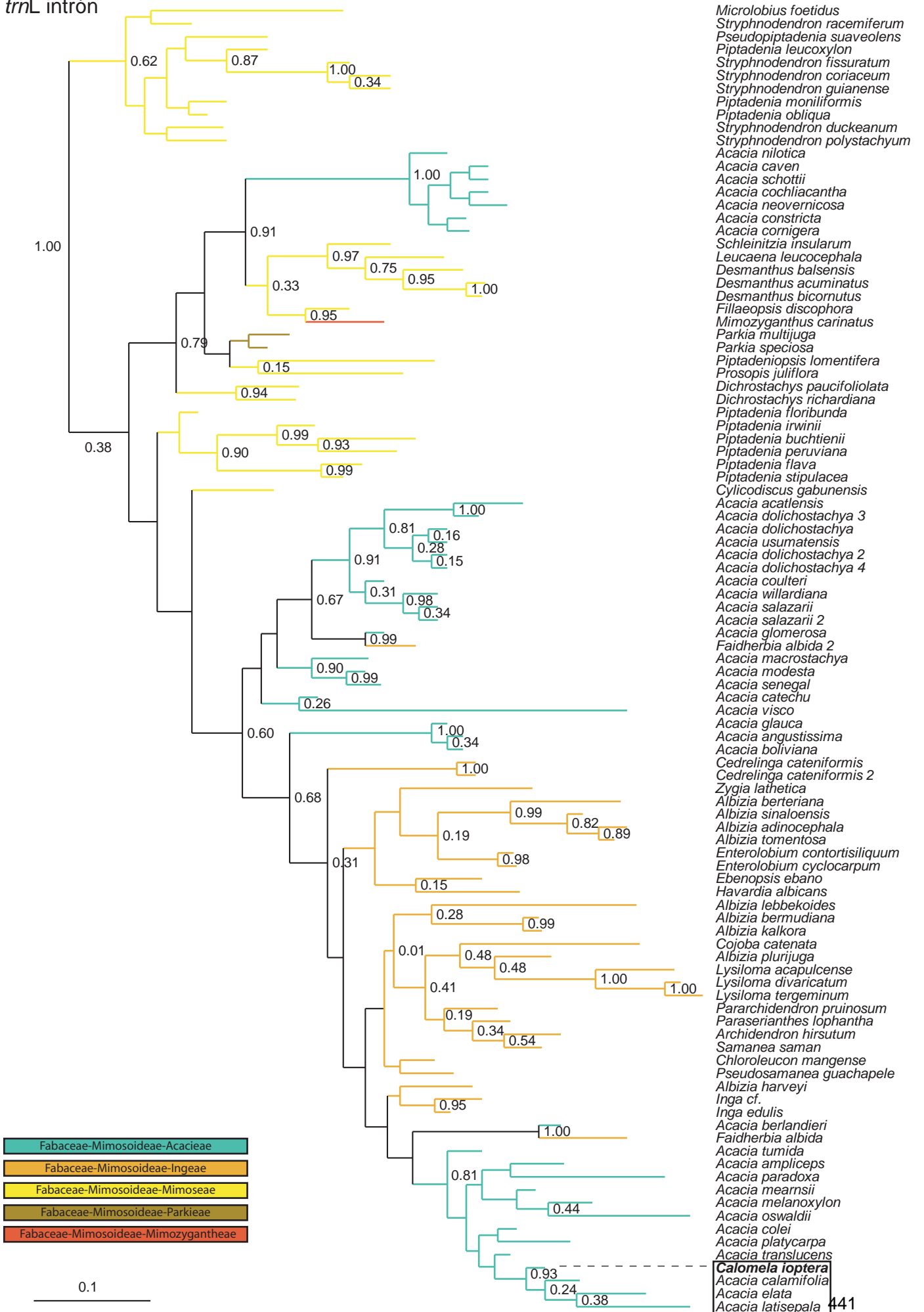
*trnL* intrón



0.1

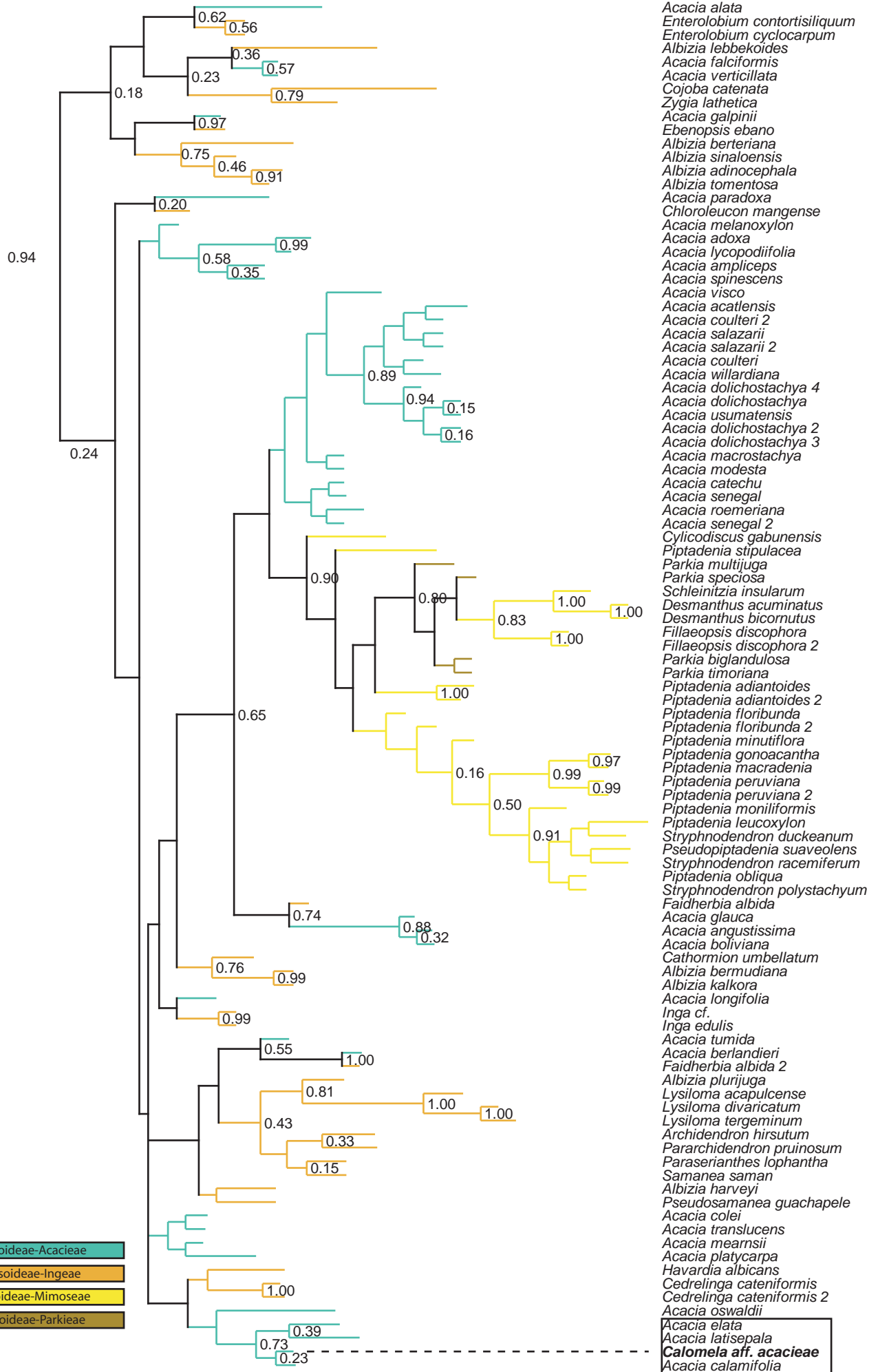
*Calomela ioptera* (Baly, 1856)

trnL intrón



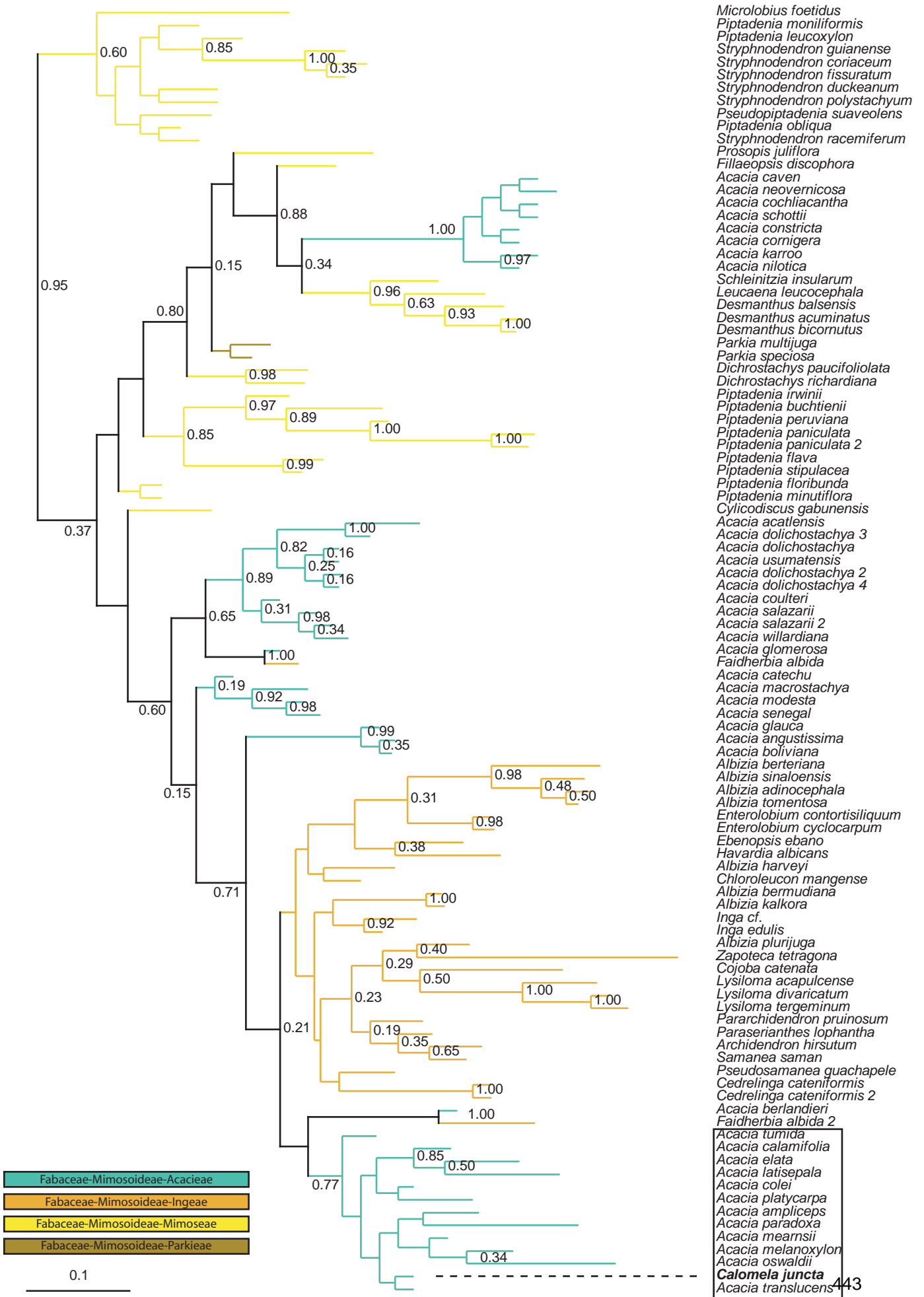
*Calomela aff. acaciae* (Lea, 1916) (JAJ130)

*trnL* intrón

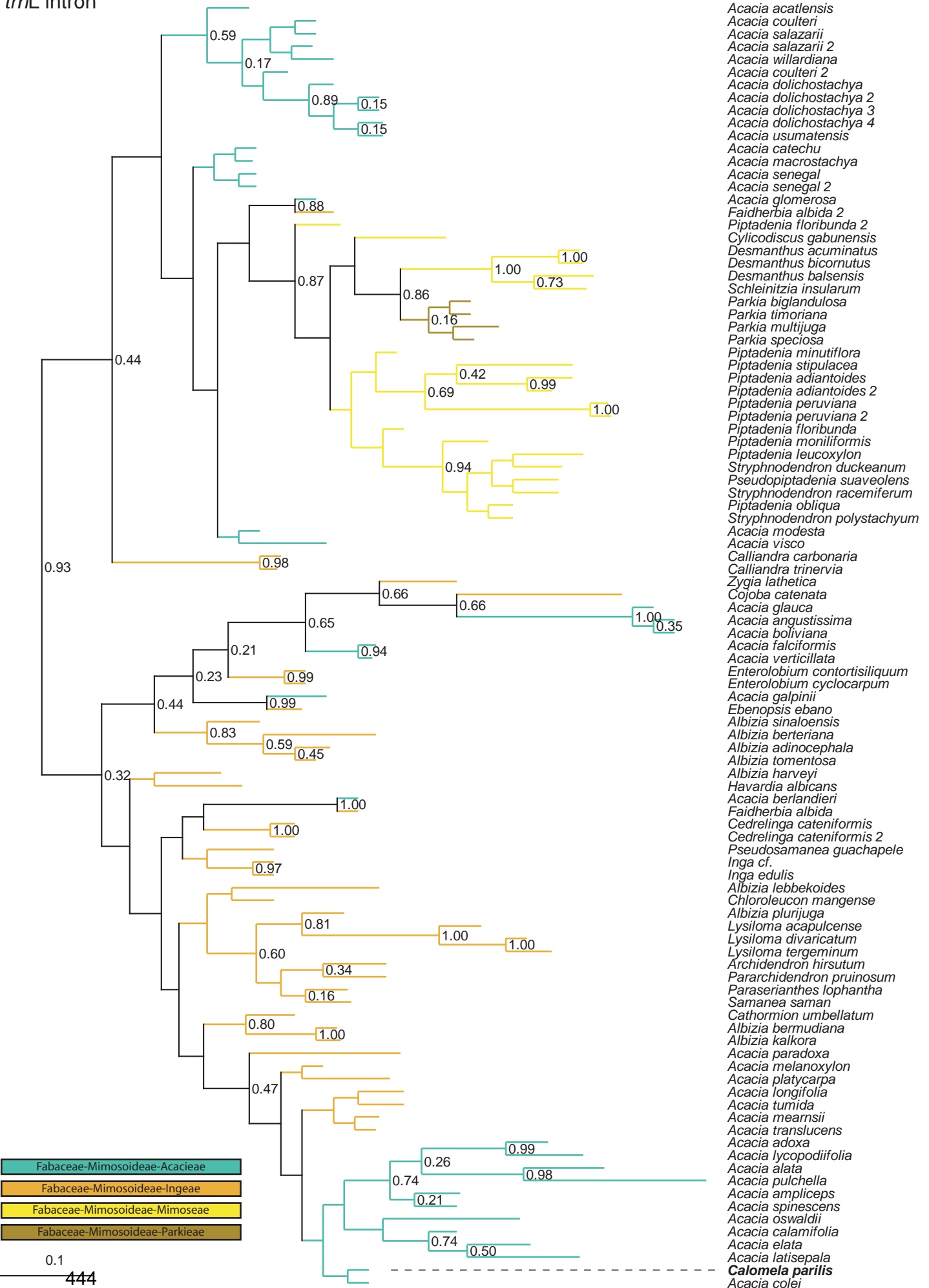


- Fabaceae-Mimosoideae-Acaciae
- Fabaceae-Mimosoideae-Ingae
- Fabaceae-Mimosoideae-Mimoseae
- Fabaceae-Mimosoideae-Parkieae

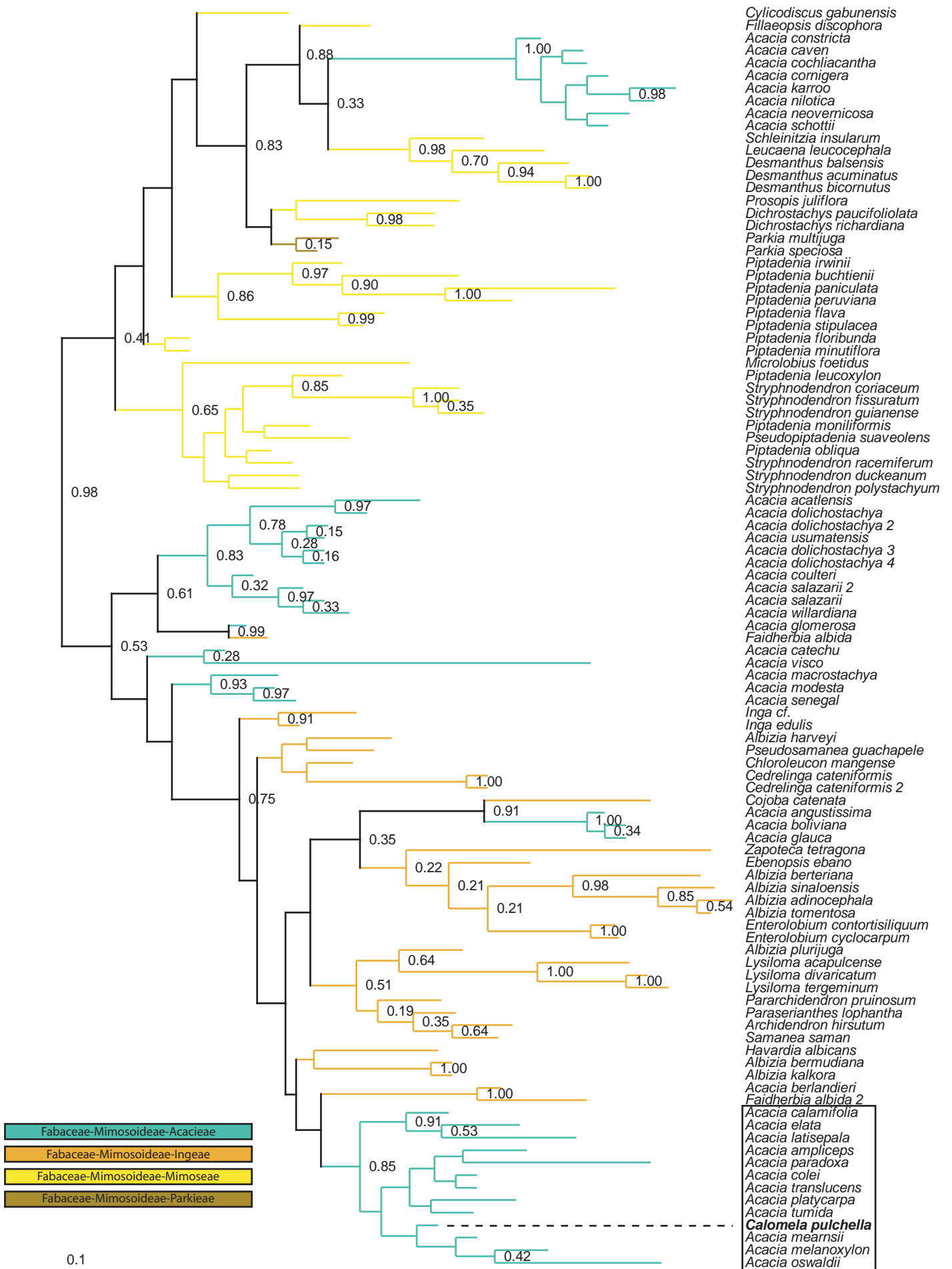
*Calomela juncta* Lea, 1903  
trnL intrón



*Calomela parilis* Lea, 1903  
trnL intrón

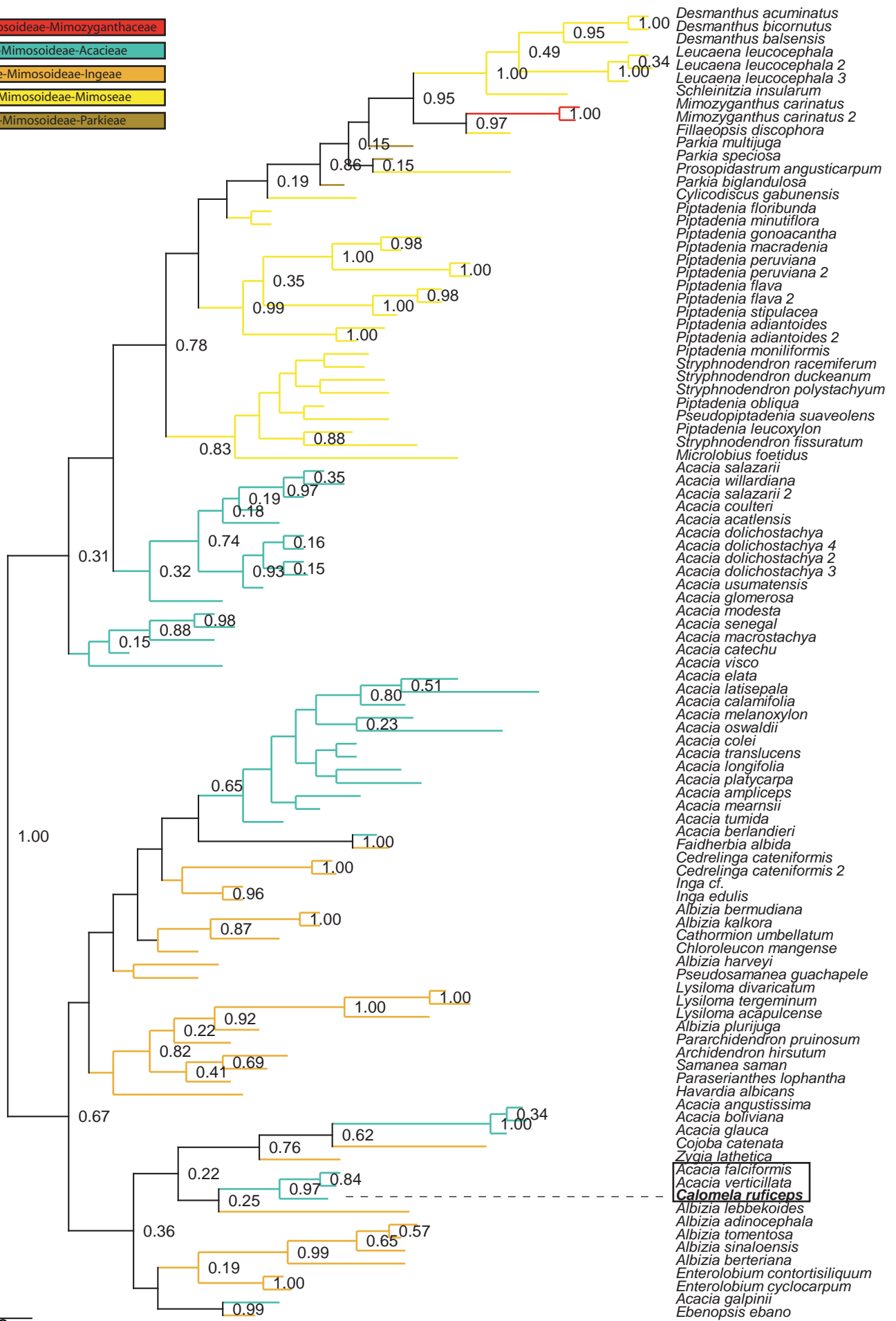


*Calomela pulchella* (Baly, 1856)  
trnL intrón

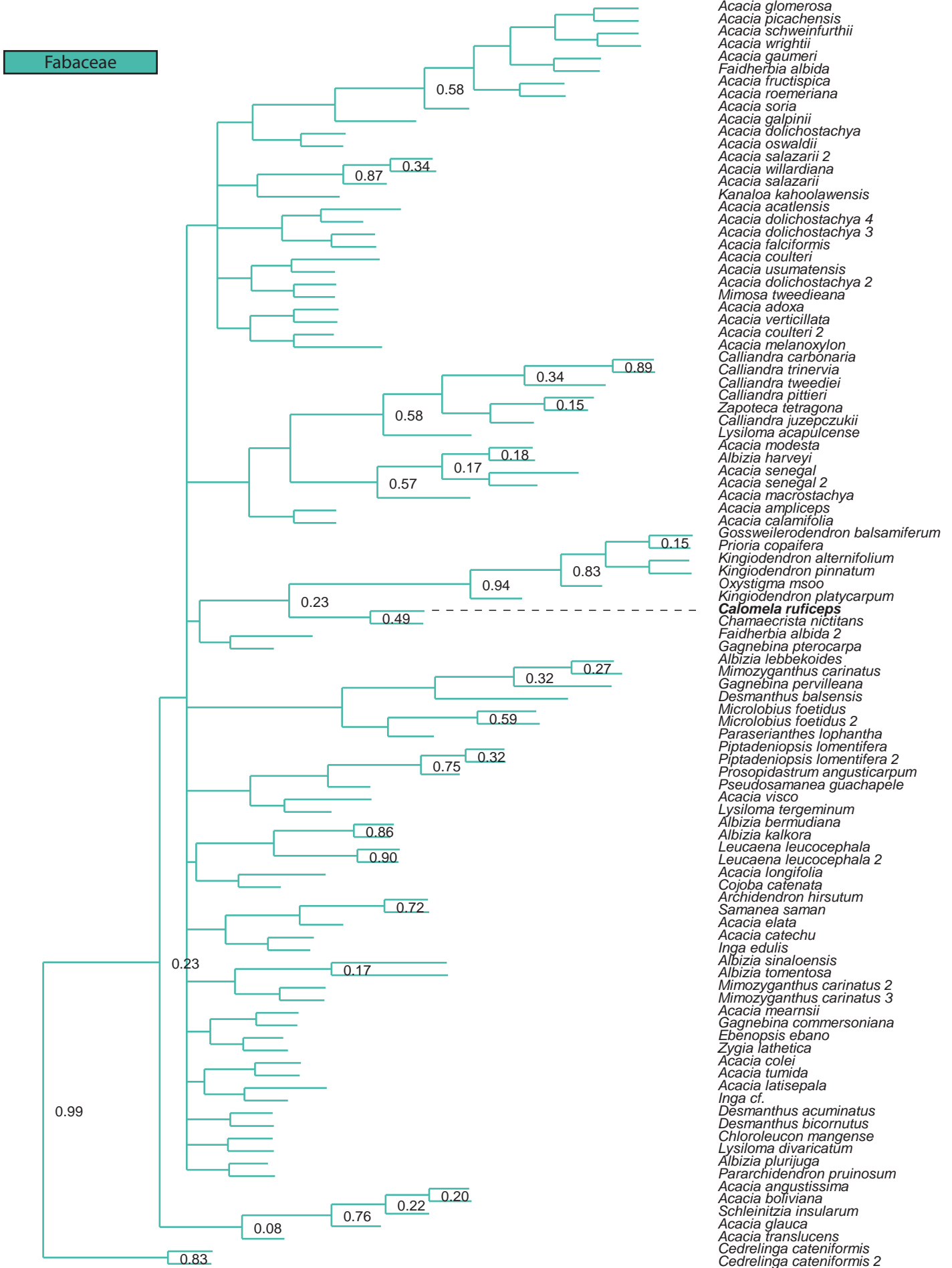


*Calomela ruficeps* (Boisduval, 1835)  
trnL intrón

- Fabaceae-Mimosoideae-Mimozyanthaceae
- Fabaceae-Mimosoideae-Acaciae
- Fabaceae-Mimosoideae-Ingeae
- Fabaceae-Mimosoideae-Mimoseae
- Fabaceae-Mimosoideae-Parkieae



*Calomela ruficeps* (Boisduval, 1835)  
trnL intrón loop P6

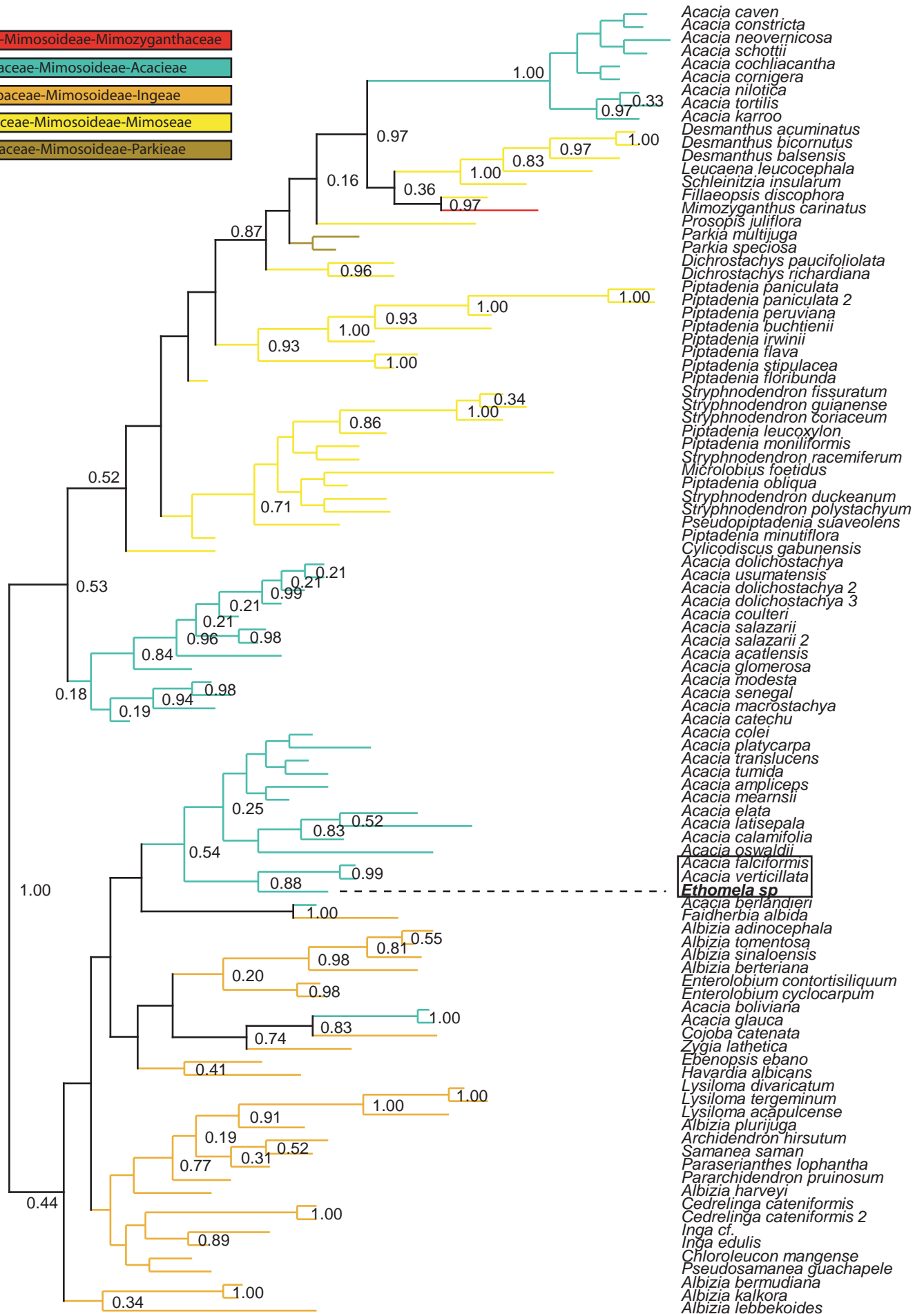






*Ethomela* sp (JAJ63)  
trnL intrón

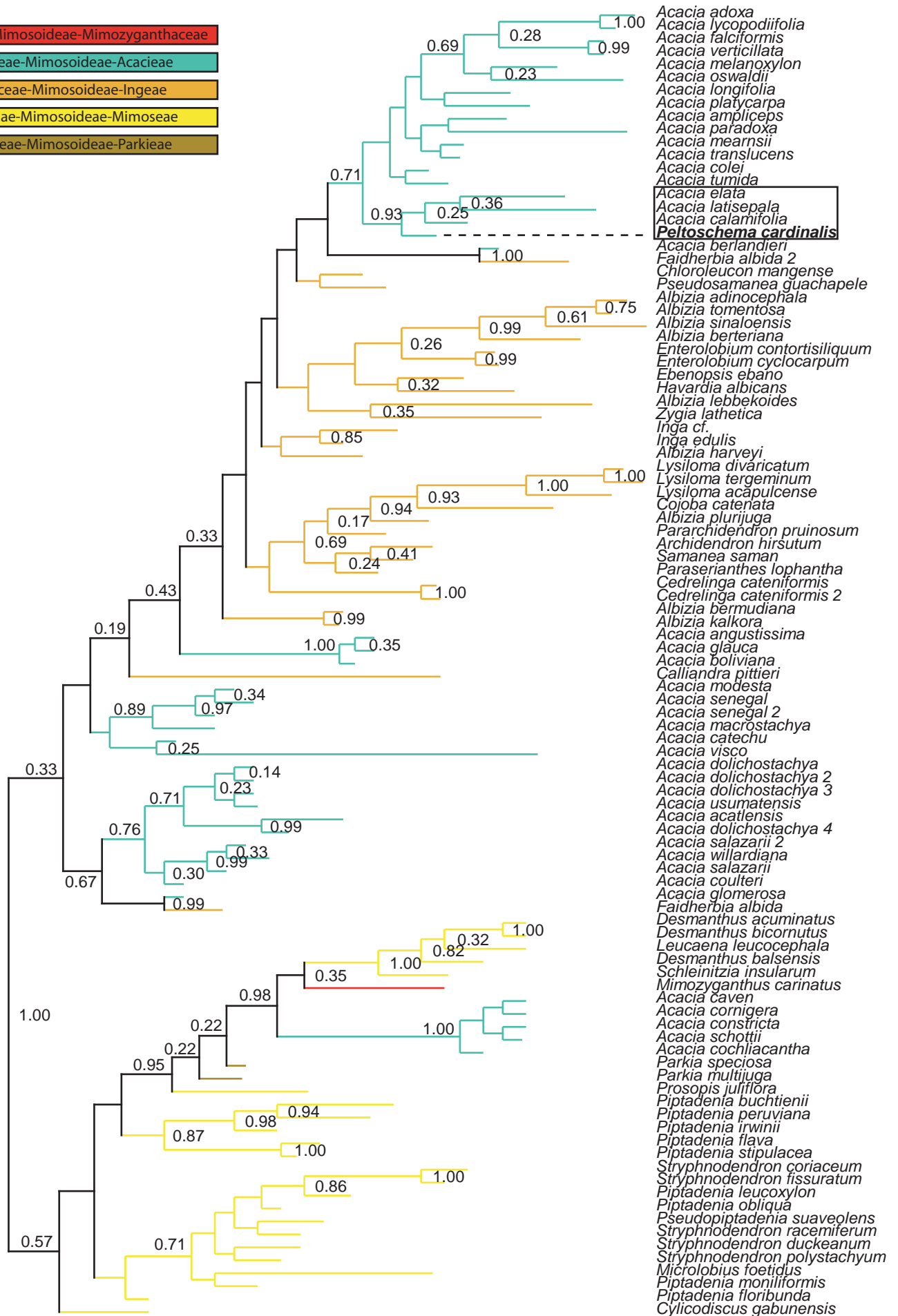
- Fabaceae-Mimosoideae-Mimozyanthaceae
- Fabaceae-Mimosoideae-Acacieae
- Fabaceae-Mimosoideae-Ingeae
- Fabaceae-Mimosoideae-Mimoseae
- Fabaceae-Mimosoideae-Parkieae



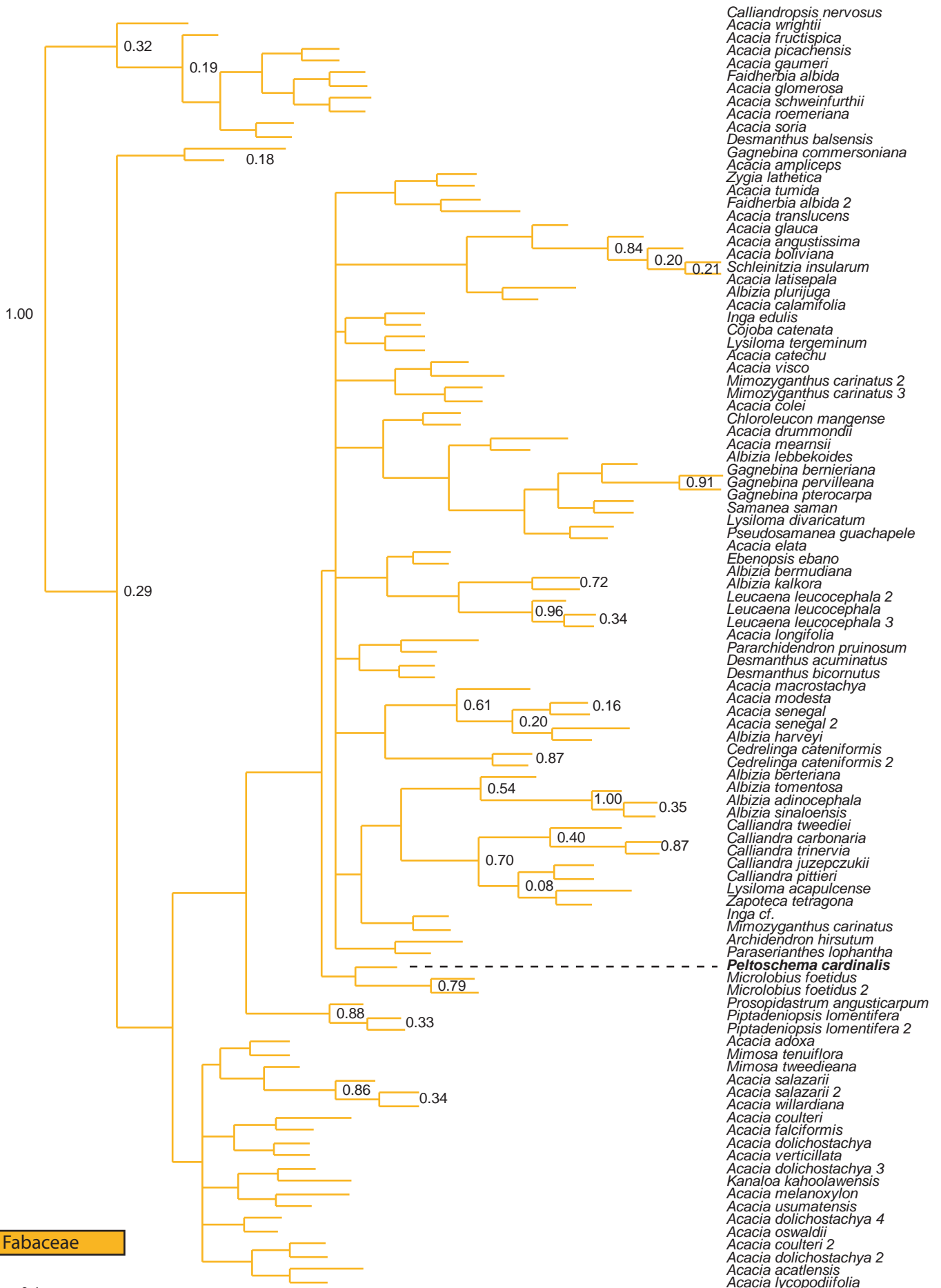
- Acacia caven
- Acacia constricta
- Acacia neovernicosa
- Acacia schottii
- Acacia cochliacantha
- Acacia cornigera
- Acacia nilotica
- Acacia tortilis
- Acacia karroo
- Desmanthus acuminatus
- Desmanthus bicornutus
- Desmanthus balsensis
- Leucaena leucocephala
- Schleinitzia insularum
- Fillaeopsis discophora
- Mimozyanthus carinatus
- Prosopis juliflora
- Parkia multijuga
- Parkia speciosa
- Dichrostachys paucifoliolata
- Dichrostachys richardiana
- Piptadenia paniculata
- Piptadenia paniculata 2
- Piptadenia peruviana
- Piptadenia buchtienii
- Piptadenia irwinii
- Piptadenia flava
- Piptadenia stipulacea
- Piptadenia floribunda
- Stryphnodendron fissuratum
- Stryphnodendron guianense
- Stryphnodendron coriaceum
- Piptadenia leucoxylon
- Piptadenia moniliformis
- Stryphnodendron racemiferum
- Microlobius foetidus
- Piptadenia obliqua
- Stryphnodendron duckeanum
- Stryphnodendron polystachyum
- Pseudopiptadenia suaveolens
- Piptadenia minutiflora
- Cylicodiscus gabunensis
- Acacia dolichostachya
- Acacia usumatensis
- Acacia dolichostachya 2
- Acacia dolichostachya 3
- Acacia coulteri
- Acacia salazarii
- Acacia salazarii 2
- Acacia acatlensis
- Acacia glomerata
- Acacia modesta
- Acacia senegal
- Acacia macrostachya
- Acacia catechu
- Acacia coleii
- Acacia platycarpa
- Acacia translucens
- Acacia tumida
- Acacia ampliceps
- Acacia mearnsii
- Acacia elata
- Acacia latisejala
- Acacia calamifolia
- Acacia oswaldii
- Acacia falciformis
- Acacia verticillata
- Ethomela sp**
- Acacia berlandieri
- Faidherbia albida
- Albizia adinocephala
- Albizia tomentosa
- Albizia sinaloensis
- Albizia berteriana
- Enterolobium contortisiliquum
- Enterolobium cyclocarpum
- Acacia boliviana
- Acacia glauca
- Cojoba catenata
- Zygia lathetica
- Ebenopsis ebano
- Havardia albicans
- Lysiloma divaricatum
- Lysiloma tergeminum
- Lysiloma acapulcense
- Albizia plurijuga
- Archidendron hirsutum
- Samanea saman
- Paraserianthes lophantha
- Pararchidendron pruinosum
- Albizia harveyi
- Cedrelinga cateniformis
- Cedrelinga cateniformis 2
- Inga cf.
- Inga edulis
- Chloroleucon mangense
- Pseudosamanea guachapele
- Albizia bermudiana
- Albizia kalkora
- Albizia lebbekoides

*Peltoschema cardinalis* (Lea, 1924)  
trnL intrón

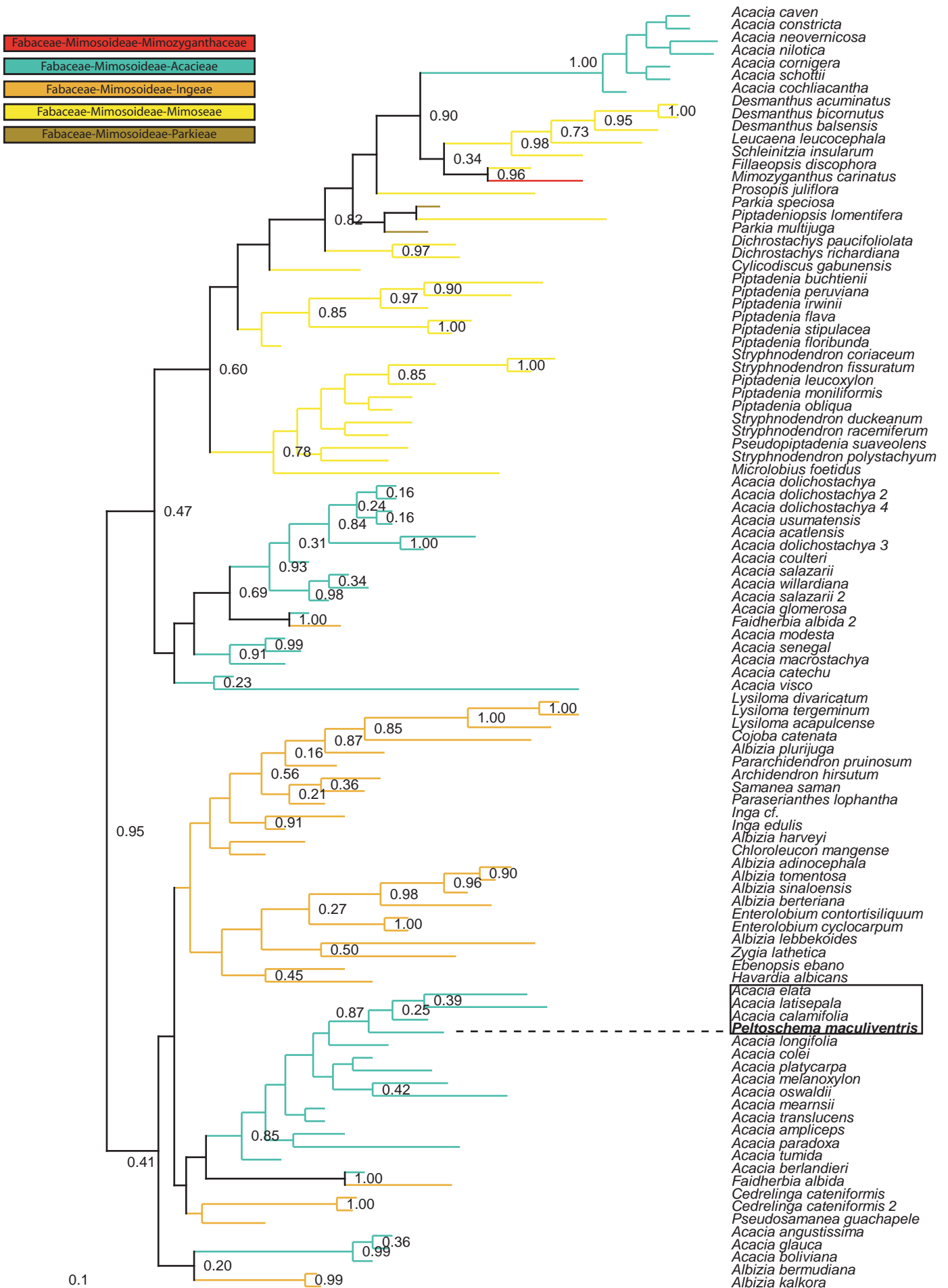
- Fabaceae-Mimosoideae-Mimozgyanthaceae
- Fabaceae-Mimosoideae-Acacieae
- Fabaceae-Mimosoideae-Ingeae
- Fabaceae-Mimosoideae-Mimoseae
- Fabaceae-Mimosoideae-Parkieae



*Peltoschema cardinalis* (Lea, 1924)  
trnL intrón loop P6



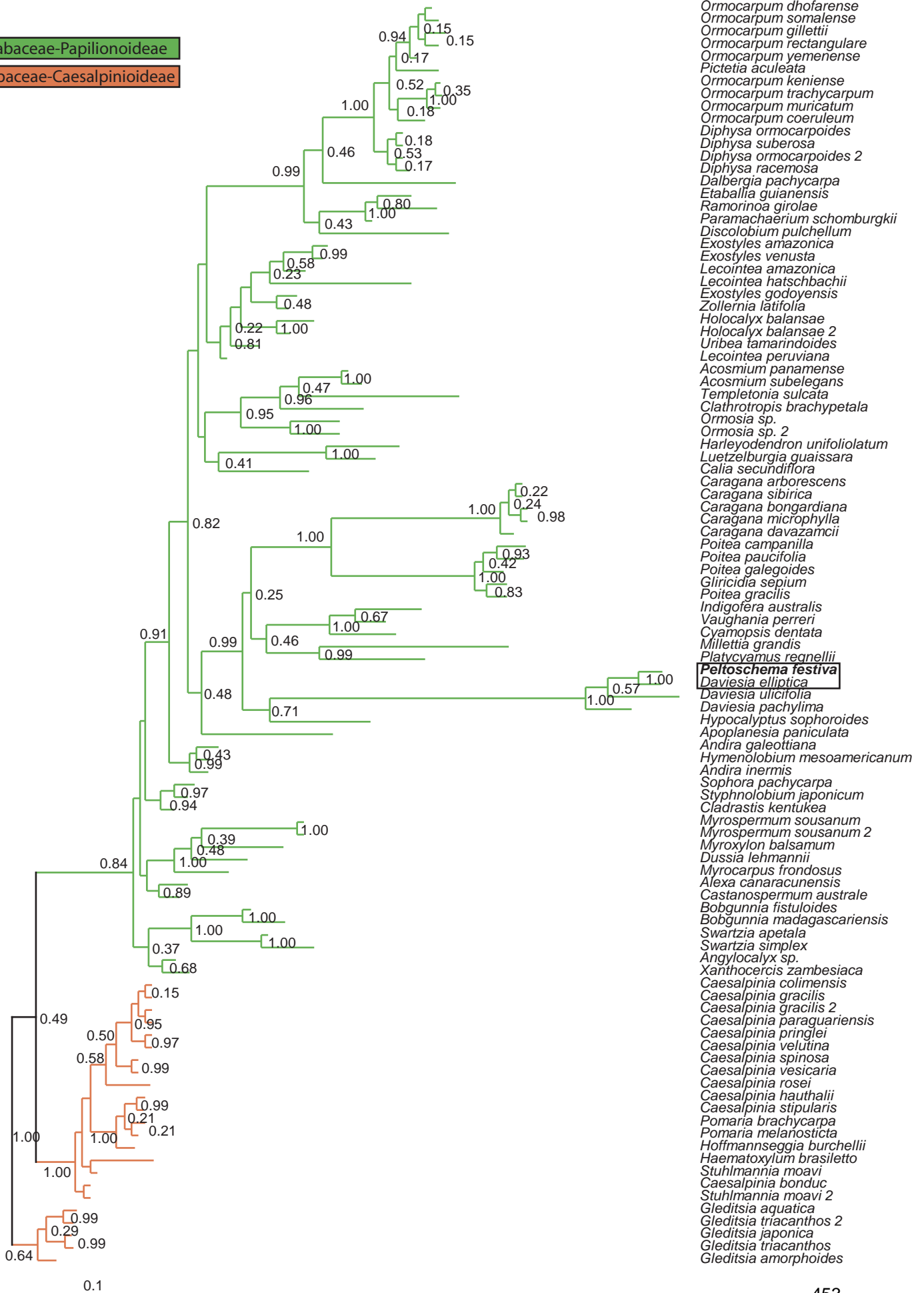
*Peltoschema maculiventris* (Lea, 1924)  
trnL intrón



*Peltoschema festiva* (Chapuis, 1877)

*trnL* intrón

Fabaceae-Papilionoideae  
 Fabaceae-Caesalpinioideae



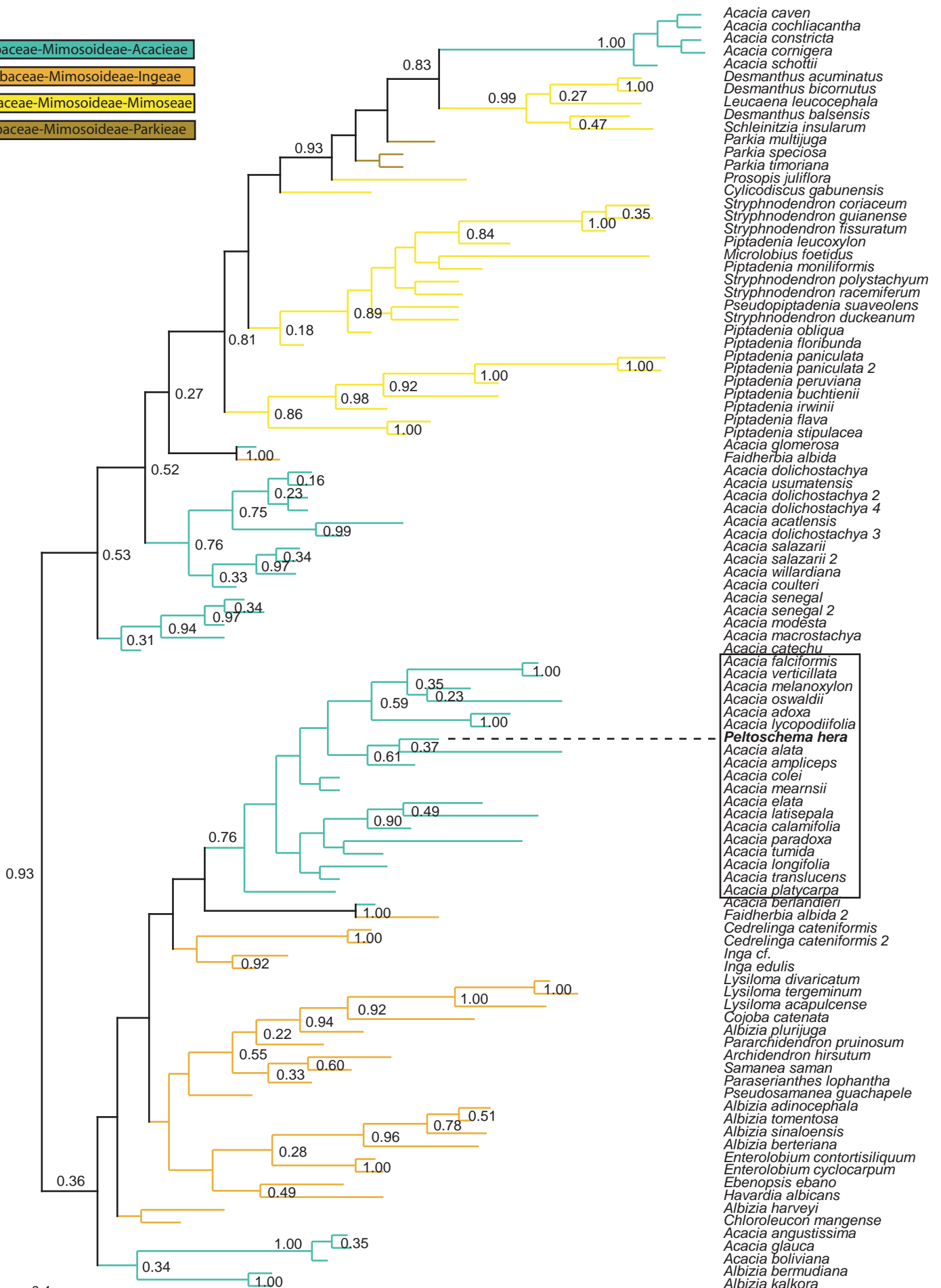
*Peltoschema hera* (Stål, 1860)  
trnL intrón

Fabaceae-Mimosoideae-Acacieae

Fabaceae-Mimosoideae-Ingeae

Fabaceae-Mimosoideae-Mimoseae

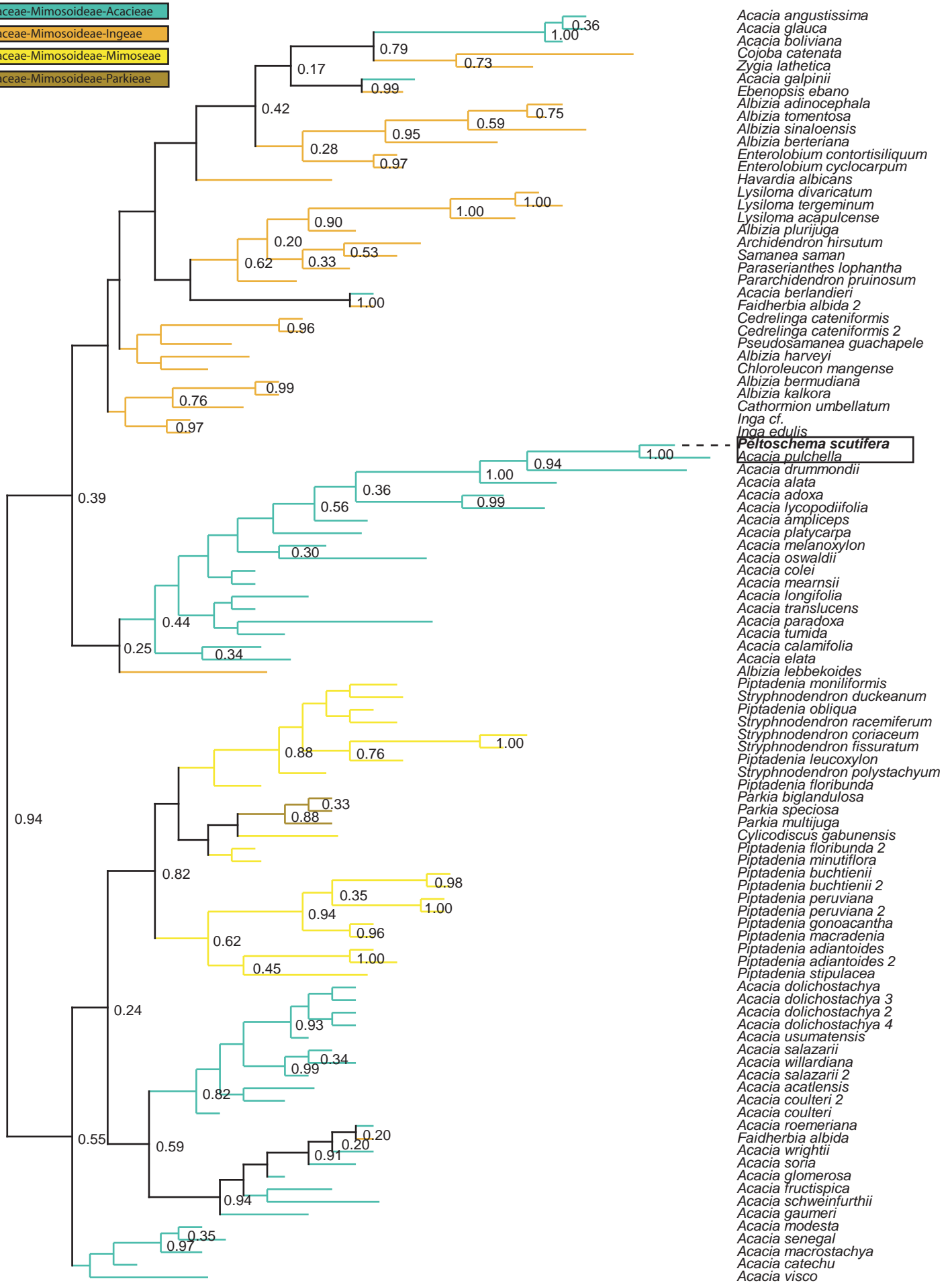
Fabaceae-Mimosoideae-Parkieae



- Acacia caven*
- Acacia cochliacantha*
- Acacia constricta*
- Acacia cornigera*
- Acacia schottii*
- Desmanthus acuminatus*
- Desmanthus bicornutus*
- Leucaena leucocephala*
- Desmanthus balsensis*
- Schleinitzia insularum*
- Parkia multijuga*
- Parkia speciosa*
- Parkia timoriana*
- Prosopis juliflora*
- Cylicodiscus gabunensis*
- Stryphnodendron coriaceum*
- Stryphnodendron guianense*
- Stryphnodendron fissuratum*
- Piptadenia leucoxylon*
- Microlobius foetidus*
- Piptadenia moniliformis*
- Stryphnodendron polystachyum*
- Stryphnodendron racemiferum*
- Pseudopiptadenia suaveolens*
- Stryphnodendron ducleanum*
- Piptadenia obliqua*
- Piptadenia floribunda*
- Piptadenia paniculata*
- Piptadenia paniculata 2*
- Piptadenia peruviana*
- Piptadenia buchtienii*
- Piptadenia irwinii*
- Piptadenia flava*
- Piptadenia stipulacea*
- Acacia glomerosa*
- Faidherbia albida*
- Acacia dolichostachya*
- Acacia usumatensis*
- Acacia dolichostachya 2*
- Acacia dolichostachya 4*
- Acacia acatlensis*
- Acacia dolichostachya 3*
- Acacia salazarii*
- Acacia salazarii 2*
- Acacia willardiana*
- Acacia coulteri*
- Acacia senegal*
- Acacia senegal 2*
- Acacia modesta*
- Acacia macrostachya*
- Acacia catechu*
- Acacia falciformis*
- Acacia verticillata*
- Acacia melanoxylon*
- Acacia oswaldii*
- Acacia adoxa*
- Acacia lycopodiifolia*
- Peltoschema hera***
- Acacia alata*
- Acacia ampliceps*
- Acacia coleii*
- Acacia mearnsii*
- Acacia elata*
- Acacia latisepala*
- Acacia calamifolia*
- Acacia paradoxa*
- Acacia tumida*
- Acacia longifolia*
- Acacia translucens*
- Acacia platycarpa*
- Acacia berlandieri*
- Faidherbia albida 2*
- Cedrelinga cateniformis*
- Cedrelinga cateniformis 2*
- Inga cf.*
- Inga edulis*
- Lysiloma divaricatum*
- Lysiloma tergeminum*
- Lysiloma acapulcense*
- Cojoba catenata*
- Albizia plurijuga*
- Pararchidendron pruinsum*
- Archidendron hirsutum*
- Samanea saman*
- Paraserianthes lophantha*
- Pseudosamanea guachapele*
- Albizia adinocephala*
- Albizia tomentosa*
- Albizia sinaloensis*
- Albizia berteriana*
- Enterolobium contortisiliquum*
- Enterolobium cyclocarpum*
- Ebenopsis ebano*
- Havardia albicans*
- Albizia harveyi*
- Chloroleucon mangense*
- Acacia angustissima*
- Acacia glauca*
- Acacia boliviana*
- Albizia bermudiana*
- Albizia kalkora*

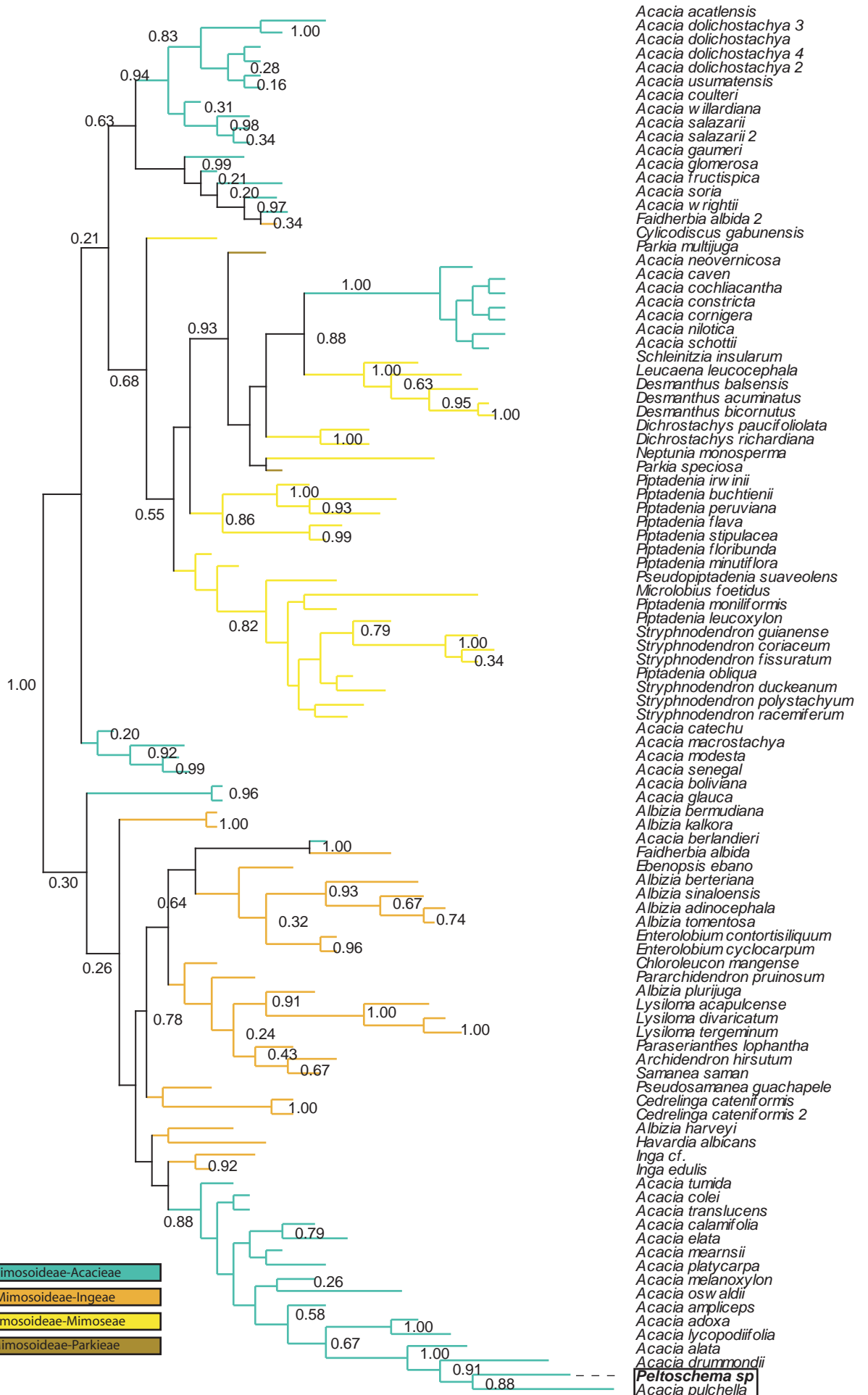
*Peltoschema scutifera* (White, 1841)  
trnL intrón

- Fabaceae-Mimosoideae-Acacieae
- Fabaceae-Mimosoideae-Ingeae
- Fabaceae-Mimosoideae-Mimoseae
- Fabaceae-Mimosoideae-Parkieae





*Peltoschema* sp (JAJ161)  
trnL intrón

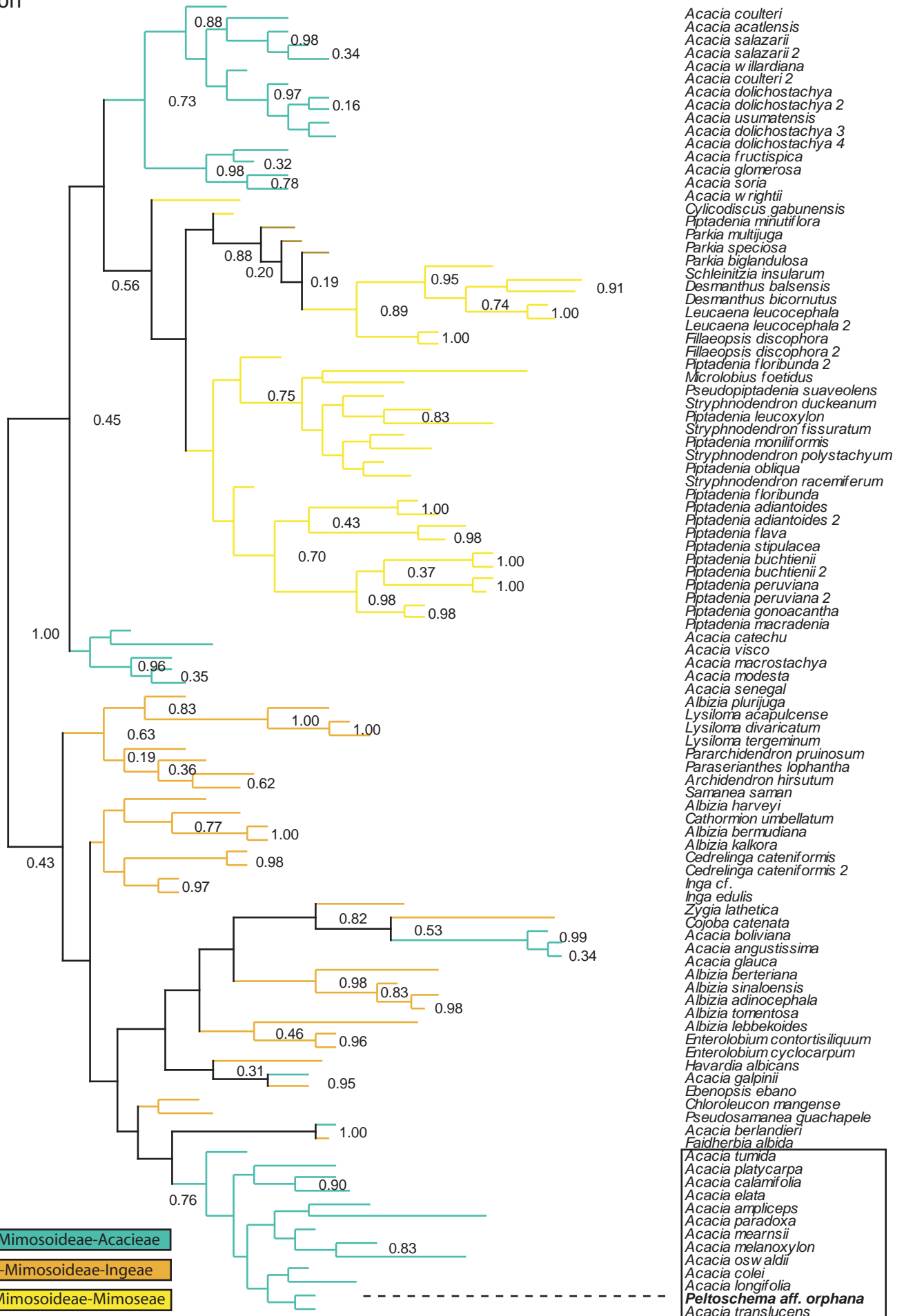


- Fabaceae-Mimosoideae-Acacieae
- Fabaceae-Mimosoideae-Ingeae
- Fabaceae-Mimosoideae-Mimoseae
- Fabaceae-Mimosoideae-Parkieae

0.1

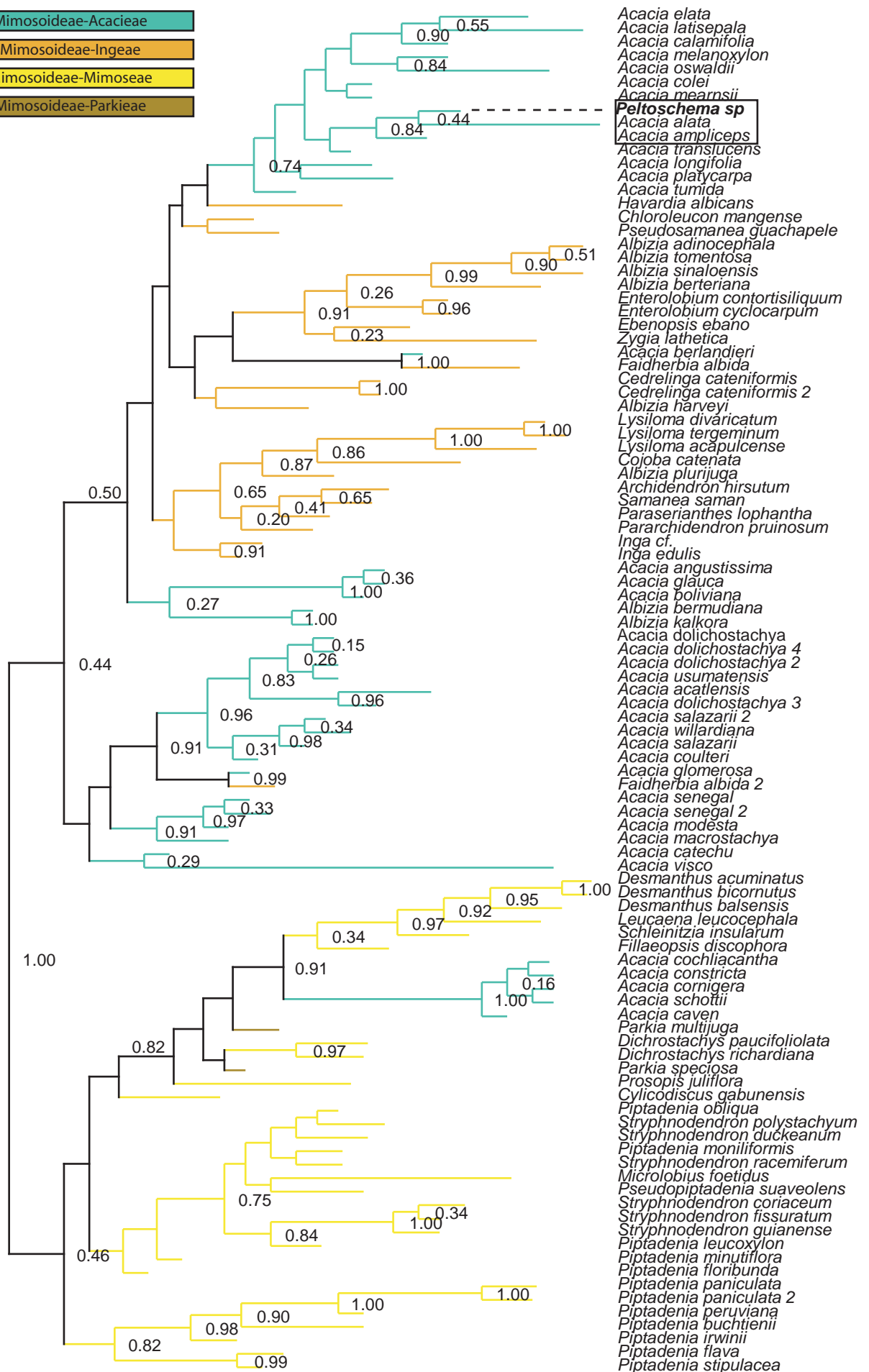
*Peltoschema aff. orphana* (Erichson, 1842) (JAJ154)

trnL intrón



*Peltoschema* sp (JAJ157)  
trnL intrón

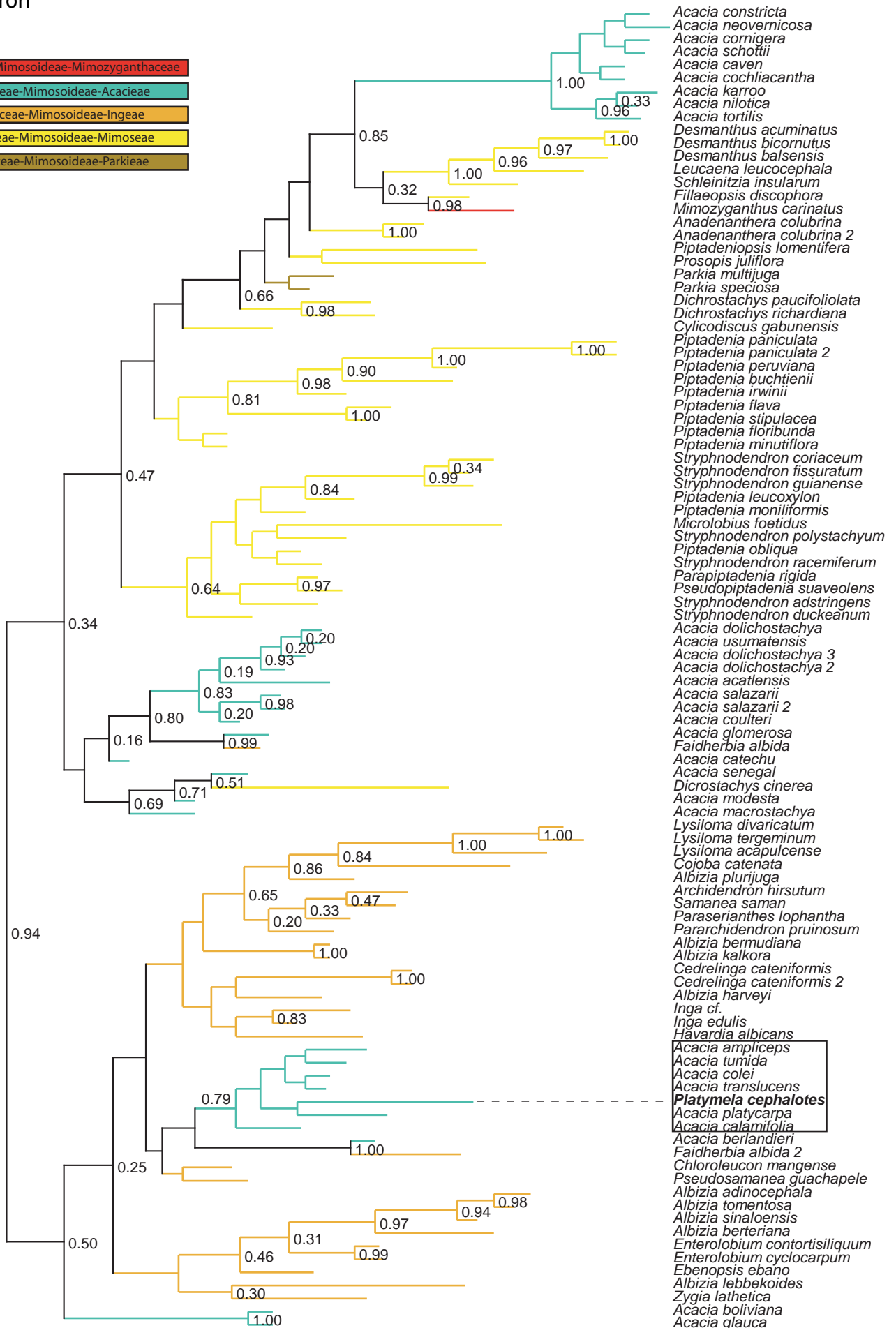
- Fabaceae-Mimosoideae-Acacieae
- Fabaceae-Mimosoideae-Ingeae
- Fabaceae-Mimosoideae-Mimoseae
- Fabaceae-Mimosoideae-Parkieae



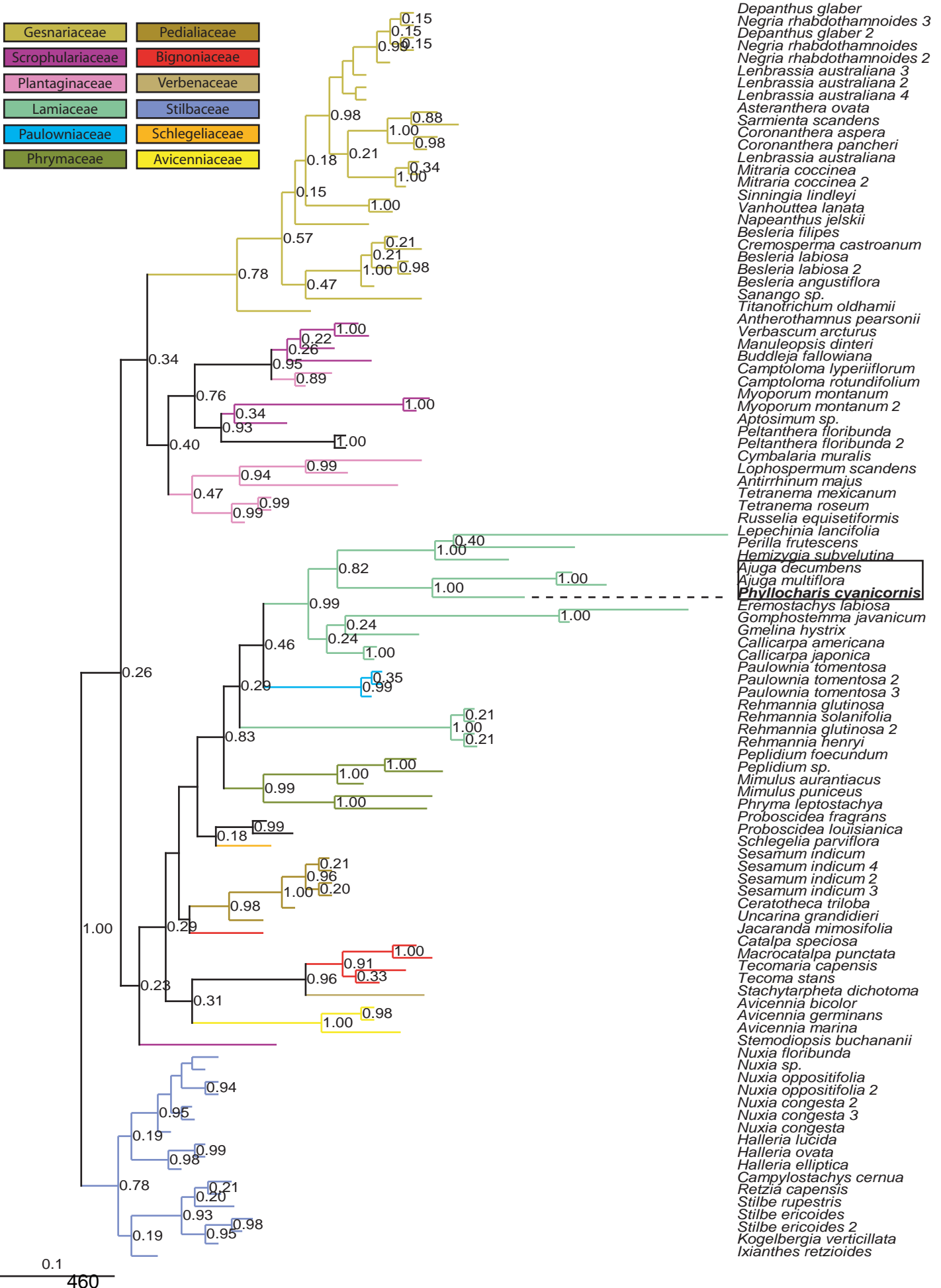
0.1

*Platymela cephalotes* (Lea, 1903)  
trnL intrón

- Fabaceae-Mimosoideae-Mimozganthaceae
- Fabaceae-Mimosoideae-Acacieae
- Fabaceae-Mimosoideae-Ingeae
- Fabaceae-Mimosoideae-Mimoseae
- Fabaceae-Mimosoideae-Parkleae



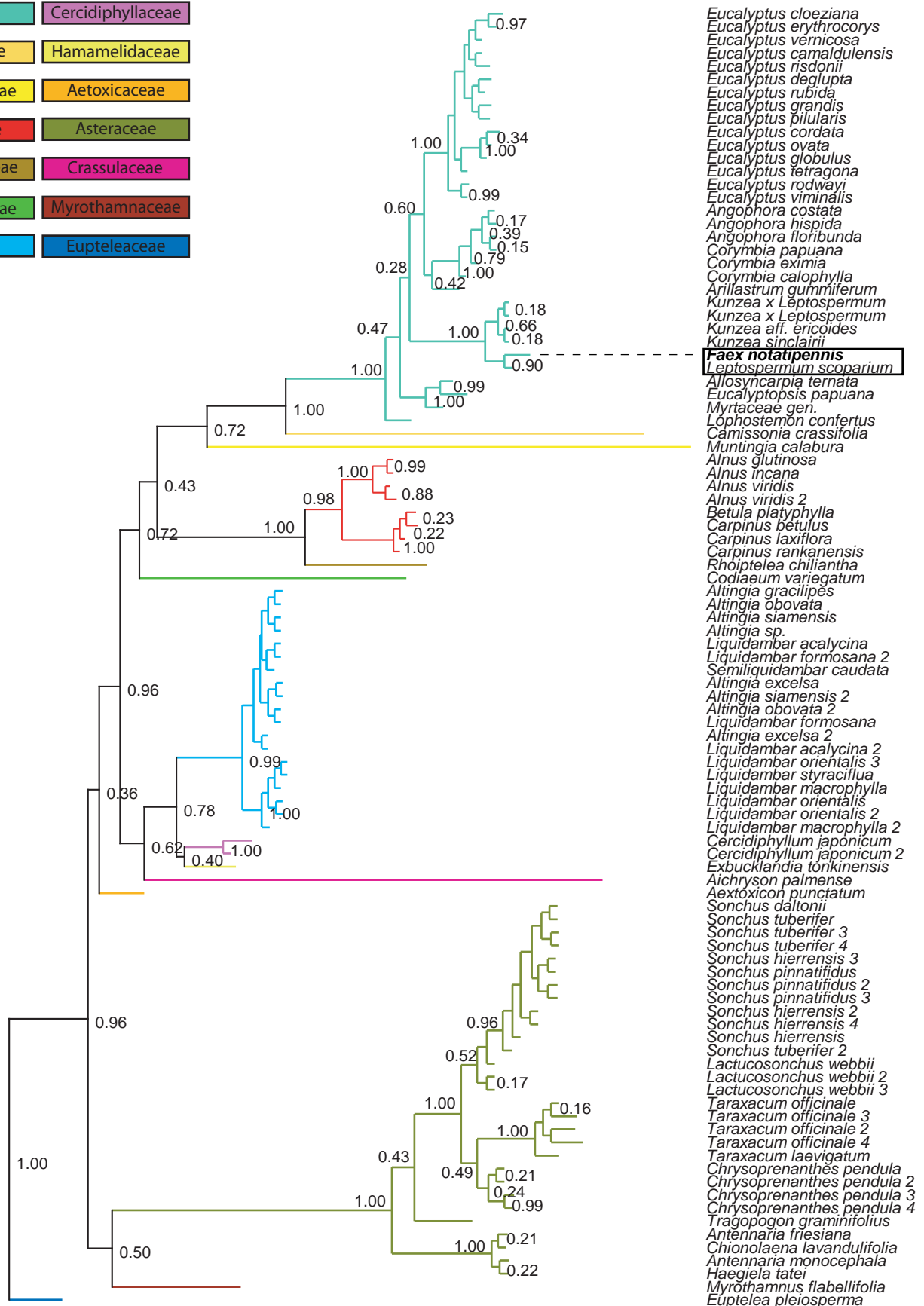
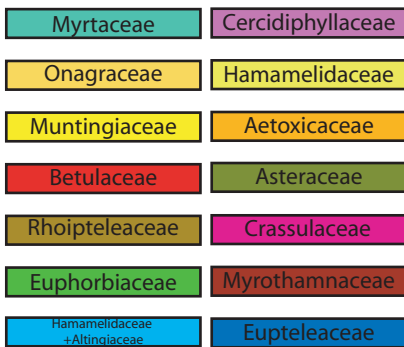
*Phyllocharis cyanicornis* (Fabricius, 1801)  
trnL intrón



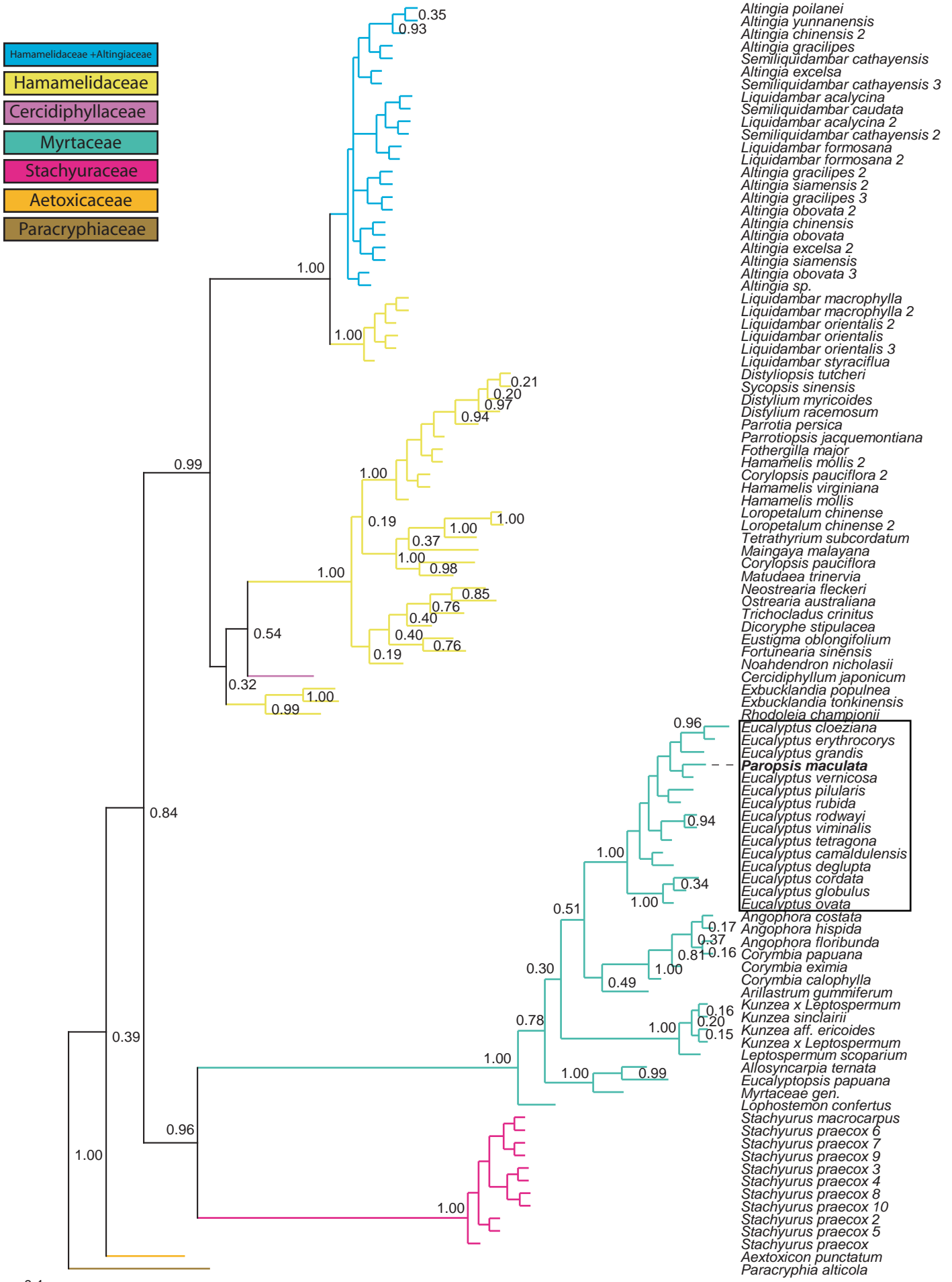
0.1

460

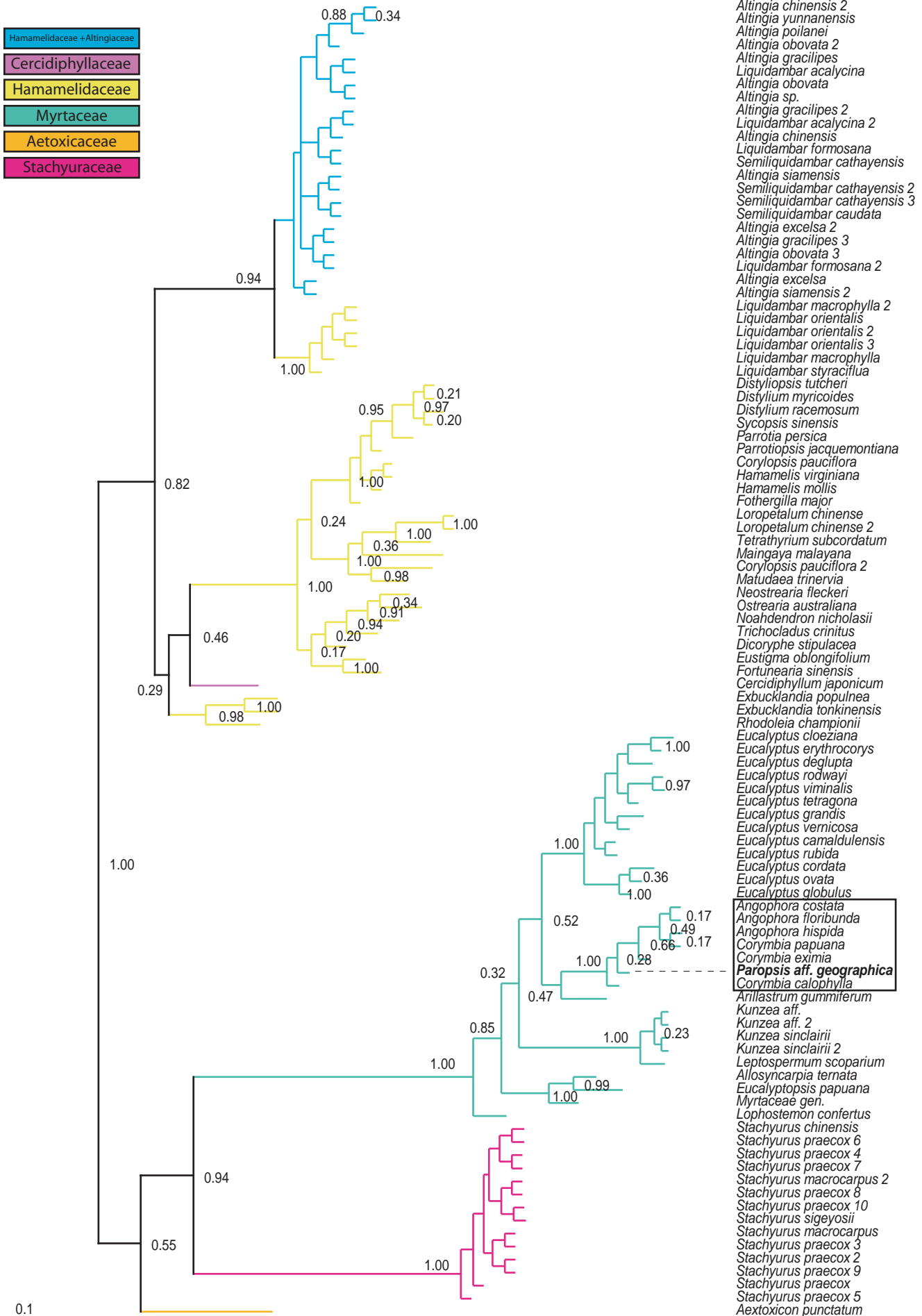
*Faex notatipennis* (Chapuis, 1877)  
trnL intrón



*Paropsis maculata* (Marsham, 1808)  
trnL intrón



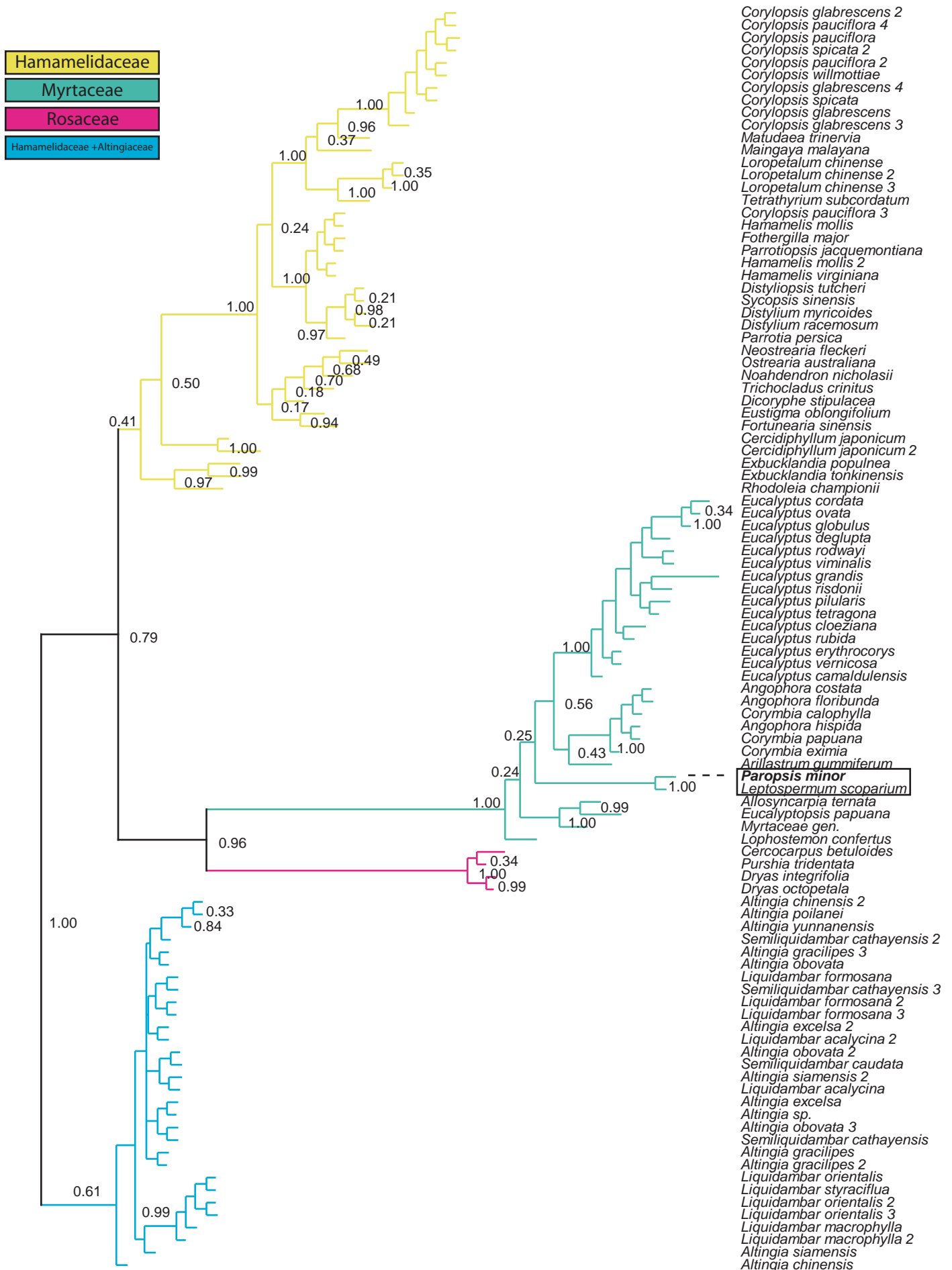
*Paropsis aff. geographica* Baly, 1864 (JAJ138)  
trnL intrón





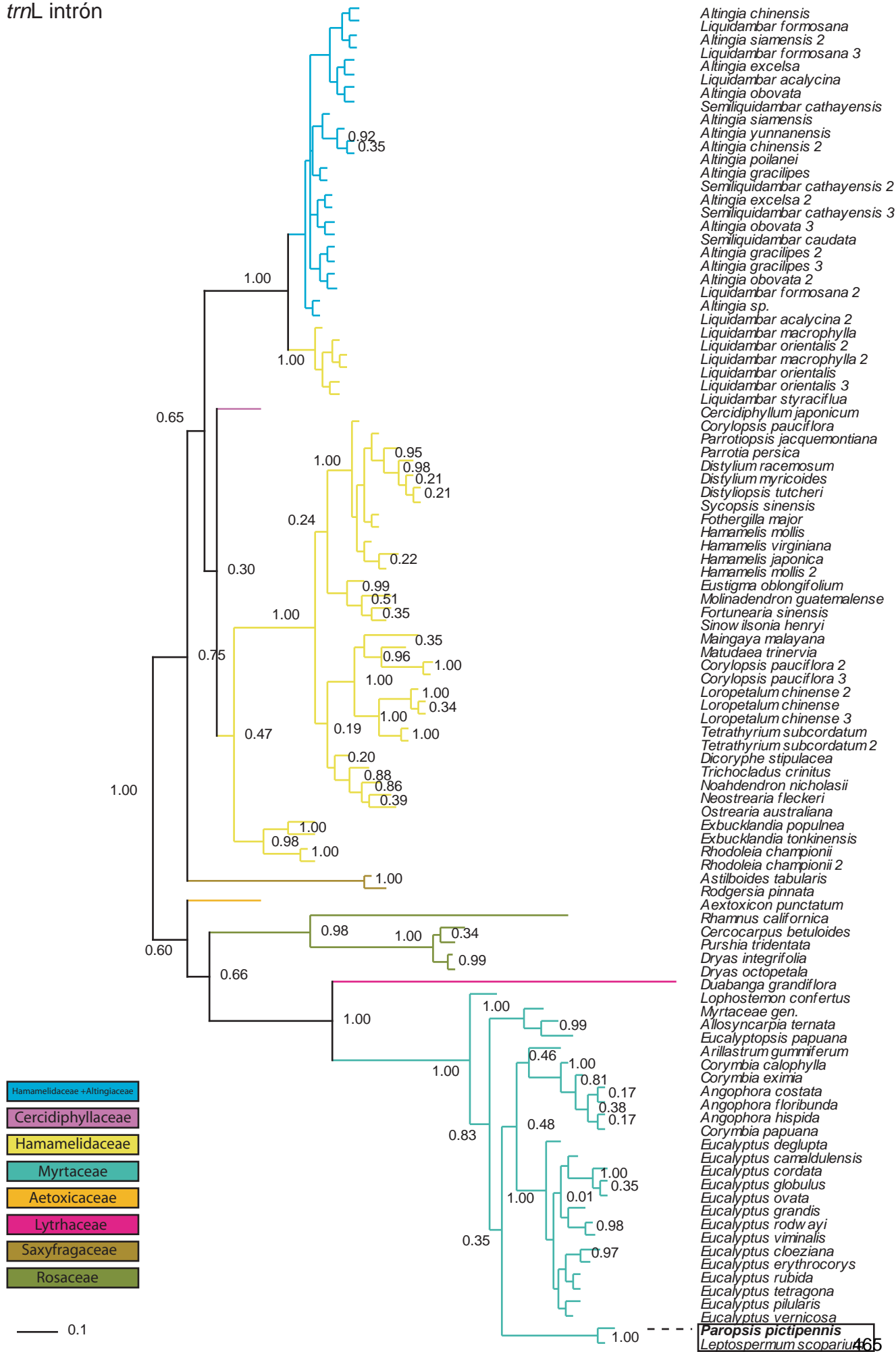
*Paropsis minor* (Marsham, 1808)

*trnL* intrón



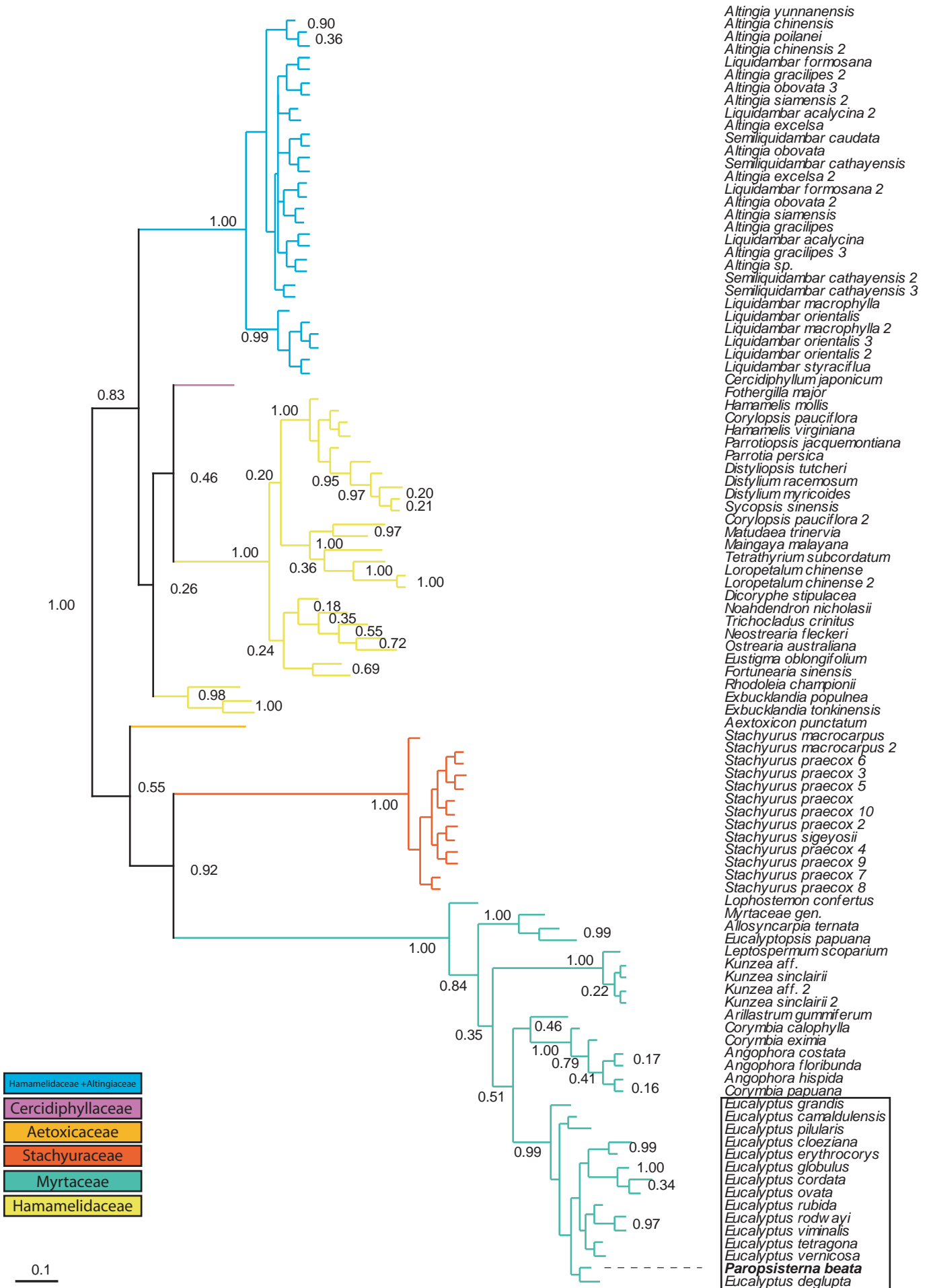
0.1

*Paropsis pictipennis*  
trnL intrón



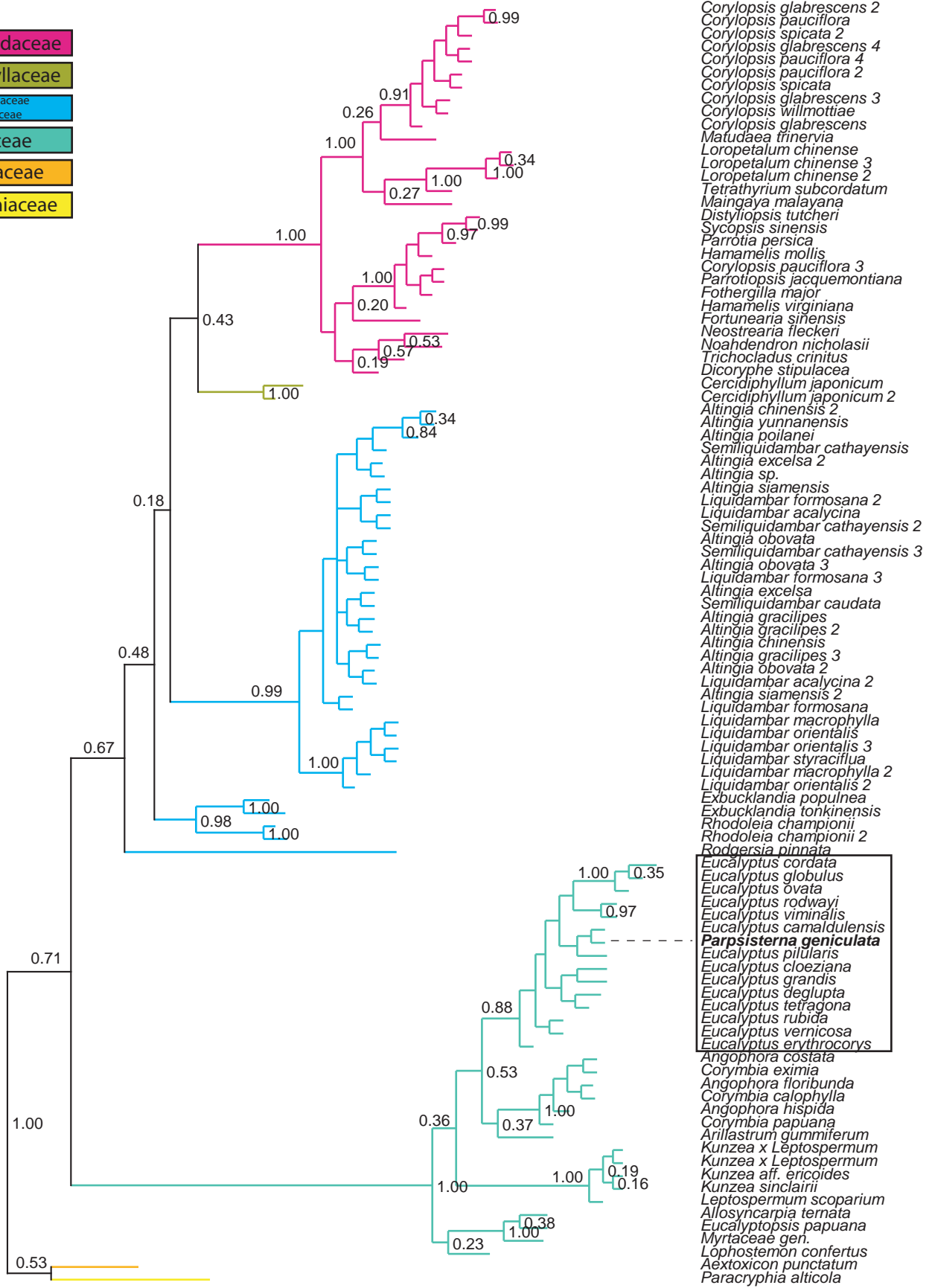
*Paropsis pictipennis*  
*Leptospermum scoparium*

*Paropsisterna beata* (Newman, 1842)  
trnL intrón

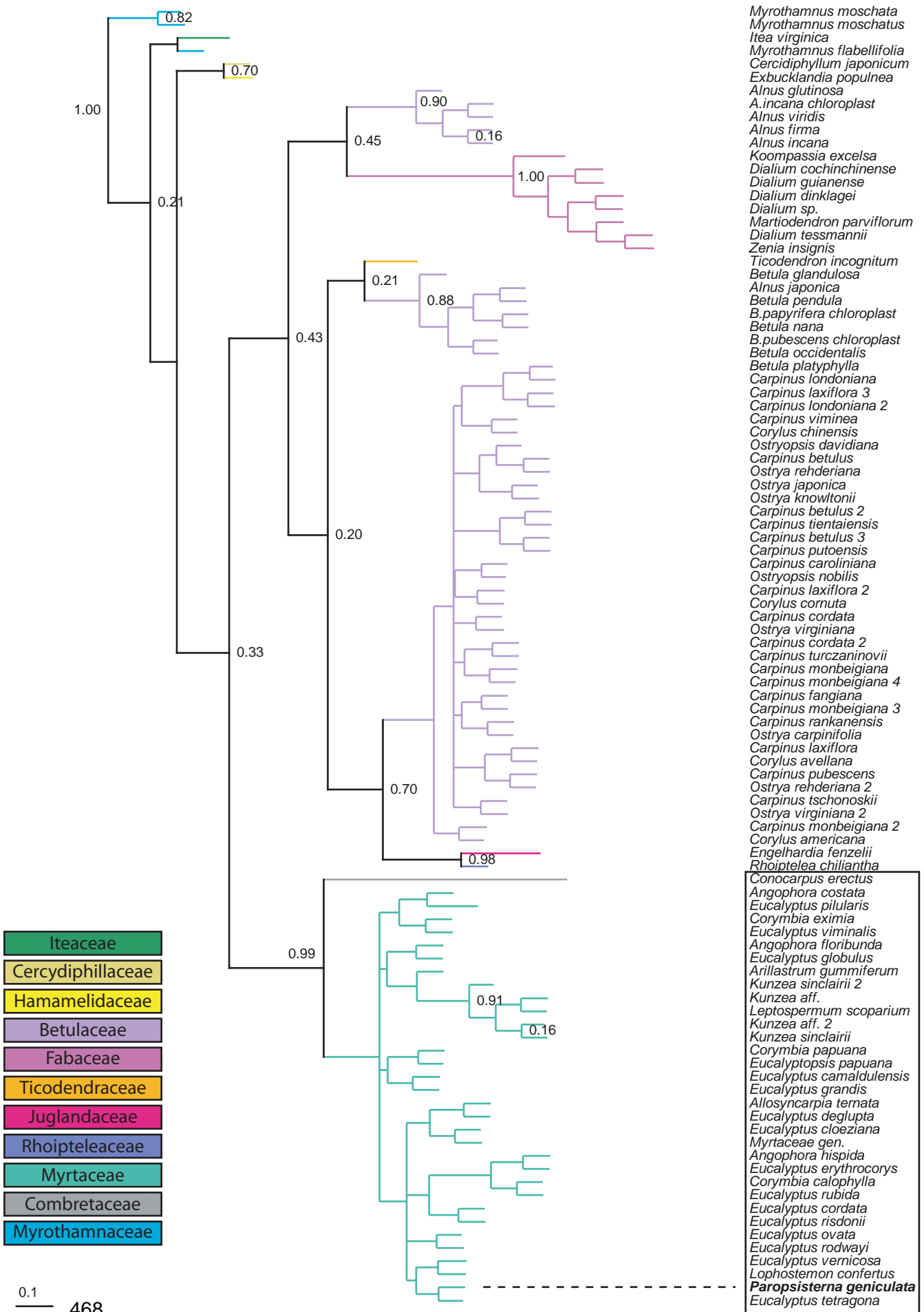


*Paropsisterna geniculata* (Boisduval, 1835)  
trnL intrón

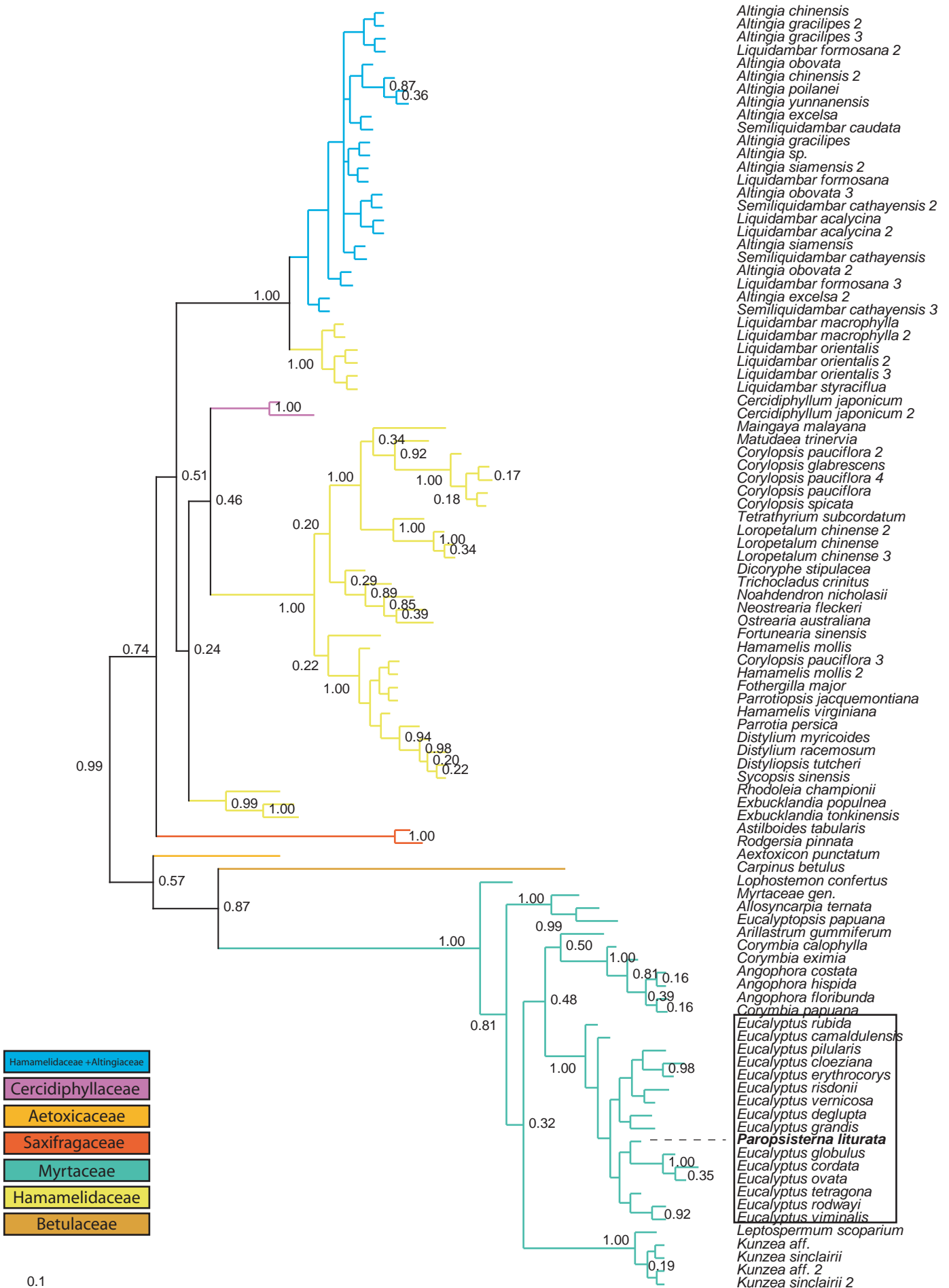
- Hamamelidaceae
- Cercidiphyllaceae
- Hamamelidaceae  
+Altingiaceae
- Myrtaceae
- Aetoxicaceae
- Paracryphiaceae



*Paropsisterna geniculata* (Boisduval, 1835)  
trnL intrón loop P6

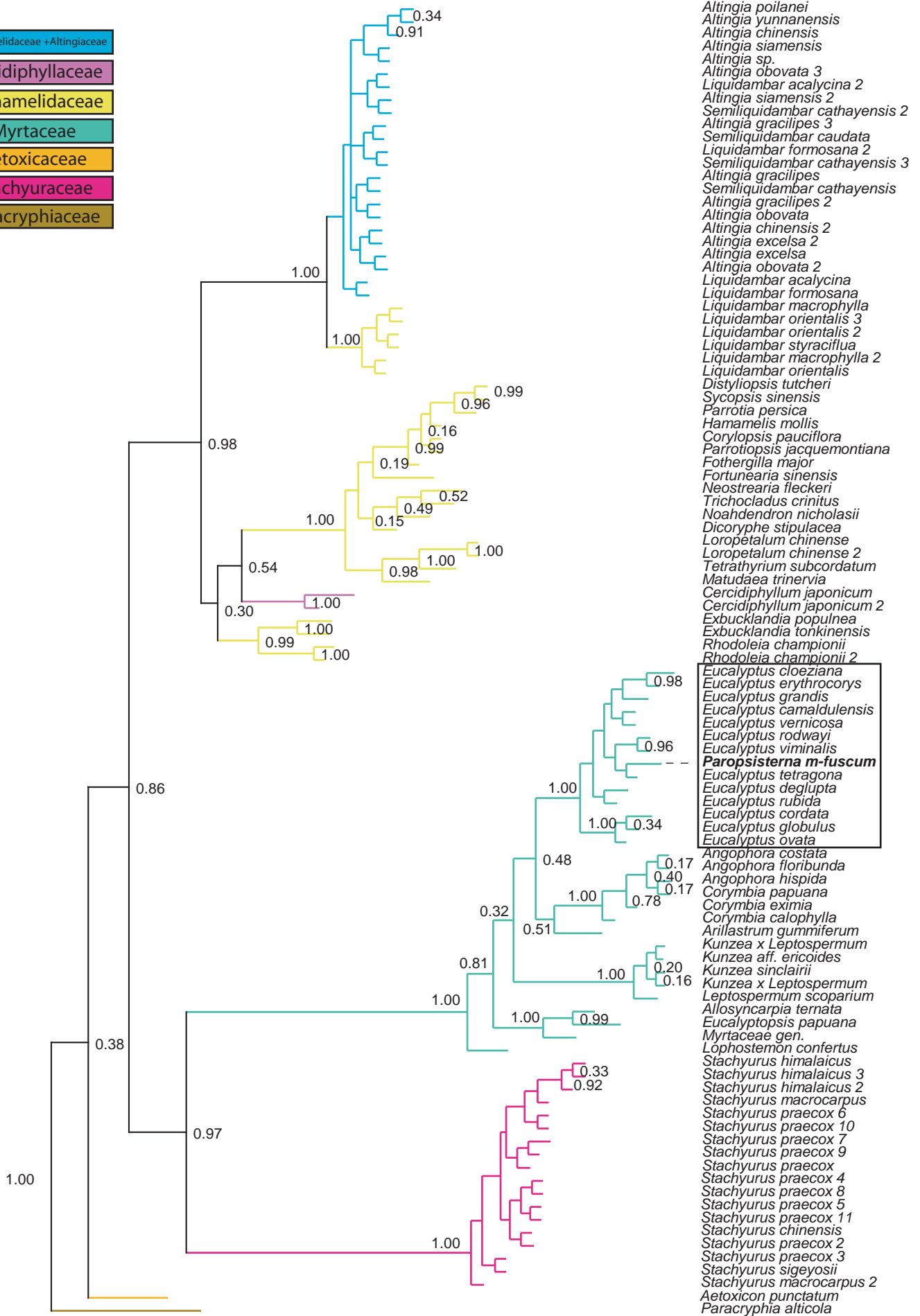


*Paropsisterna liturata* (Marsham, 1808)  
trnL intrón



*Paropsisterna m-fuscum* (Boheman, 1859)  
trnL intrón

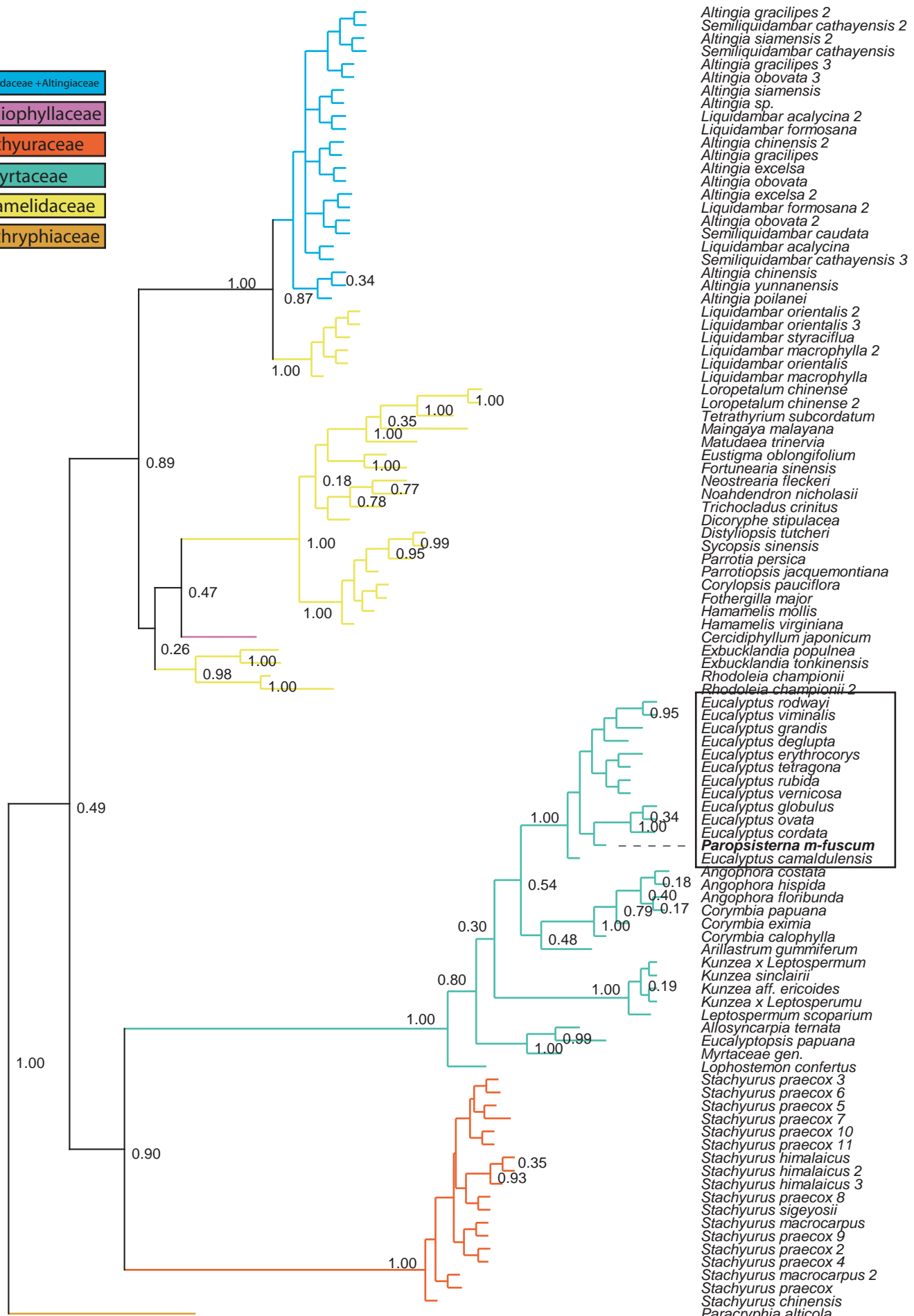
- Hamamelidaceae +Altingiaceae
- Cercidiphyllaceae
- Hamamelidaceae
- Myrtaceae
- Aetoxicaceae
- Stachyuraceae
- Paracryphiaceae



0.1 470

*Paropsisterna m-fuscum* (Boheman, 1859)  
trnL intrón

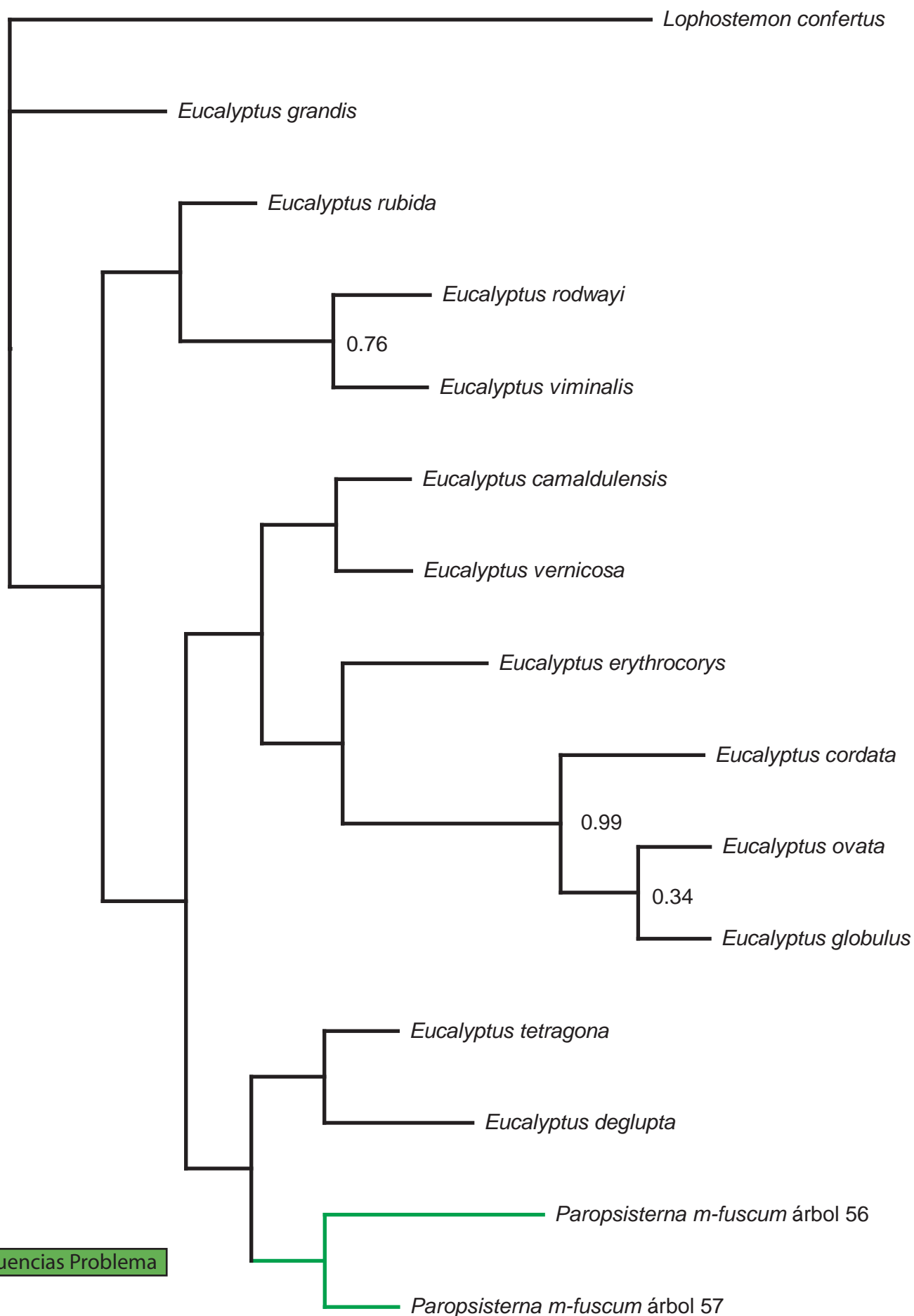
- Hamamelidaceae +Altingiaceae
- Cercidiphyllaceae
- Stachyuraceae
- Myrtaceae
- Hamamelidaceae
- Parachryphiaceae



- Altingia gracilipes 2
- Semiliquidambar cathayensis 2
- Altingia siamensis 2
- Semiliquidambar cathayensis
- Altingia gracilipes 3
- Altingia obovata 3
- Altingia siamensis
- Altingia sp.
- Liquidambar acalycina 2
- Liquidambar formosana
- Altingia chinensis 2
- Altingia gracilipes
- Altingia excelsa
- Altingia obovata
- Altingia excelsa 2
- Liquidambar formosana 2
- Altingia obovata 2
- Semiliquidambar caudata
- Liquidambar acalycina
- Semiliquidambar cathayensis 3
- Altingia chinensis
- Altingia yunnanensis
- Altingia poilanei
- Liquidambar orientalis 2
- Liquidambar orientalis 3
- Liquidambar styraciflua
- Liquidambar macrophylla 2
- Liquidambar orientalis
- Liquidambar macrophylla
- Loropetalum chinense
- Loropetalum chinense 2
- Tetrathyrum subcordatum
- Maingaya malayana
- Matudaea trinervia
- Eustigma oblongifolium
- Fortunearia sinensis
- Neostrearia fleckeri
- Noahdendron nicholasii
- Trichocladus crinitus
- Dicoryphe stipulacea
- Distyliopsis tutcheri
- Sycopsis sinensis
- Parrotia persica
- Parrotiopsis jacquemontiana
- Corylopsis pauciflora
- Fothergilla major
- Hamamelis mollis
- Hamamelis virginiana
- Cercidiphyllum japonicum
- Exbucklandia populnea
- Exbucklandia tonkinensis
- Rhodoleia championii
- Rhodoleia championii 2
- Eucalyptus rodwayi
- Eucalyptus viminalis
- Eucalyptus grandis
- Eucalyptus deglupta
- Eucalyptus erythrocorys
- Eucalyptus tetragona
- Eucalyptus rubida
- Eucalyptus vernicosa
- Eucalyptus globulus
- Eucalyptus ovata
- Eucalyptus cordata
- Paropsisterna m-fuscum**
- Eucalyptus camaldulensis
- Angophora costata
- Angophora hispida
- Angophora floribunda
- Corymbia papuana
- Corymbia eximia
- Corymbia calophylla
- Arillastrum gummiferum
- Kunzea x Leptospermum
- Kunzea sinclairii
- Kunzea aff. ericoides
- Kunzea x Leptospermum
- Leptospermum scoparium
- Allosyncarpia ternata
- Eucalyptopsis papuana
- Myrtaceae gen.
- Lophostemon confertus
- Stachyurus praecox 3
- Stachyurus praecox 6
- Stachyurus praecox 5
- Stachyurus praecox 7
- Stachyurus praecox 10
- Stachyurus praecox 11
- Stachyurus himalaicus
- Stachyurus himalaicus 2
- Stachyurus himalaicus 3
- Stachyurus praecox 8
- Stachyurus sigeyosii
- Stachyurus macrocarpus
- Stachyurus praecox 9
- Stachyurus praecox 2
- Stachyurus praecox 4
- Stachyurus macrocarpus 2
- Stachyurus praecox
- Stachyurus chinensis
- Paracryphia alticola



*Paropsisterna m-fuscum* (Boheman, 1859)

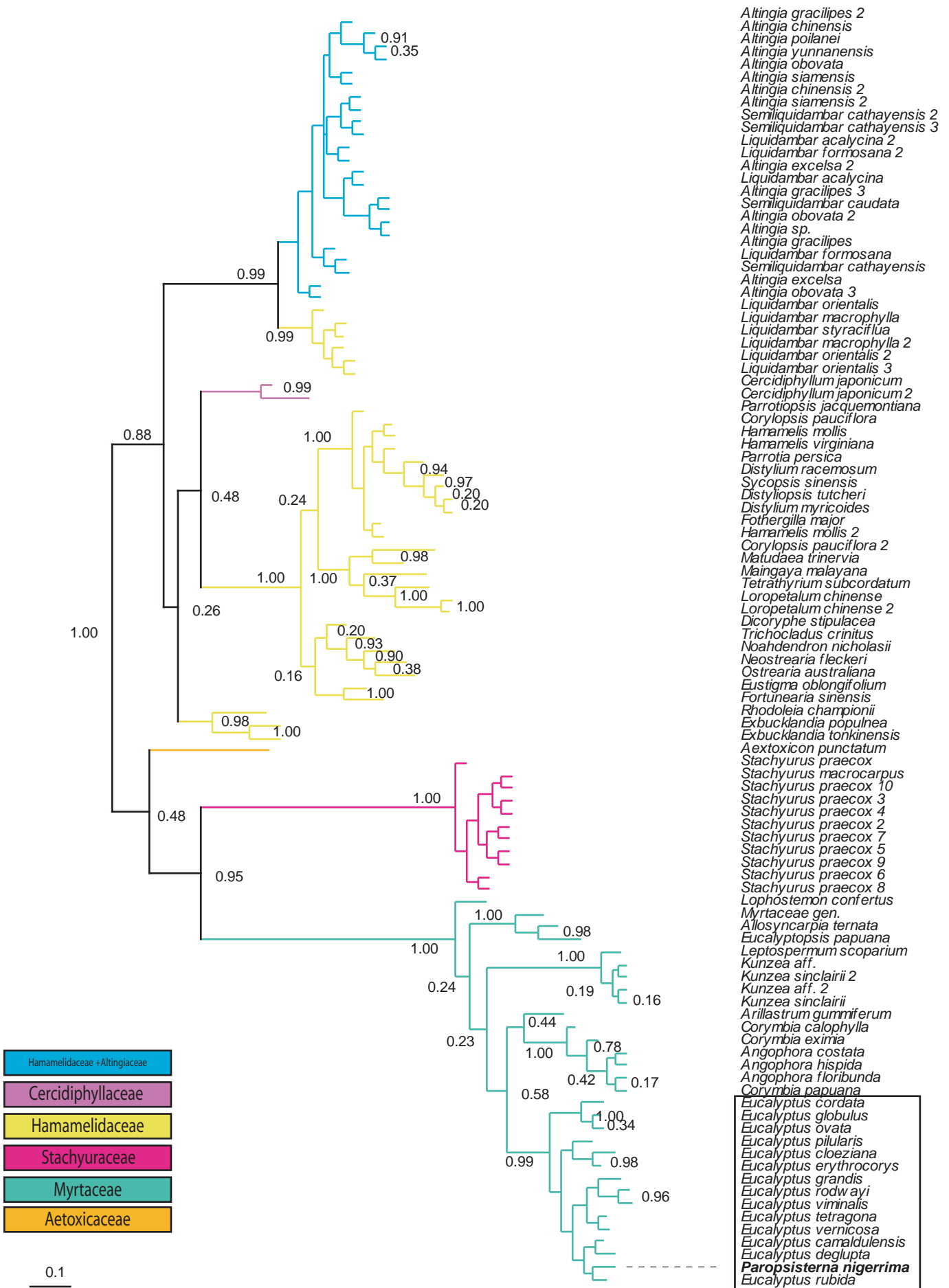


Secuencias Problema

0.1

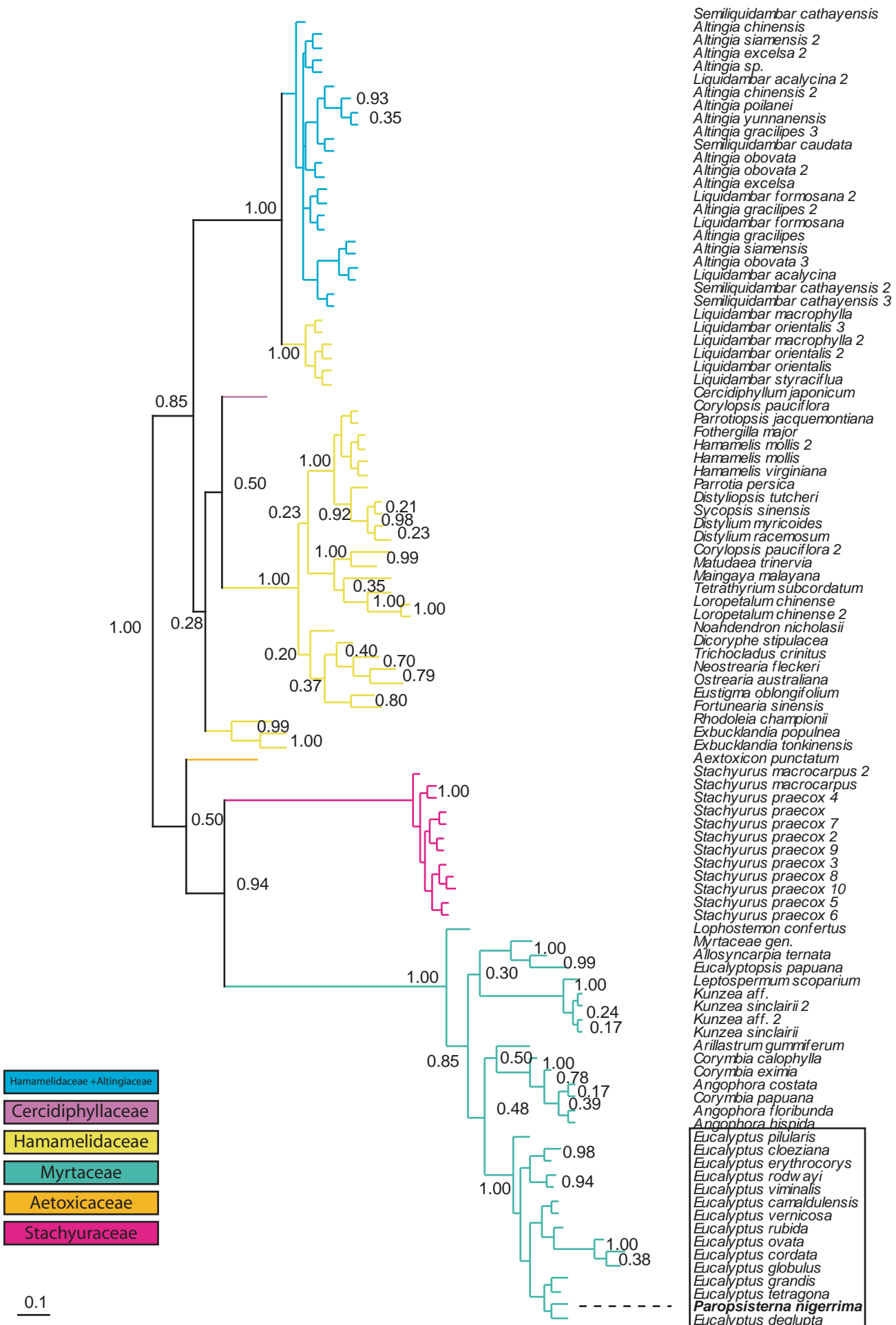
472

*Paropsisterna nigerrima* (Germar, 1848)  
trnL intrón



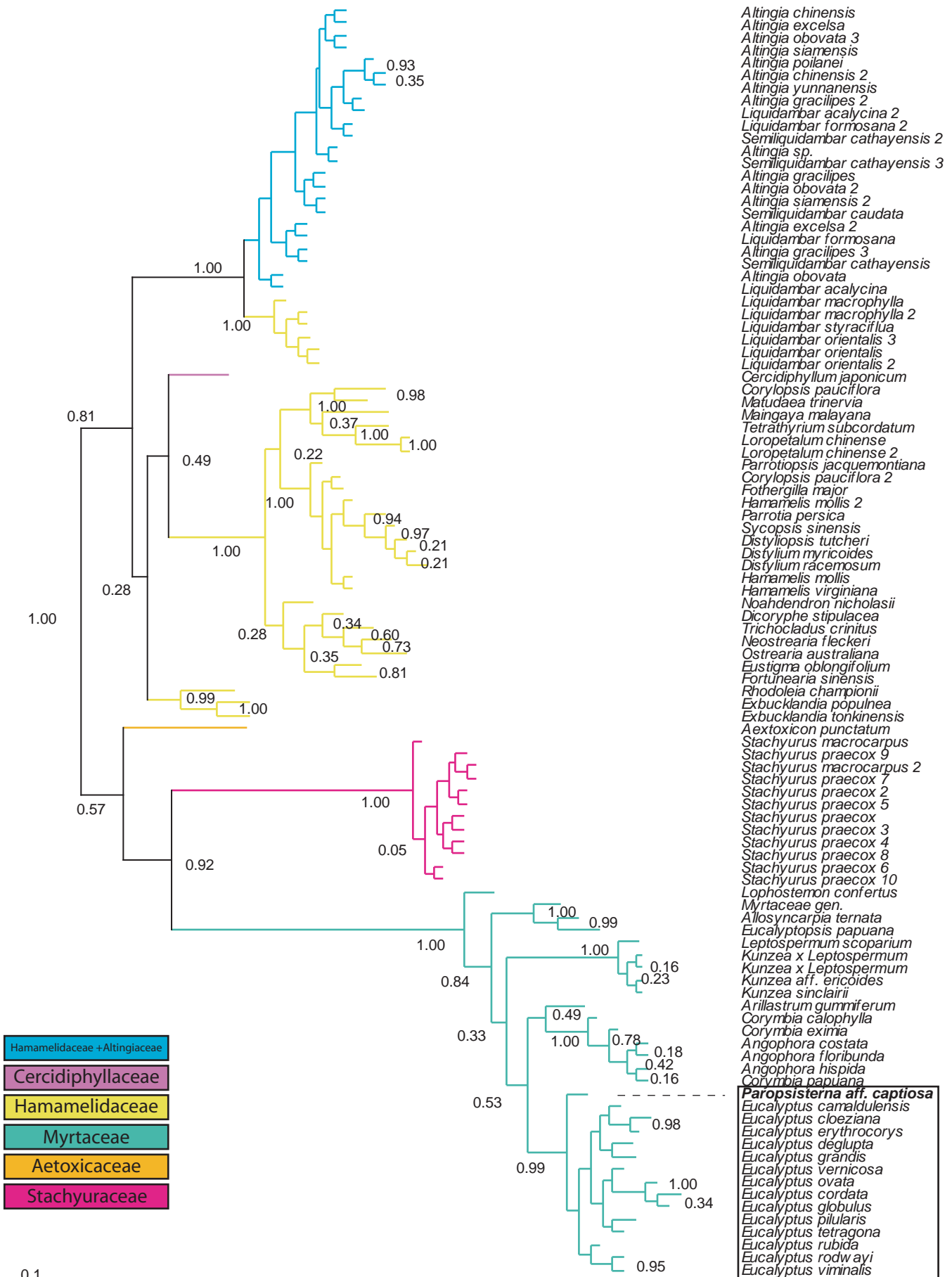
0.1

*Paropsisterna nigerrima* (Germar, 1848)  
trnL intrón



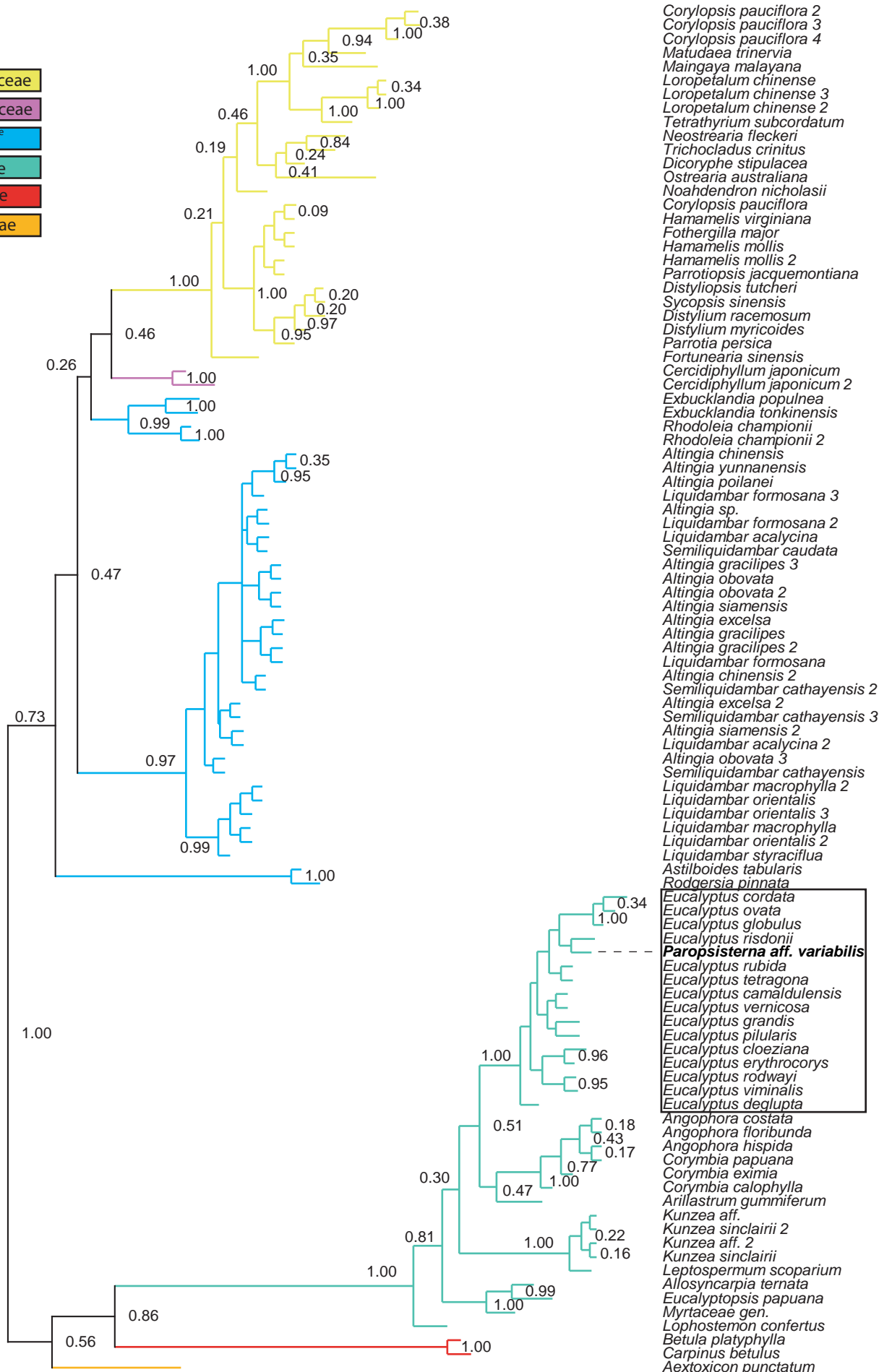
0.1

*Paropsisterna aff. captiosa* (Clark, 1865) (JAJ142)  
trnL intrón



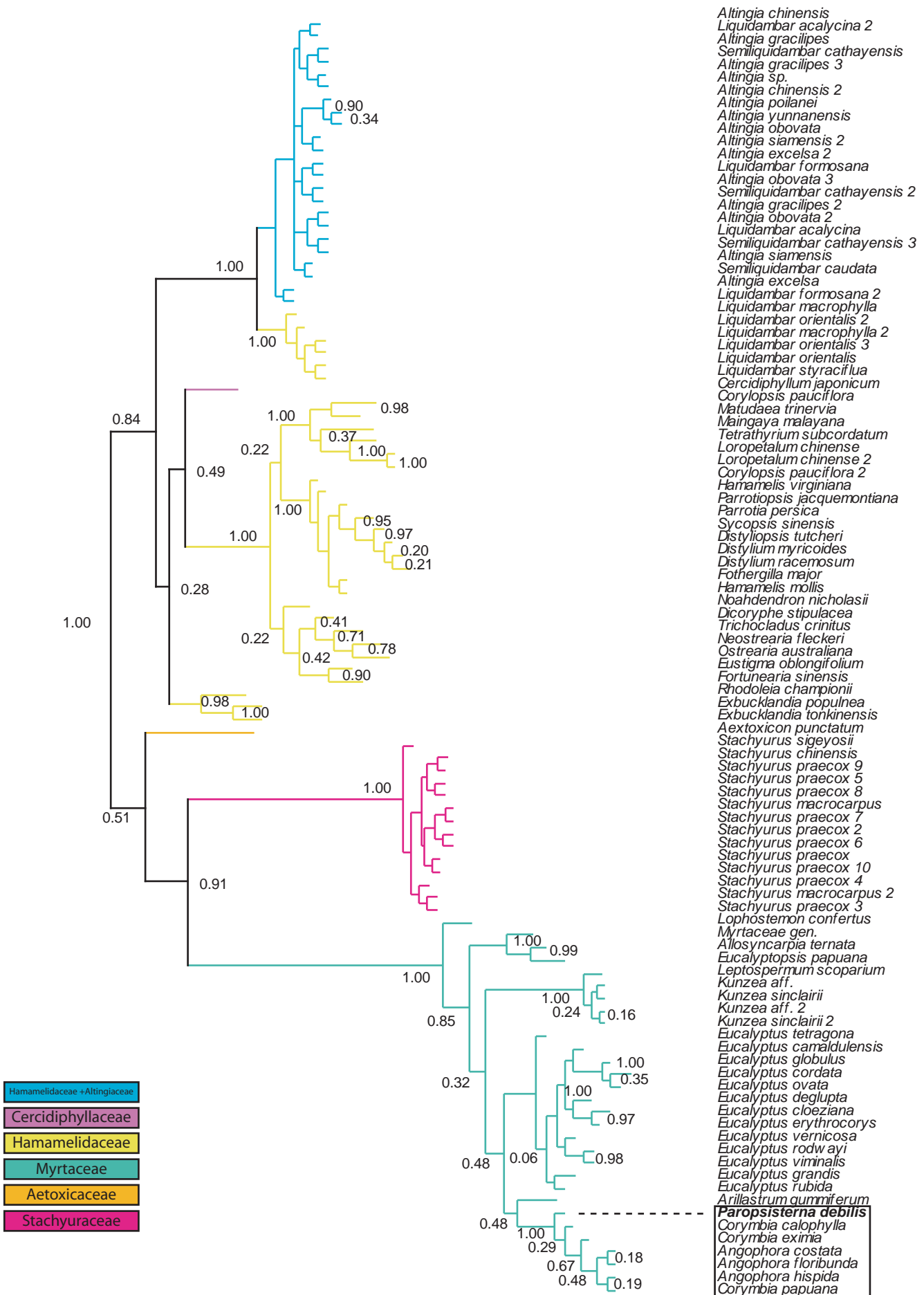
*Paropsisterna aff. variabilis* (Chapuis, 1877) (JAJ139)  
trnL intrón

- Hamamelidaceae
- Cercidiphyllaceae
- Hamamelidaceae  
+Altingiaceae
- Myrtaceae
- Betulaceae
- Aetoxicaceae

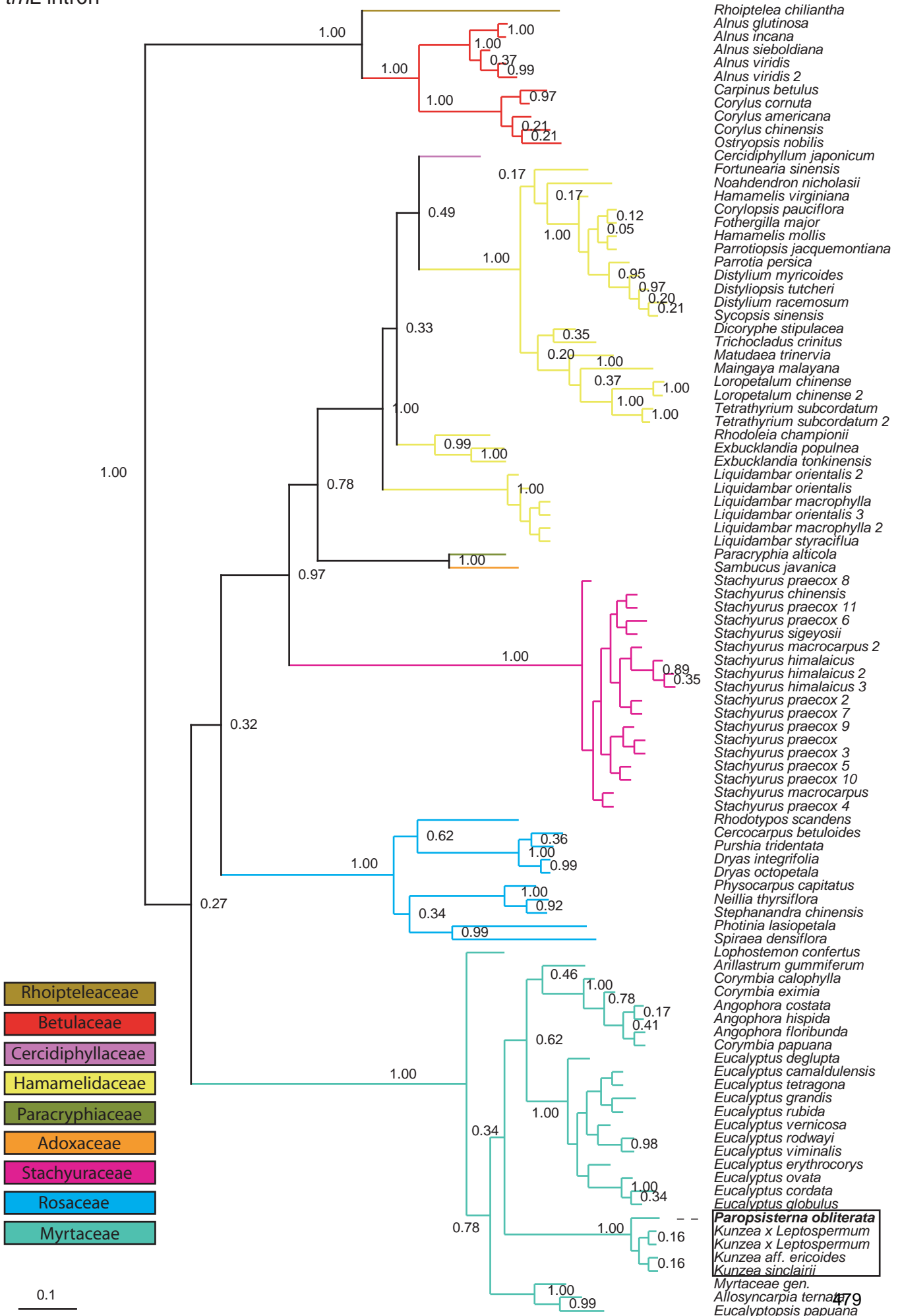




*Paropsisterna debilis* (Chapuis, 1877)  
trnL intrón



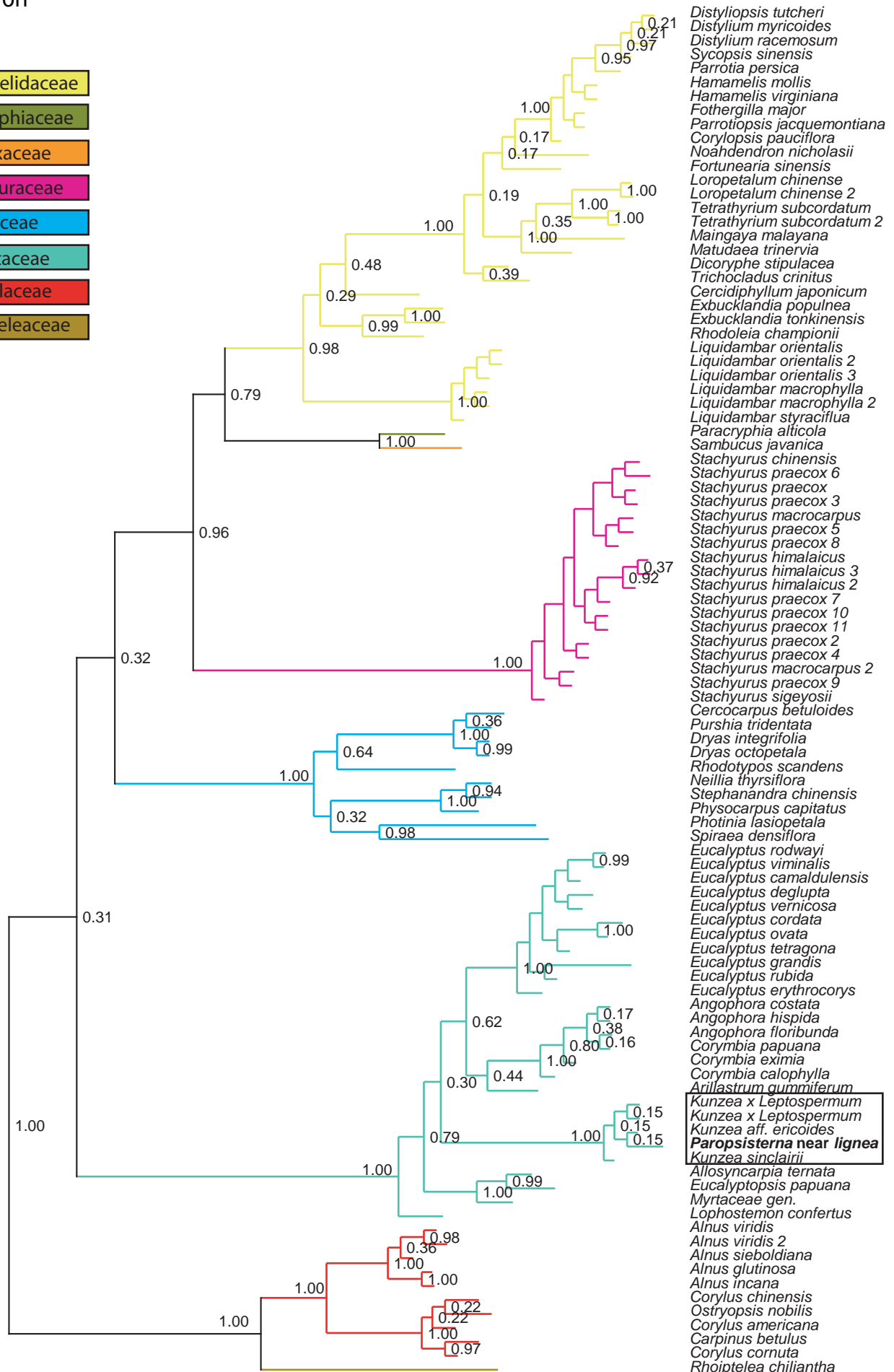
*Paropsisterna obliterata* (Erichson, 1842)  
trnL intrón





*Paropsisterna aff. lignea* (Chapuis, 1877) (JAJ151)  
trnL intrón

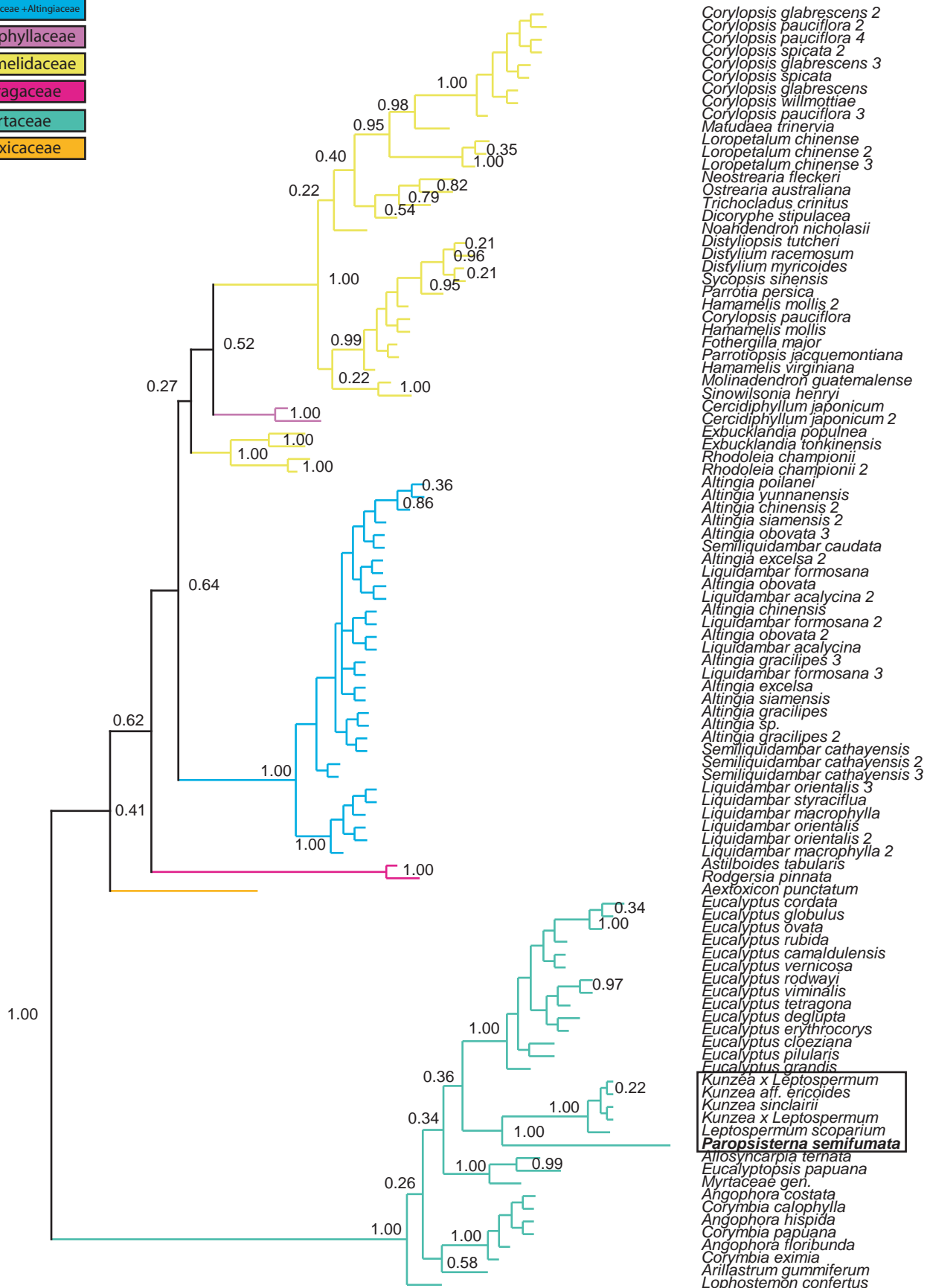
- Hamamelidaceae
- Paracryphiaceae
- Adoxaceae
- Stachyuraceae
- Rosaceae
- Myrtaceae
- Betulaceae
- Rhoipteleaceae



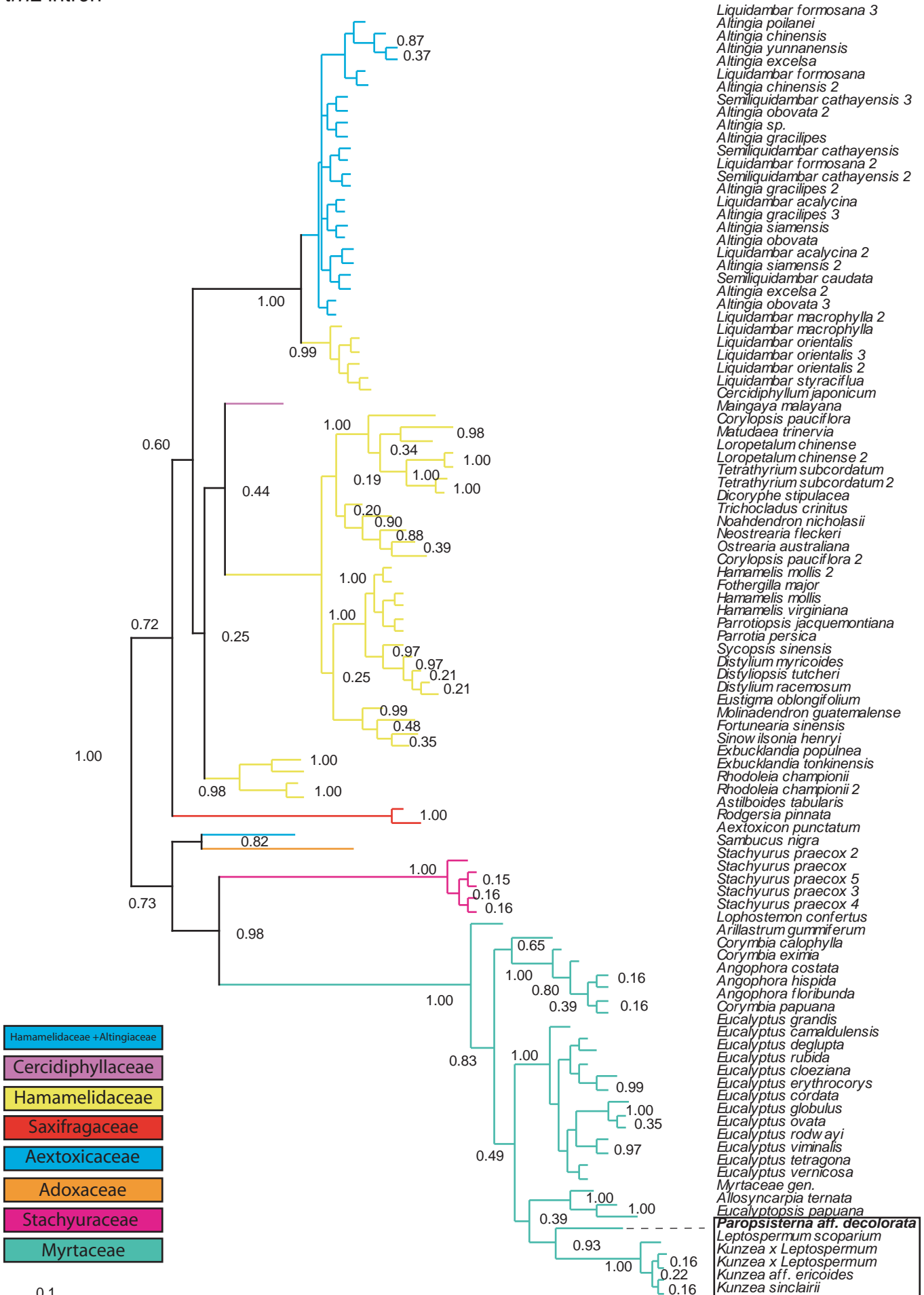
0.1

*Paropsisterna semifumata* (Blackburn, 1901)  
trnL intrón

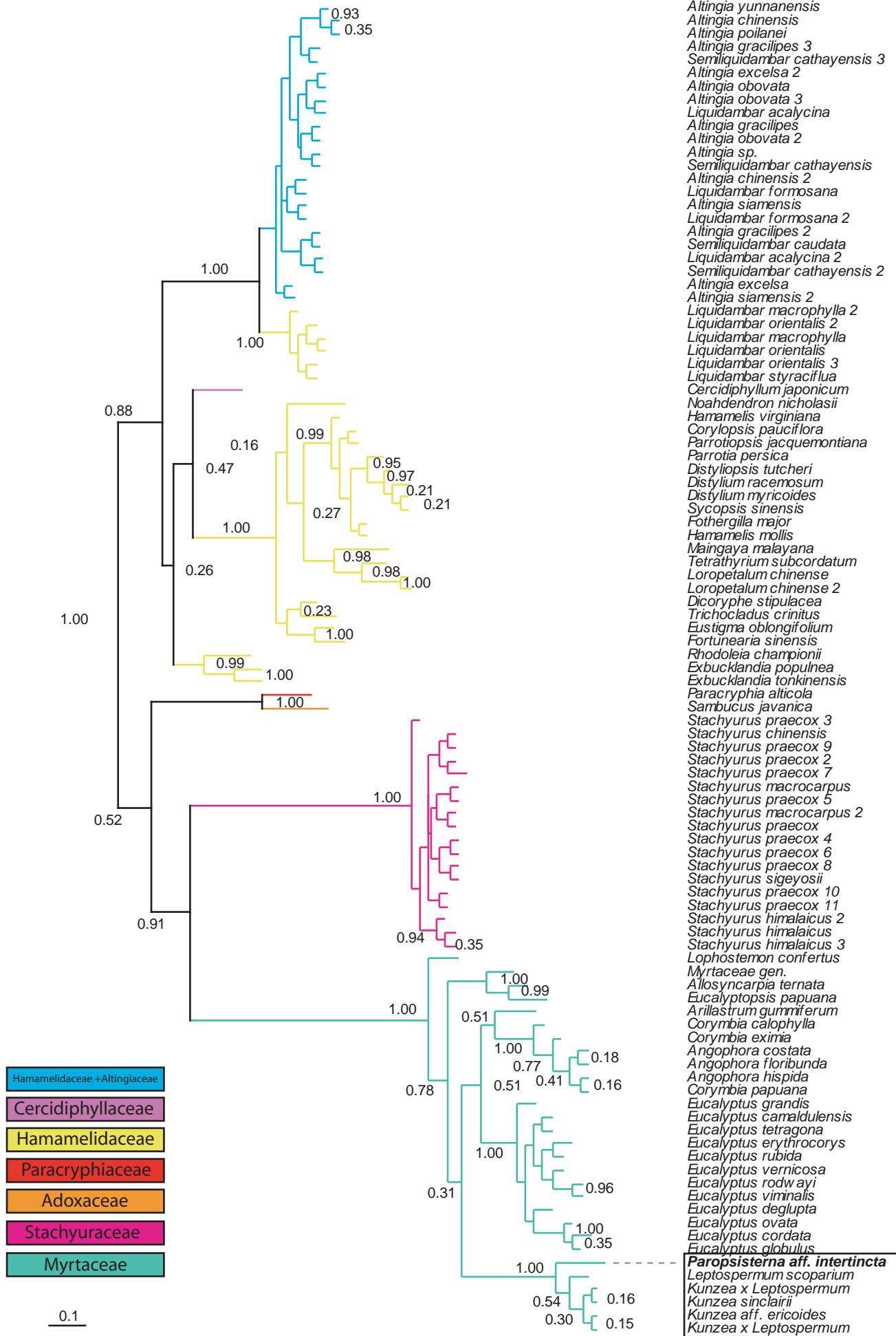
- Hamamelidaceae + Altingiaceae
- Cercidiphyllaceae
- Hamamelidaceae
- Saxifragaceae
- Myrtaceae
- Aetoxicaceae



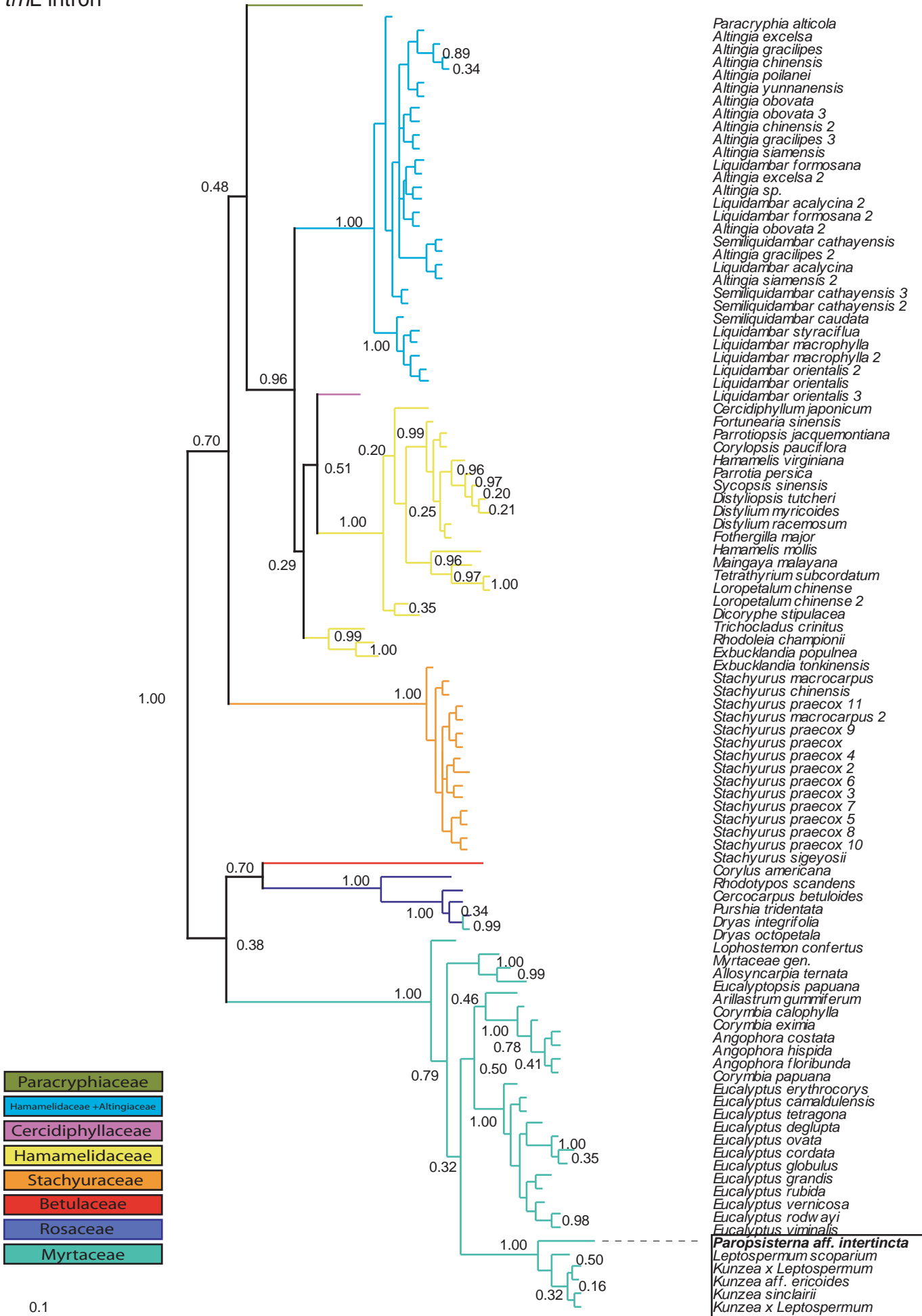
*Paropsisterna aff. decolorata* (Chapuis, 1877) (JAJ143)  
trnL intrón



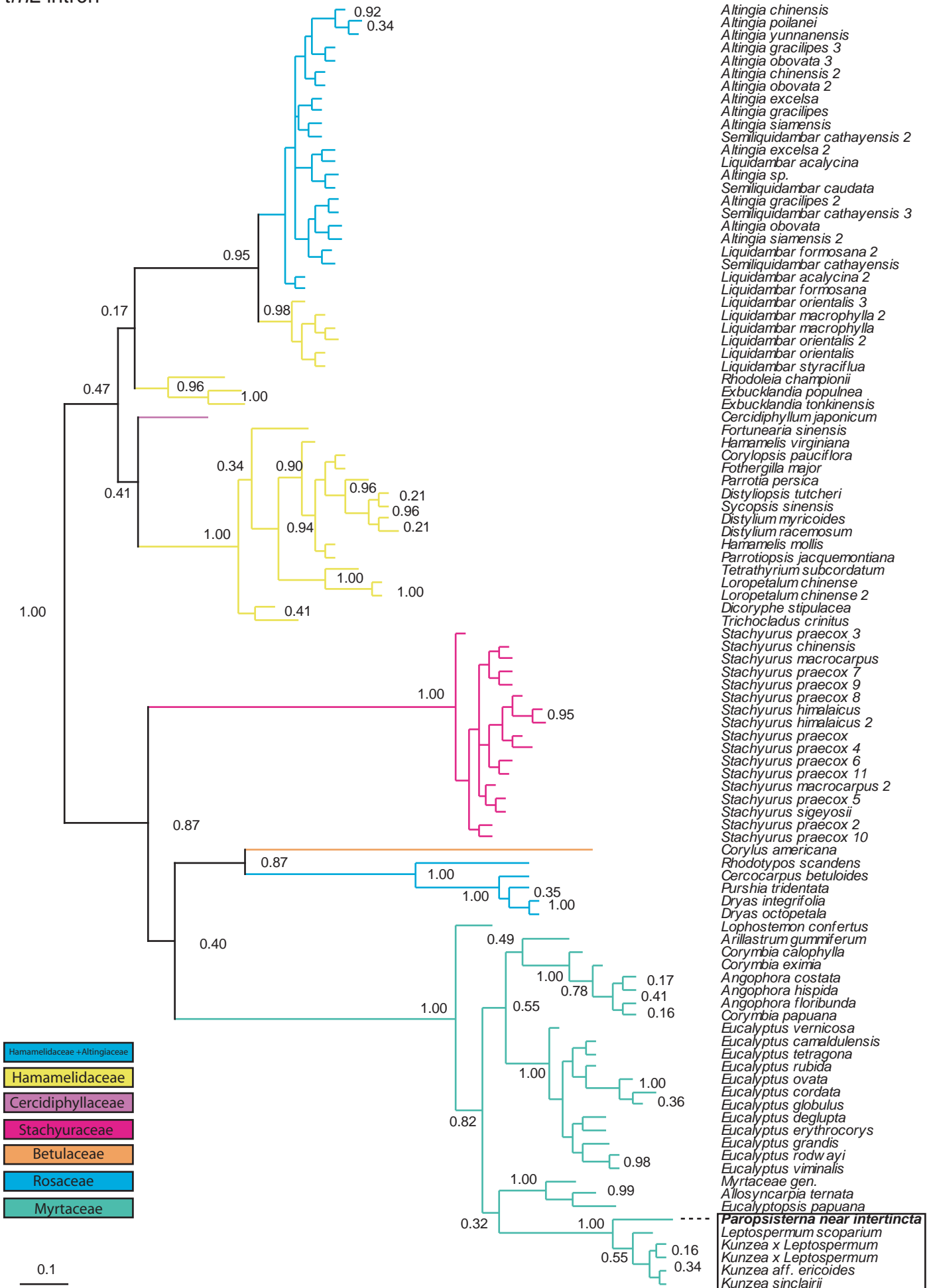
*Paropsisterna* aff. *intertincta* (Clark, 1865) (JAJ145)  
trnL intrón



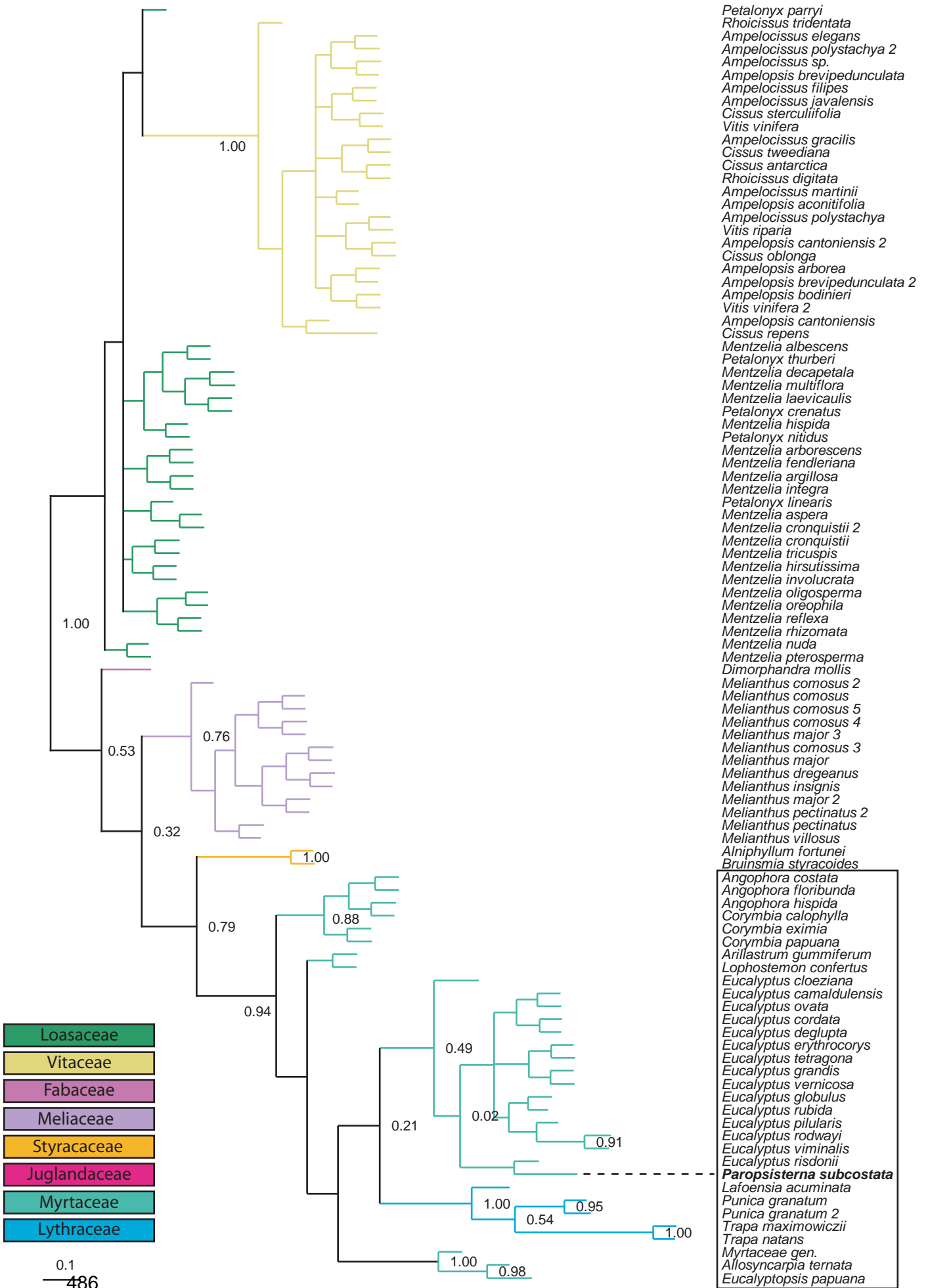
*Paropsisterna aff. intertincta* (Clark, 1865) (JAJ147)  
trnL intrón



*Paropsisterna aff. intertincta* (Clark, 1865) (JAJ148)  
trnL intrón

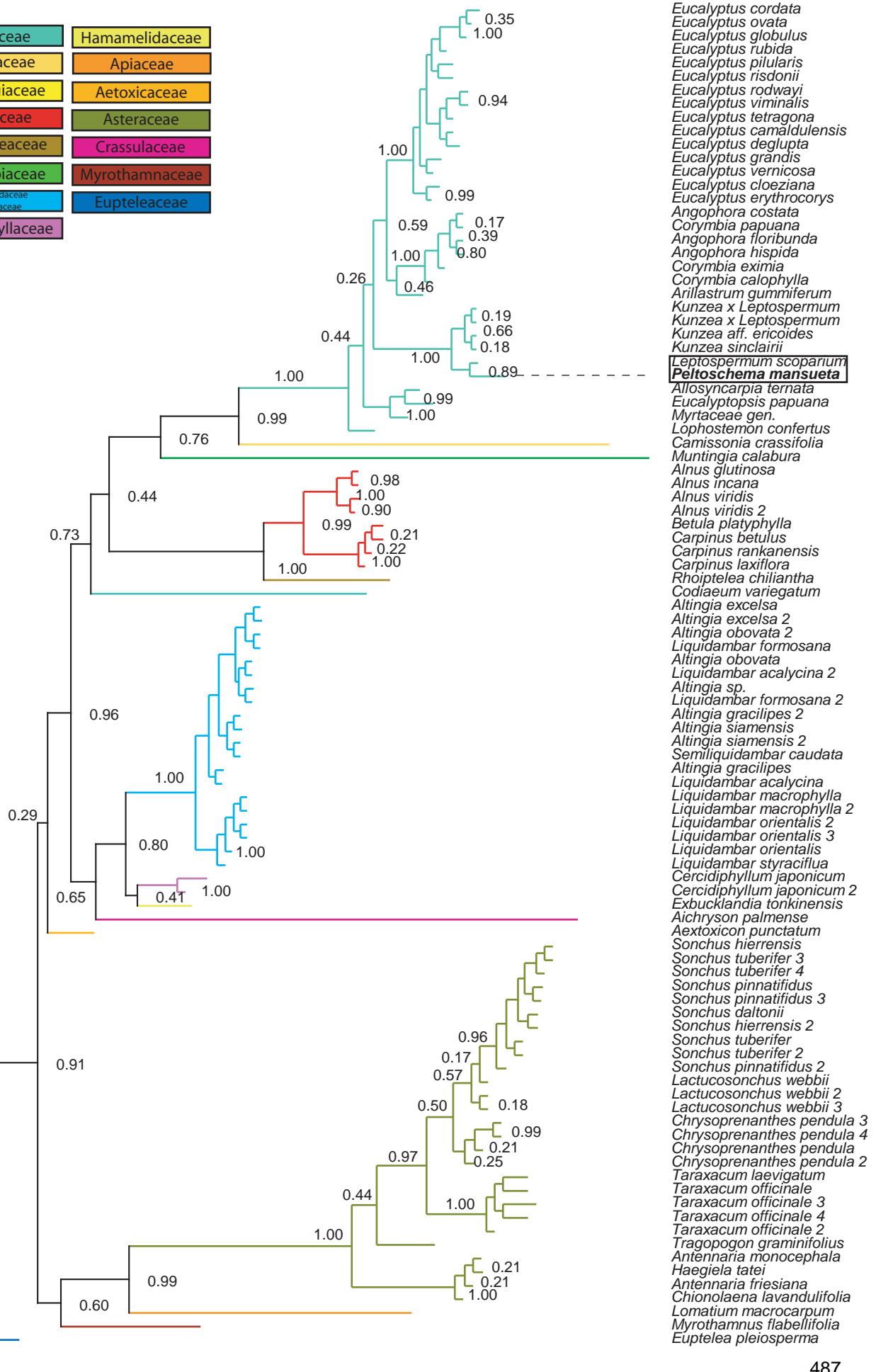


*Paropsisterna subcostata* (Chapuis, 1877)  
trnL intrón



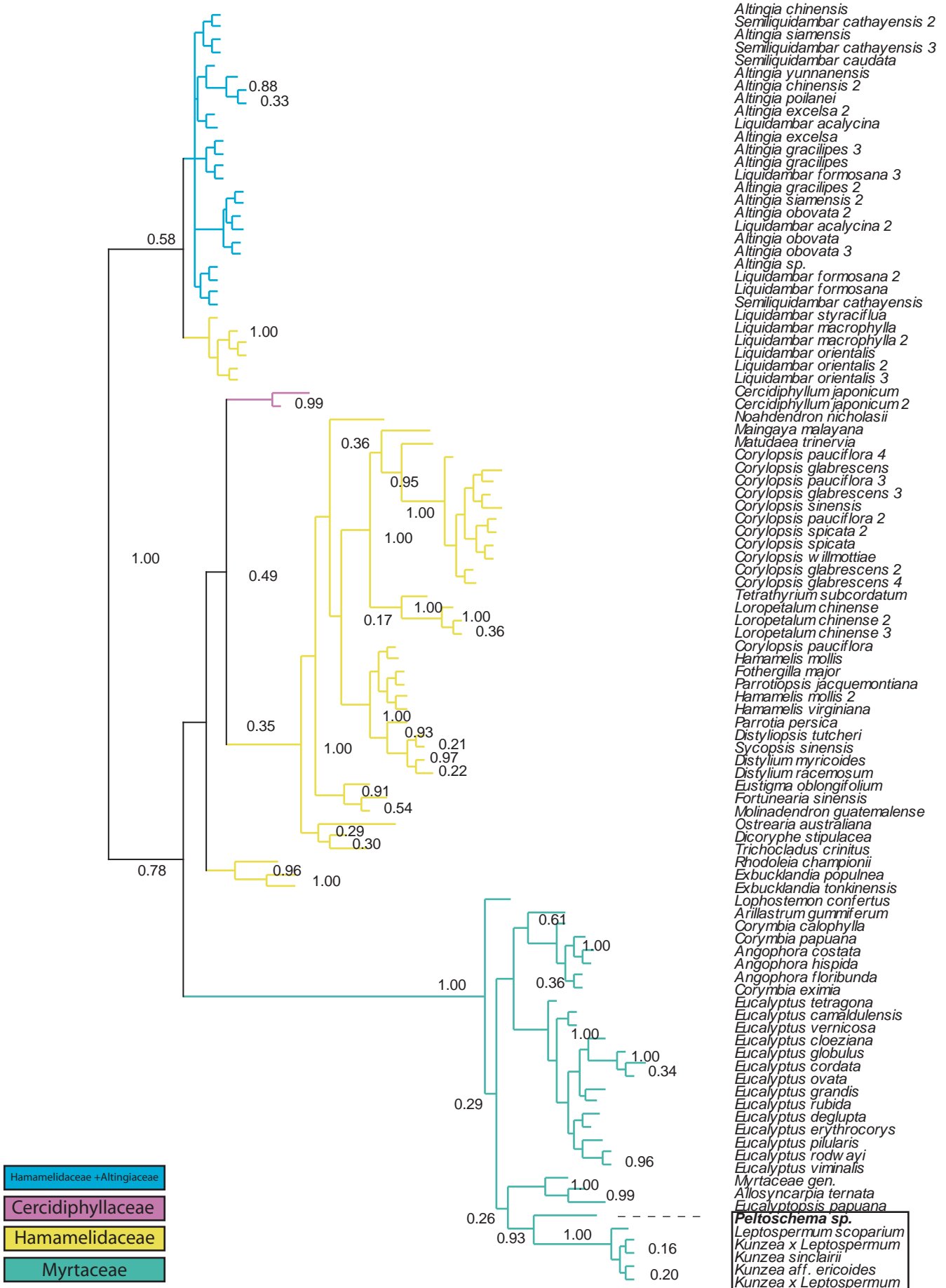
*Peltoschema mansueta* (Weise, 1901)  
trnL intrón

Myrtaceae	Hamamelidaceae
Onagraceae	Apiaceae
Muntingiaceae	Aetoxicaceae
Betulaceae	Asteraceae
Rhoipteleaceae	Crassulaceae
Euphorbiaceae	Myrothamnaceae
Hamamelidaceae +Altingiaceae	Eupteleaceae
Cercidiphyllaceae	

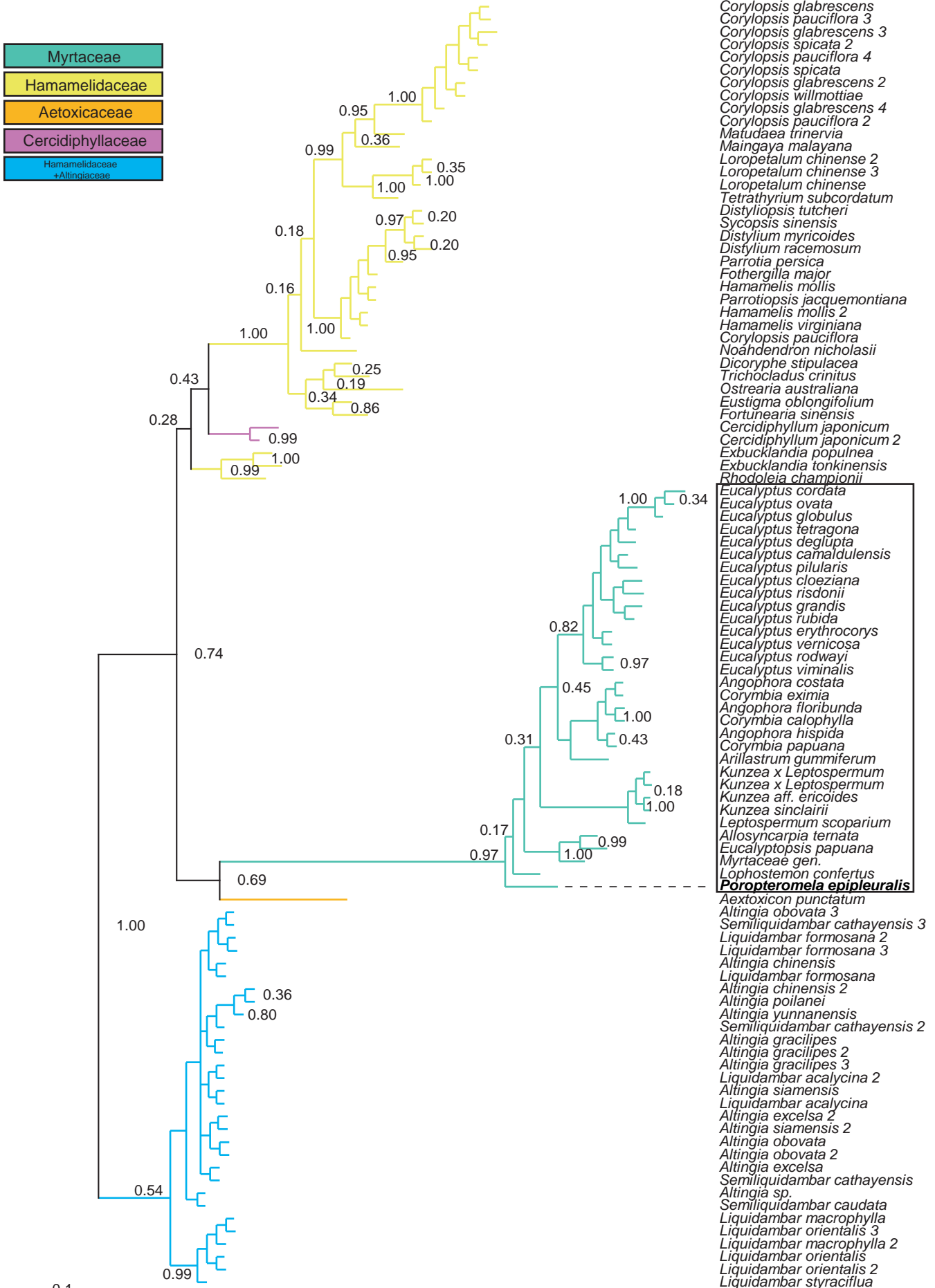




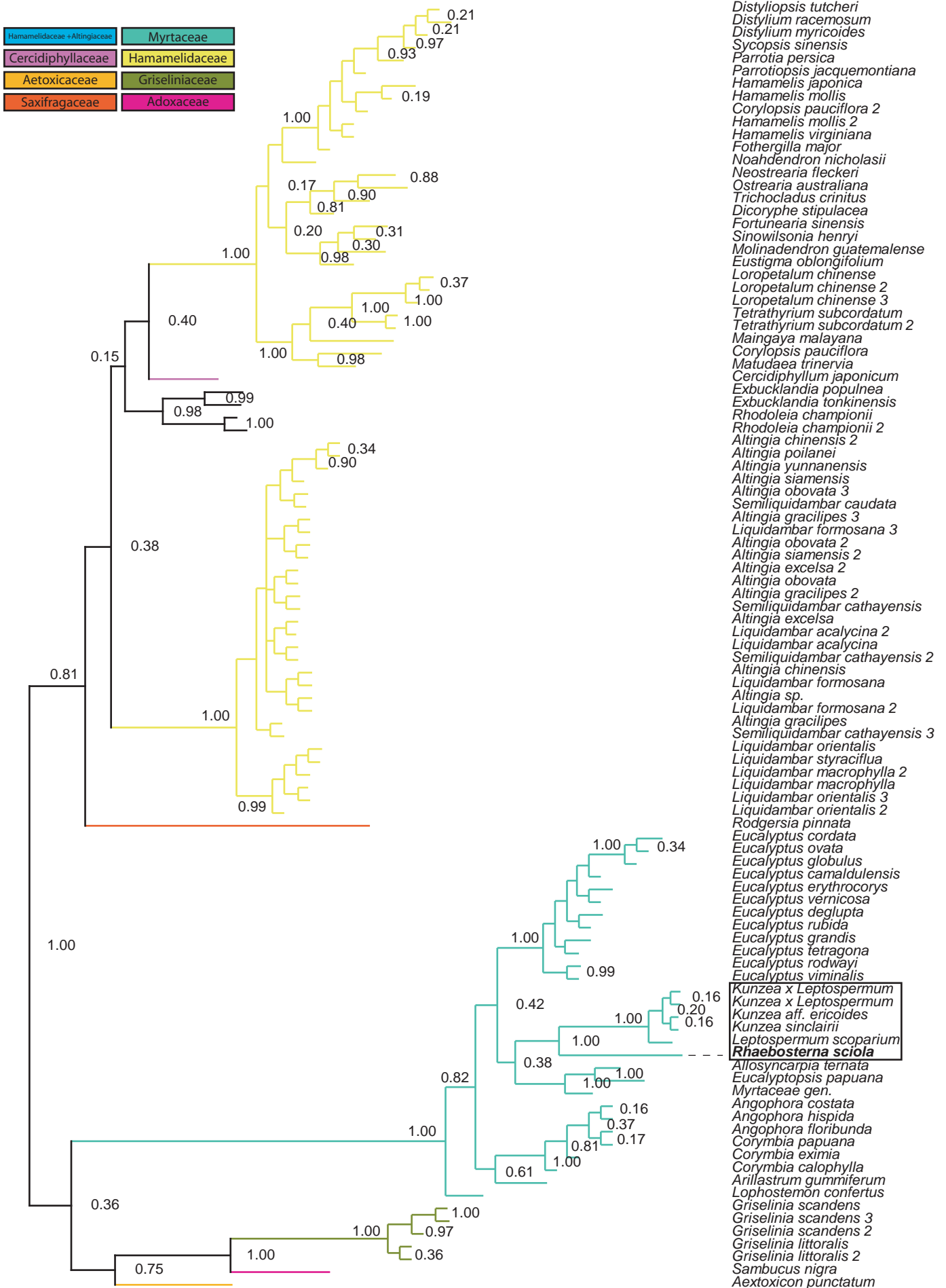
*Peltoschema* sp (JAJ155)  
trnL intrón



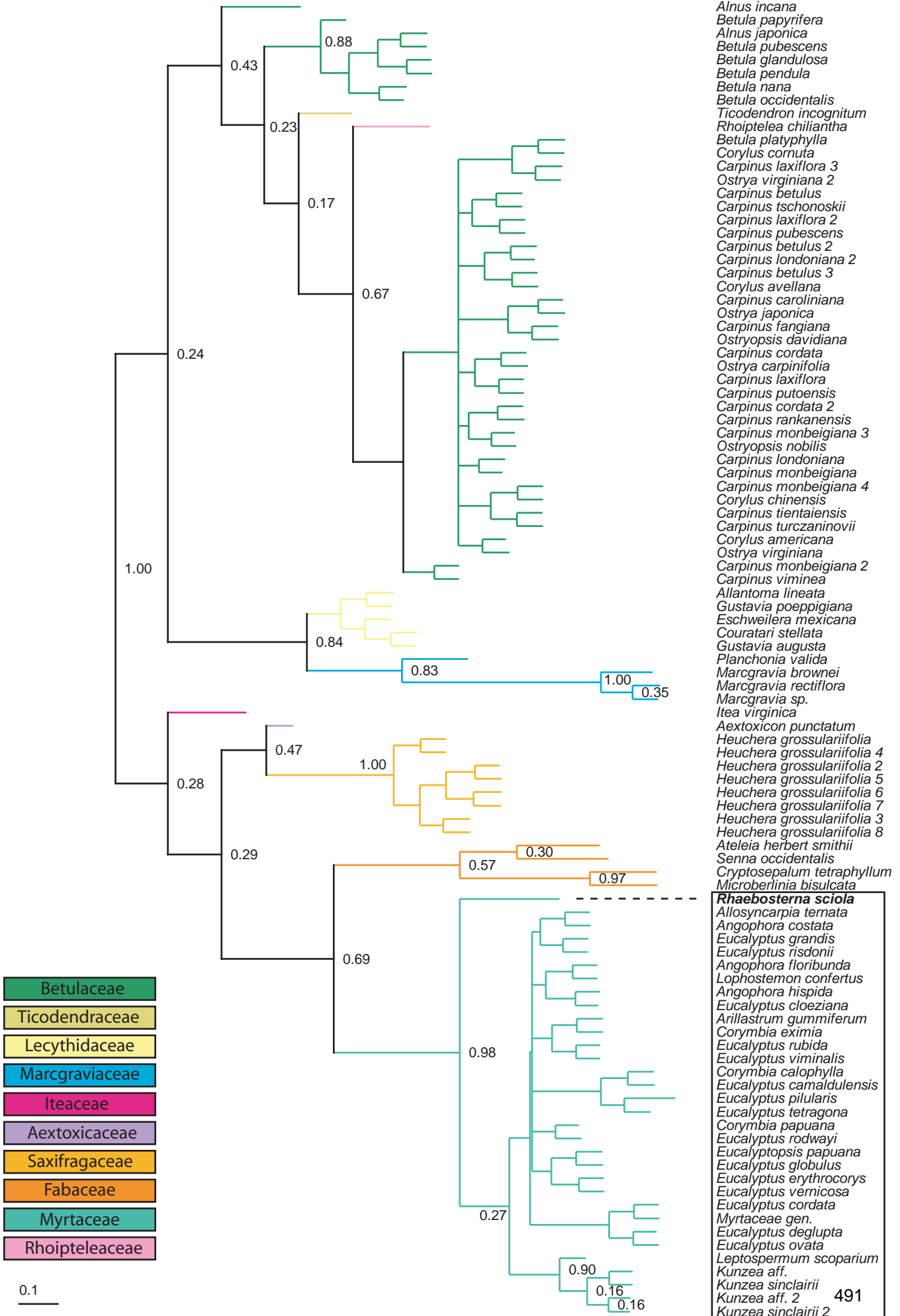
*Poropteromela epipleuralis* Lea, 1916  
trnL intrón



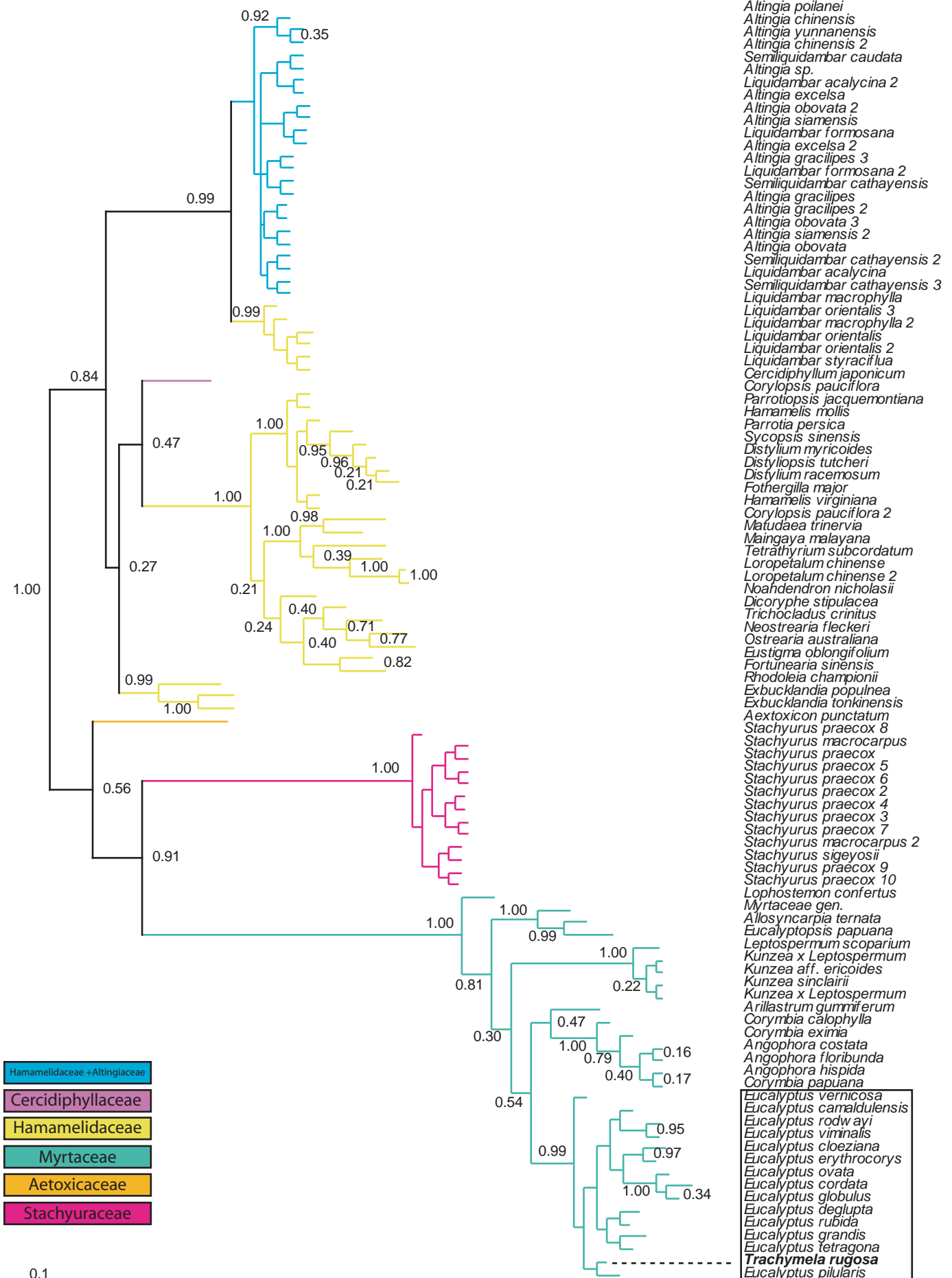
*Rhaebosterna sciola* Weise, 1917  
trnL intrón



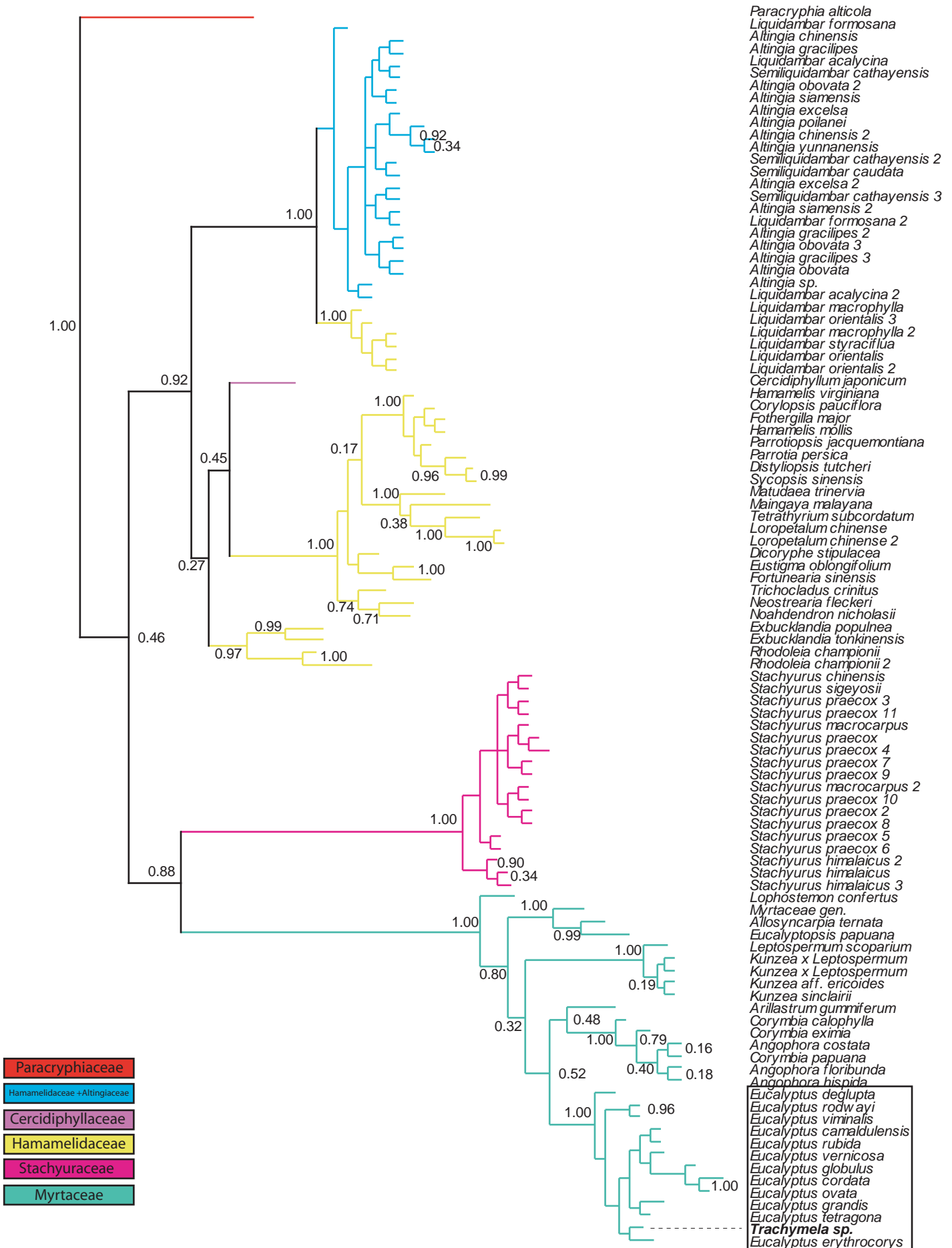
*Rhaebosterna sciola* Weise, 1917  
trnL intrón loop P6



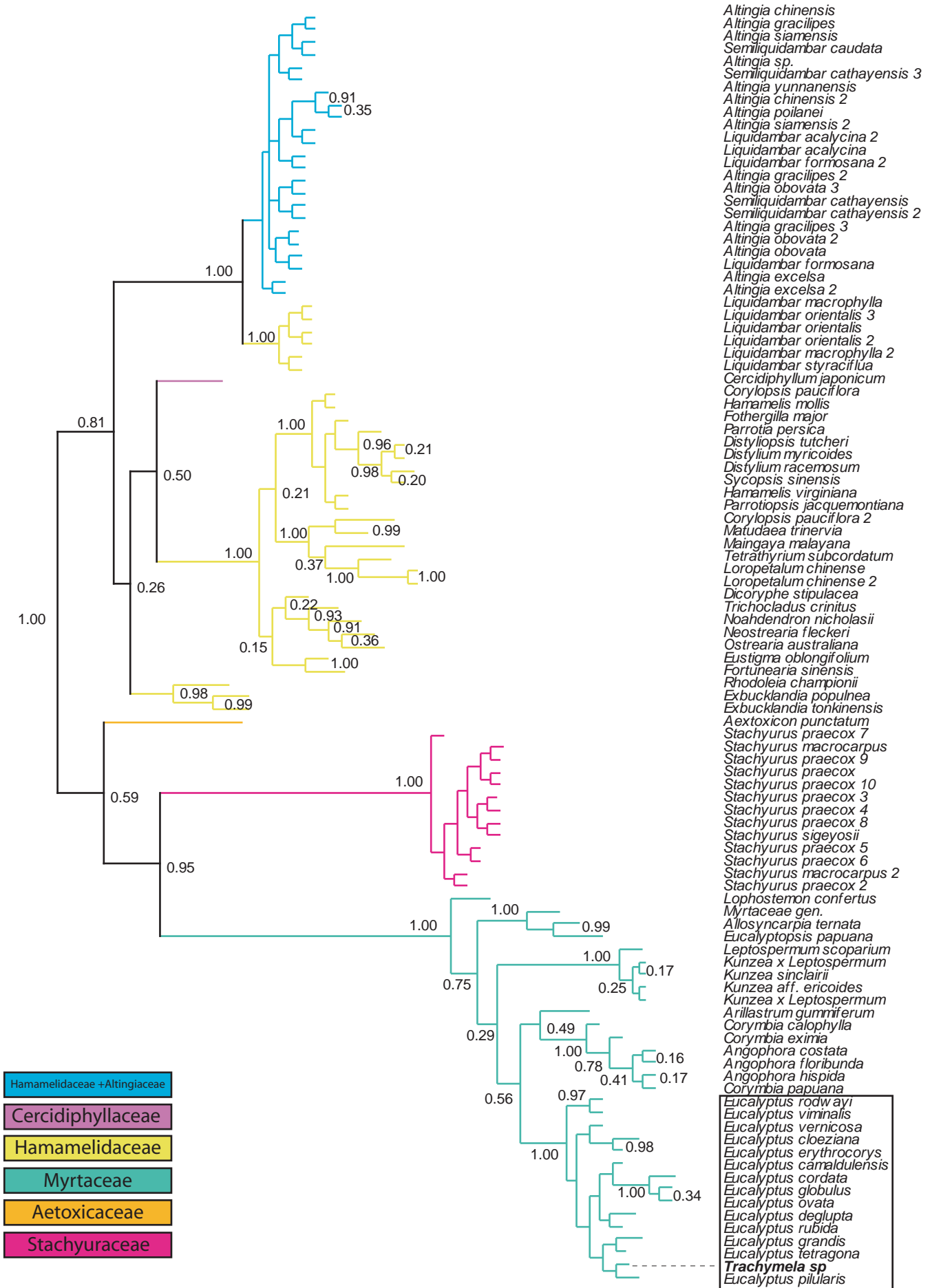
*Trachymela rugosa* (Chapuis, 1877)  
trnL intrón



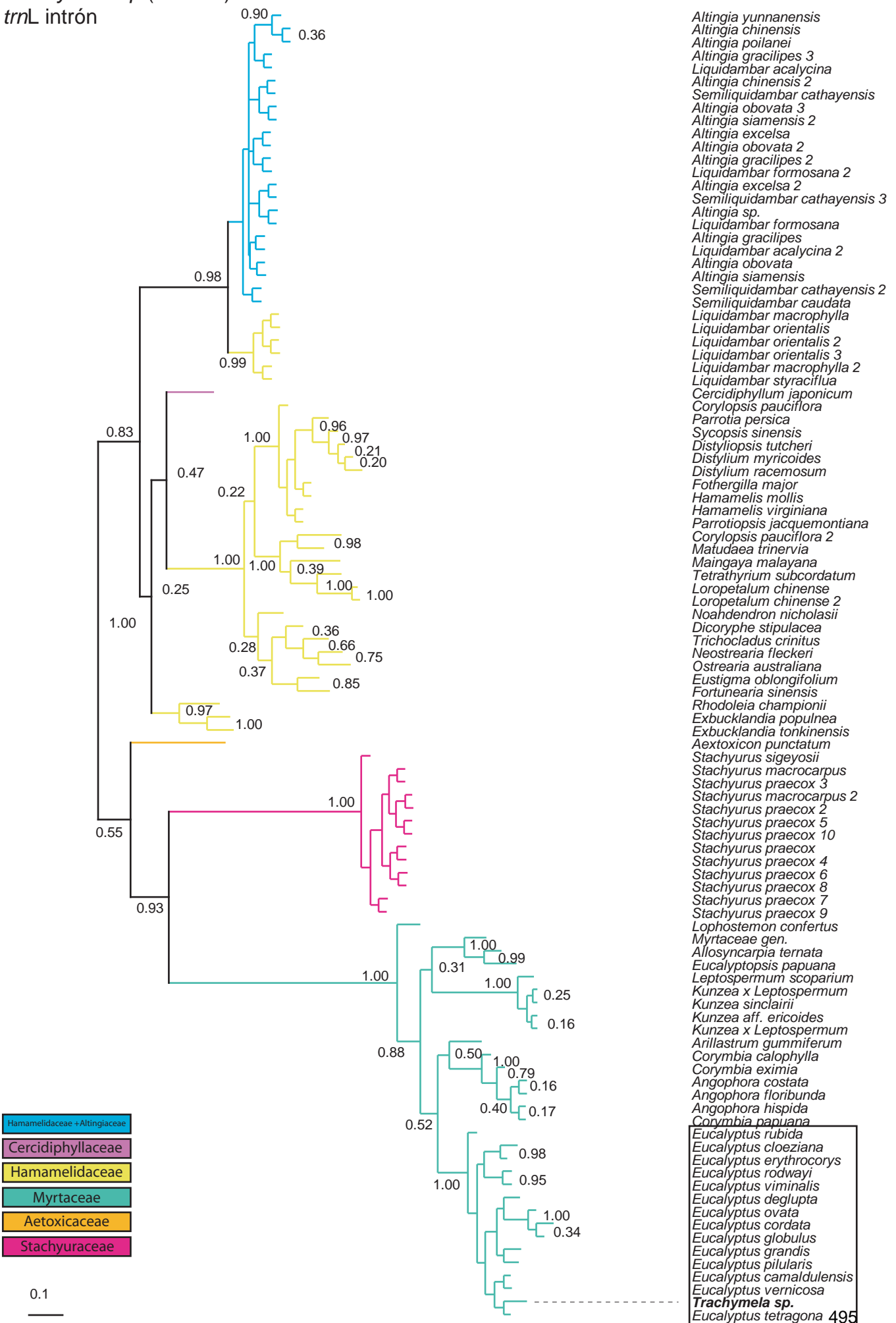
*Trachymela* sp. (196167)  
trnL intrón



*Trachymela* sp (JAJ 168)  
trnL intrón

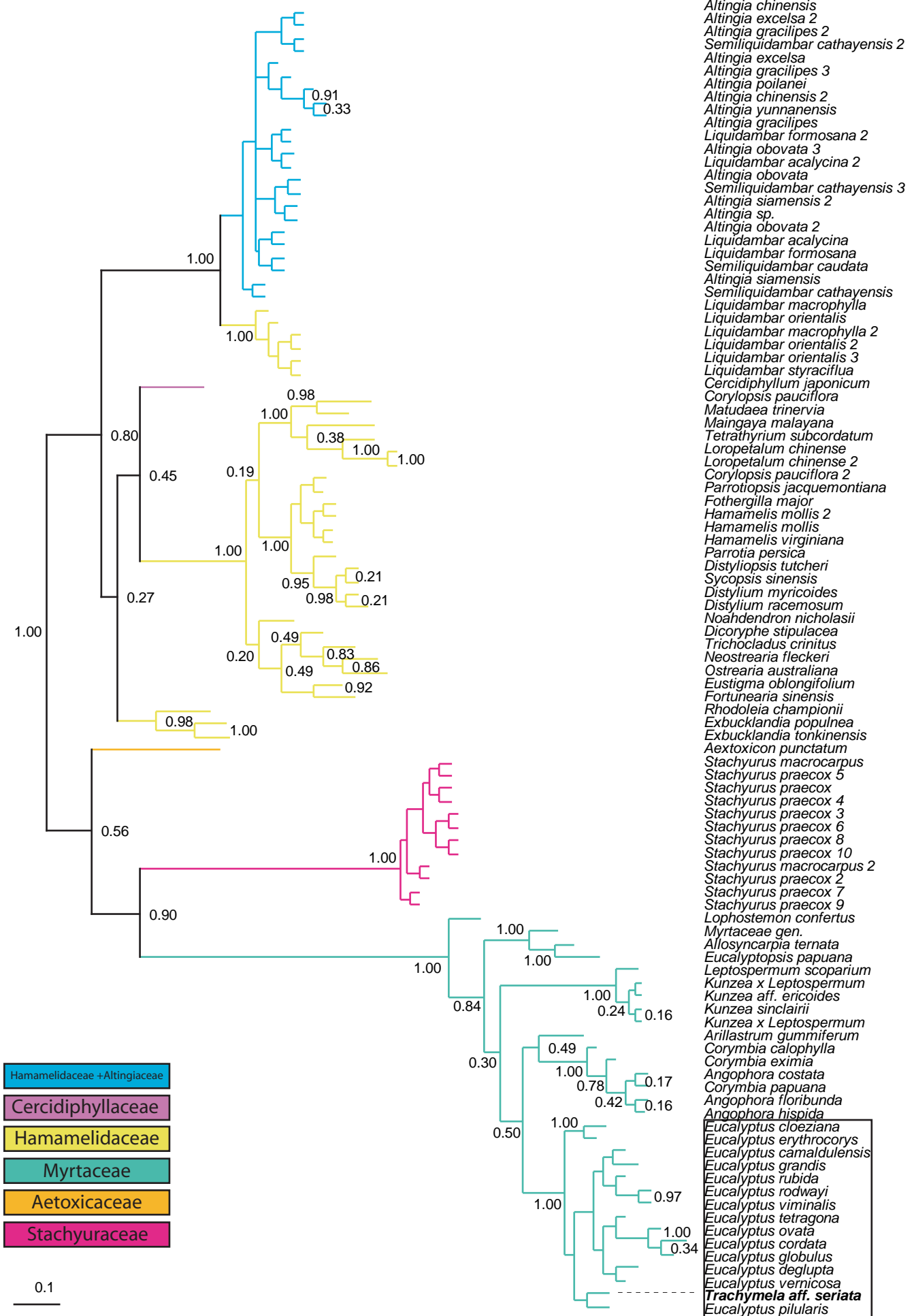


*Trachymela* sp (JAJ170)  
trnL intrón

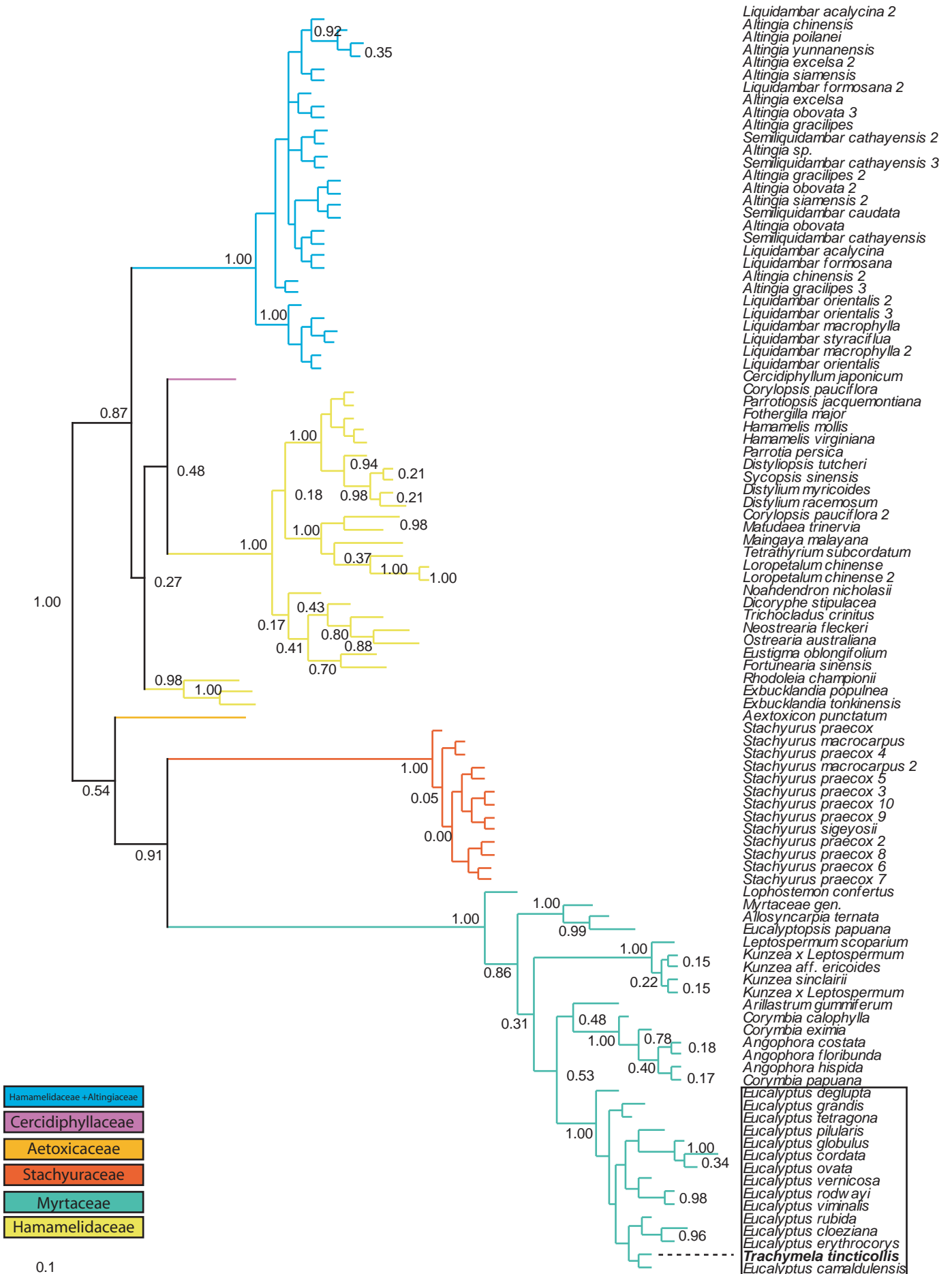




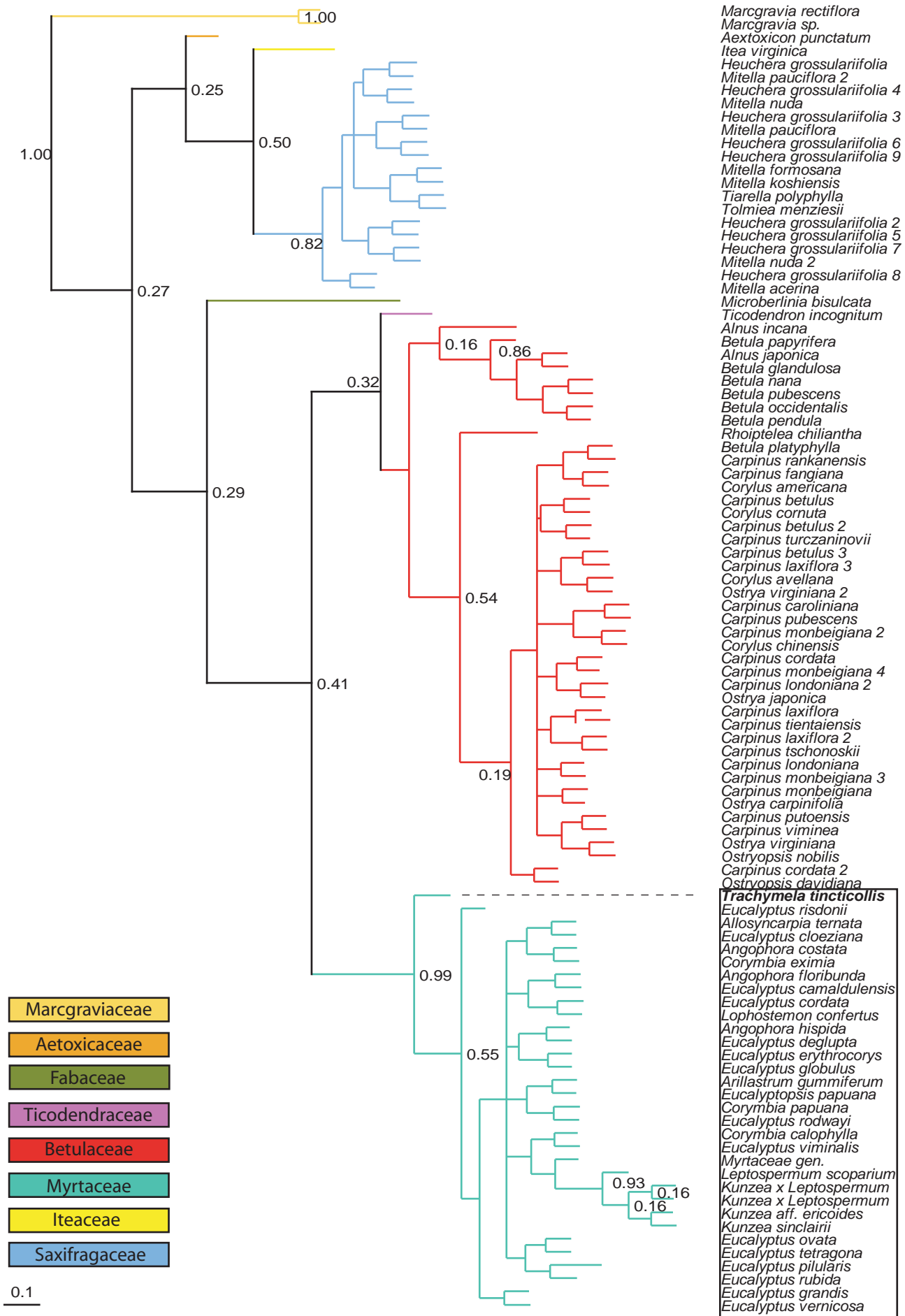
*Trachymela aff. seriata* (Germar, 1848) (JAJ167)  
trnL intrón



*Trachymela tincticollis* (Blackburn, 1896)  
trnL intrón



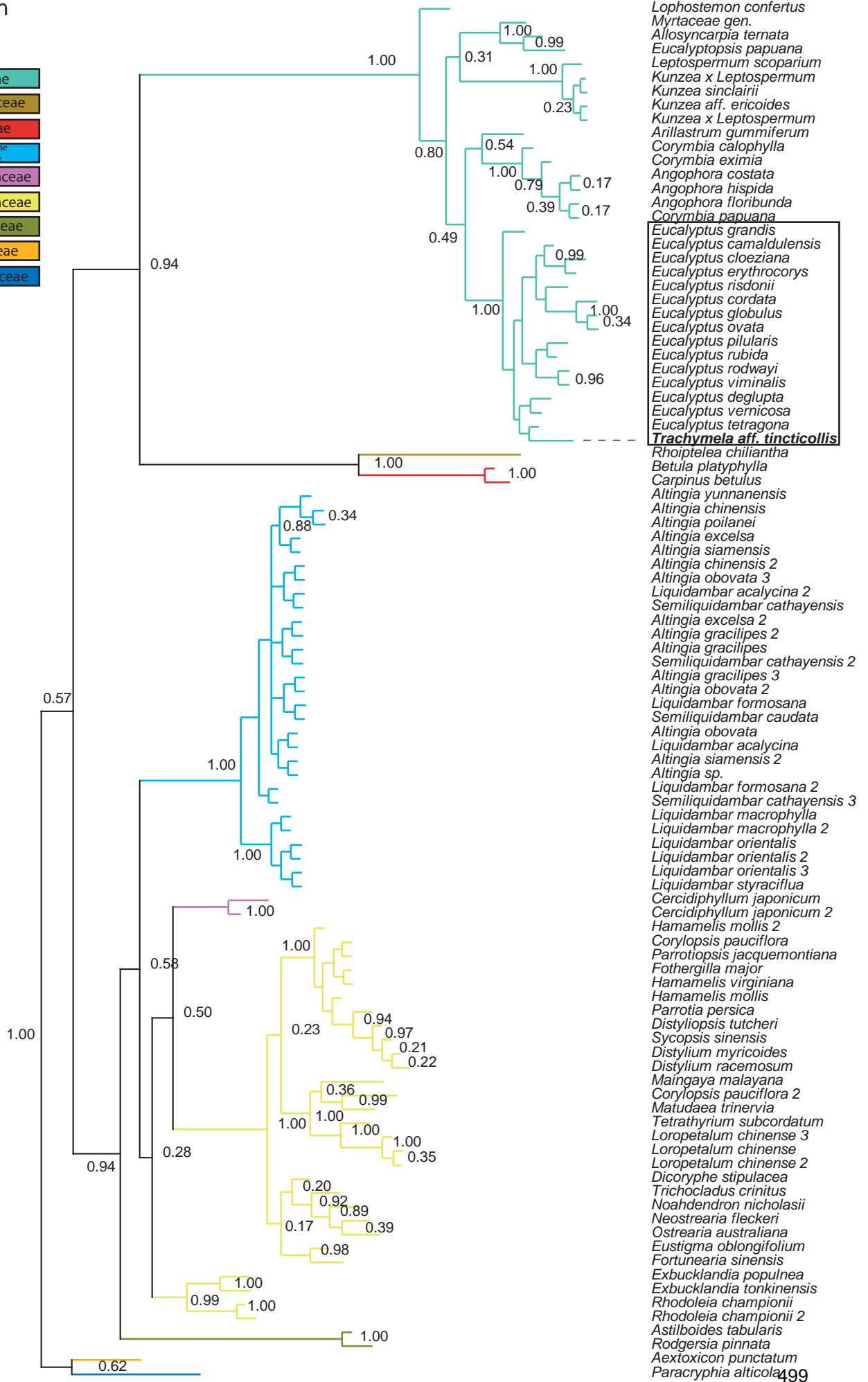
*Trachymela tincticollis* (Blackburn, 1896)  
trnL intrón loop P6



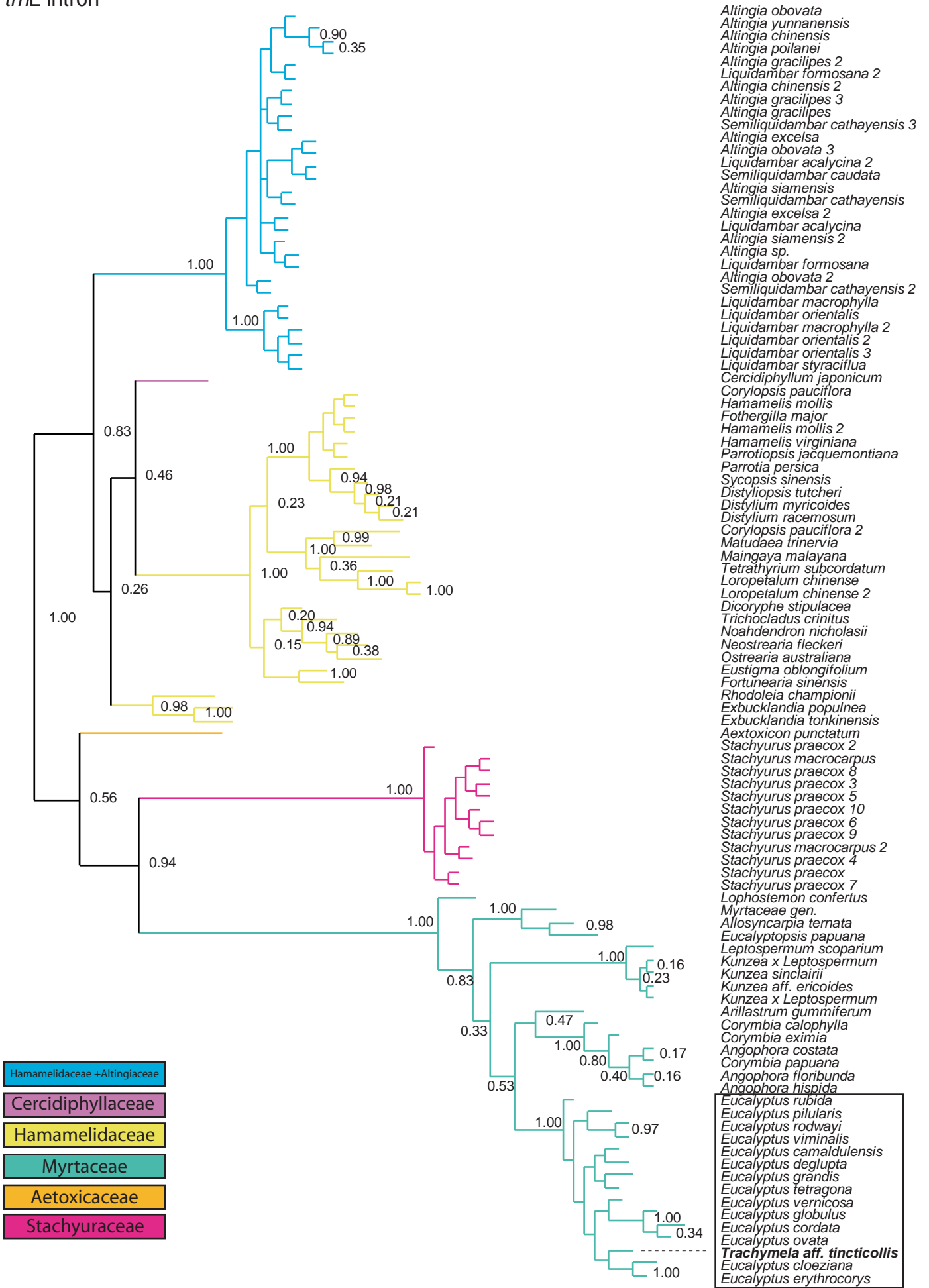
*Trachymela aff. tincticollis* (Blackburn, 1896) (JAJ163)

*trnL* intrón

- Myrtaceae
- Rhoipteleaceae
- Betulaceae
- Hamamelidaceae  
+ Altingiaceae
- Cercidiphyllaceae
- Hamamelidaceae
- Saxifragaceae
- Aetoxicaceae
- Paracryphiaceae

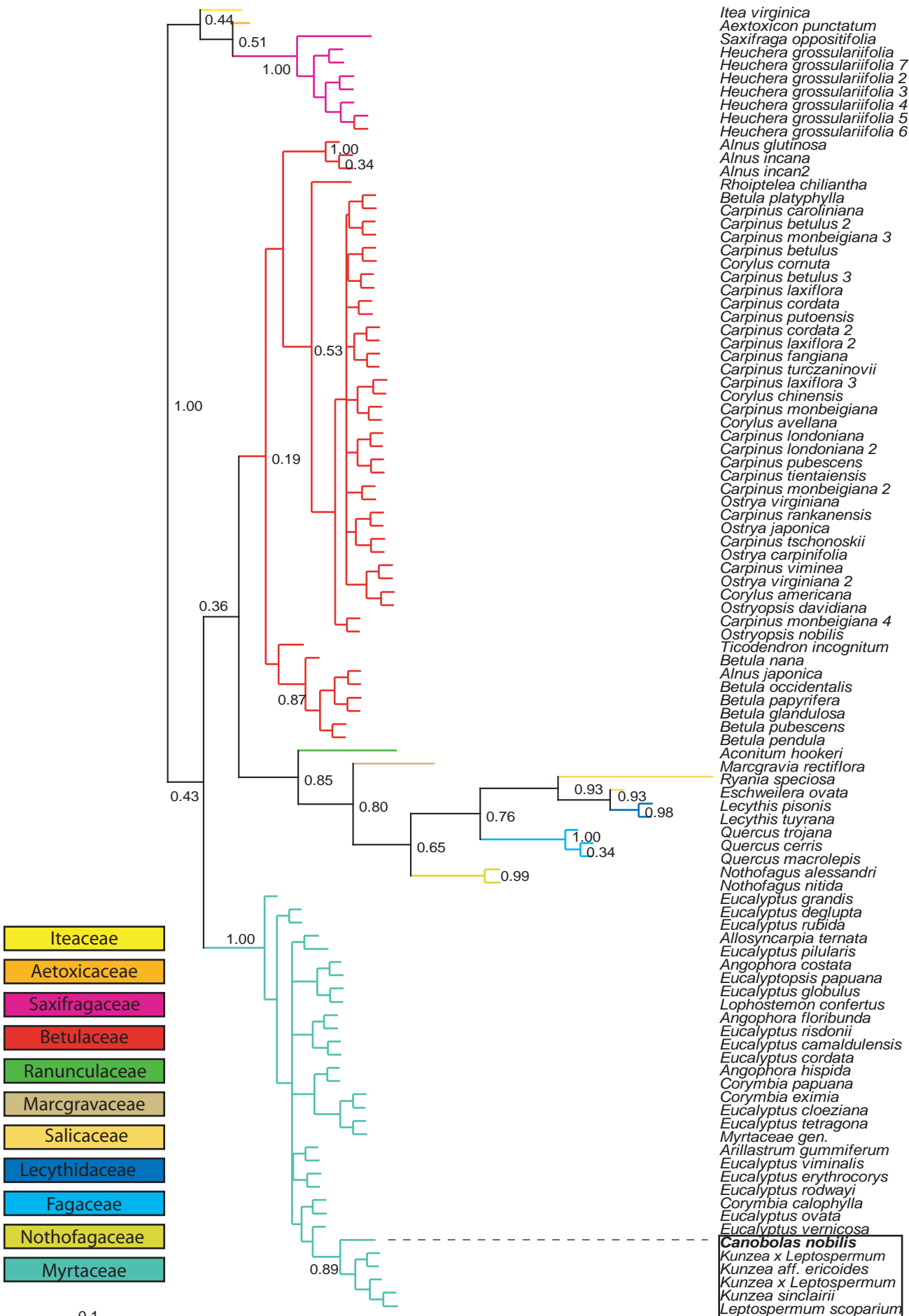


*Trachymela aff. tincticollis* (Blackburn, 1896) (JAJ164)  
trnL intrón

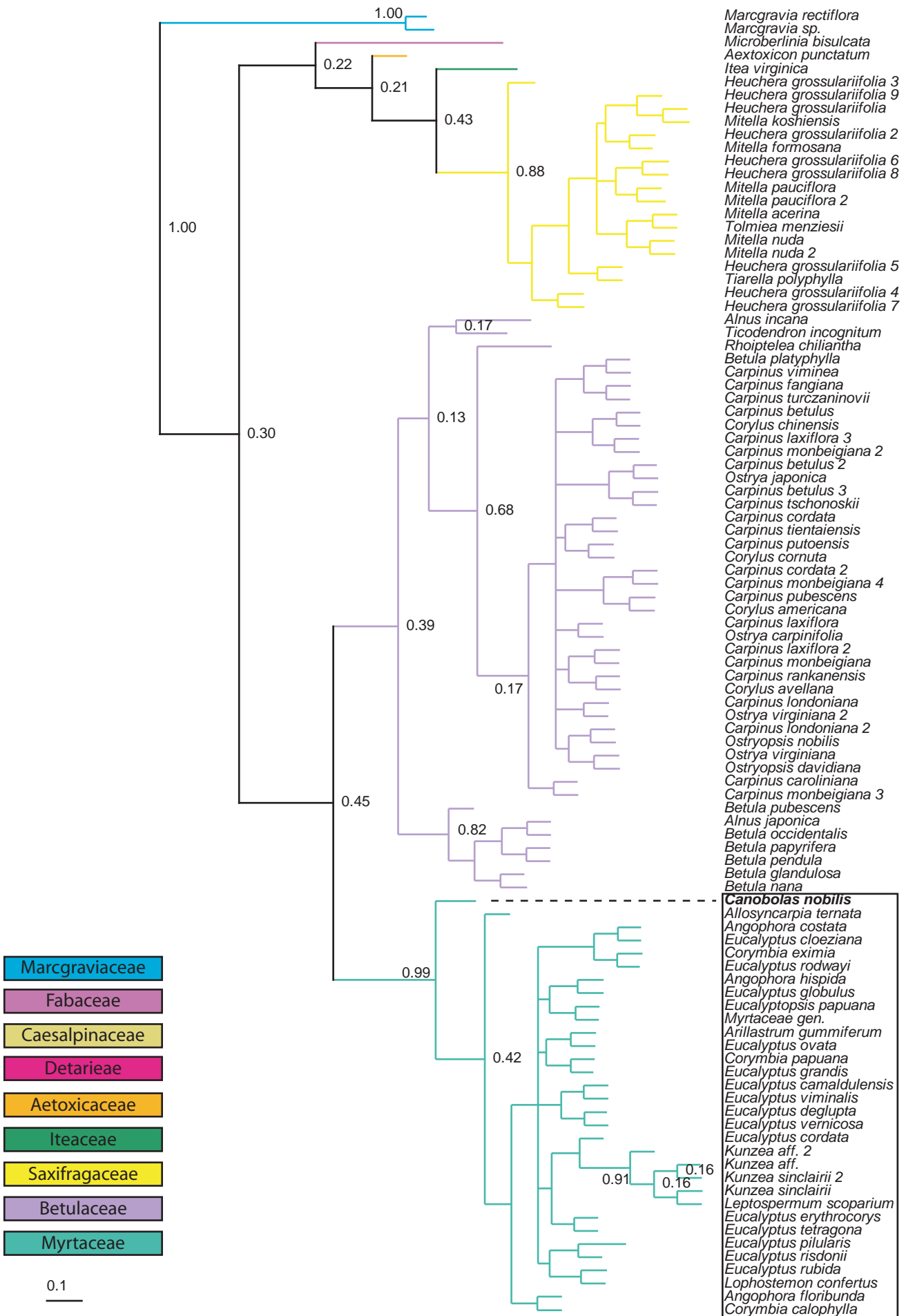


- Hamamelidaceae + Altingiaceae
- Cercidiphyllaceae
- Hamamelidaceae
- Myrtaceae
- Aetoxicaceae
- Stachyuraceae

*Canobolas nobilis* (Lea, 1917)  
trnL intrón loop P6

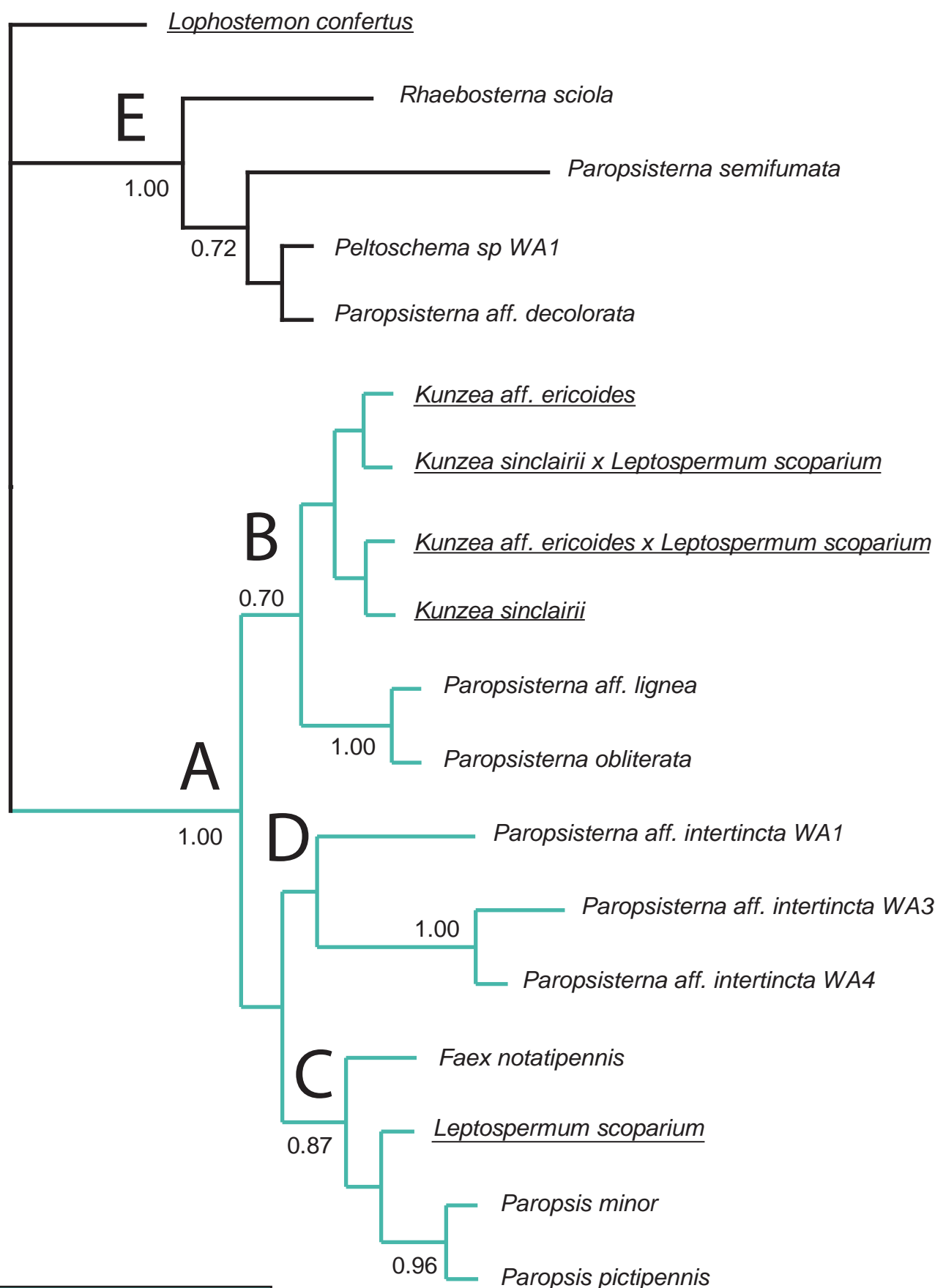


*Canobolas nobilis* (Lea, 1917)  
trnL intrón loop P6



0.1

Inferencias Kunzea-Leptospermum



Myrtaceae - Leptospermeae

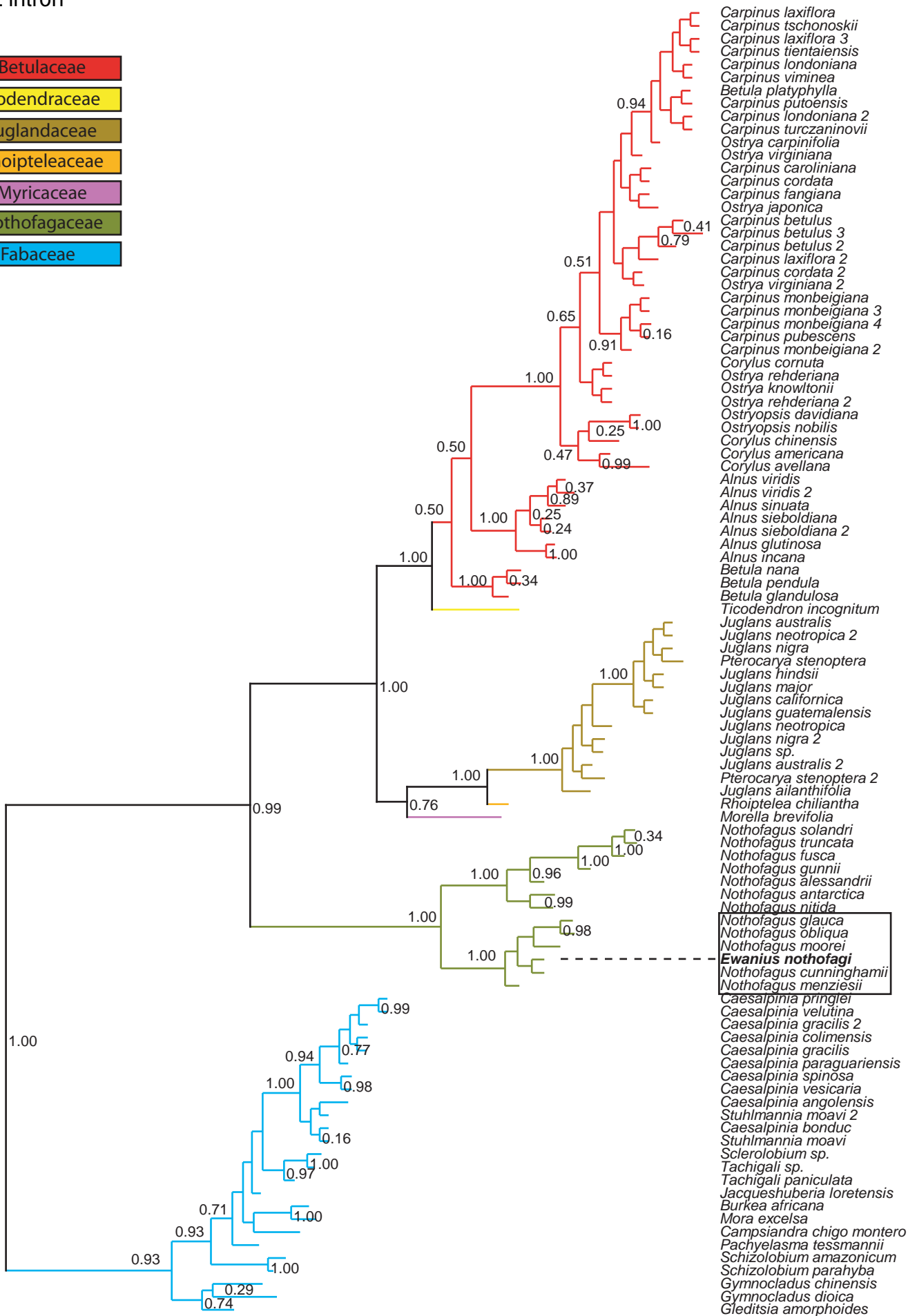
0.1

Las secuencias pertenecientes a plantas aparecen subrayadas



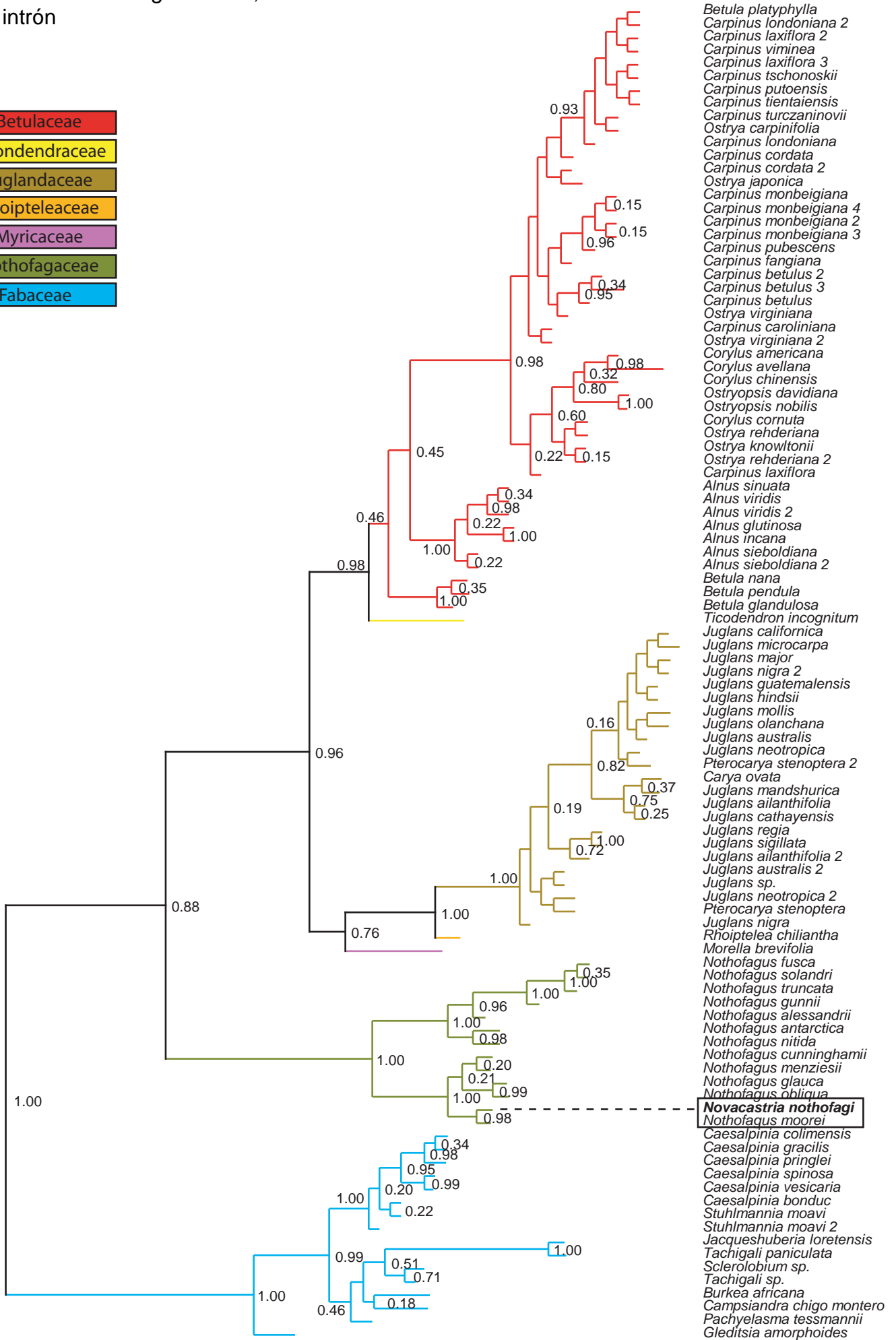
*Ewanius nothofagi* Reid, 2002  
trnL intrón

- Betulaceae
- Ticodendraceae
- Juglandaceae
- Rhoipteleaceae
- Myricaceae
- Nothofagaceae
- Fabaceae



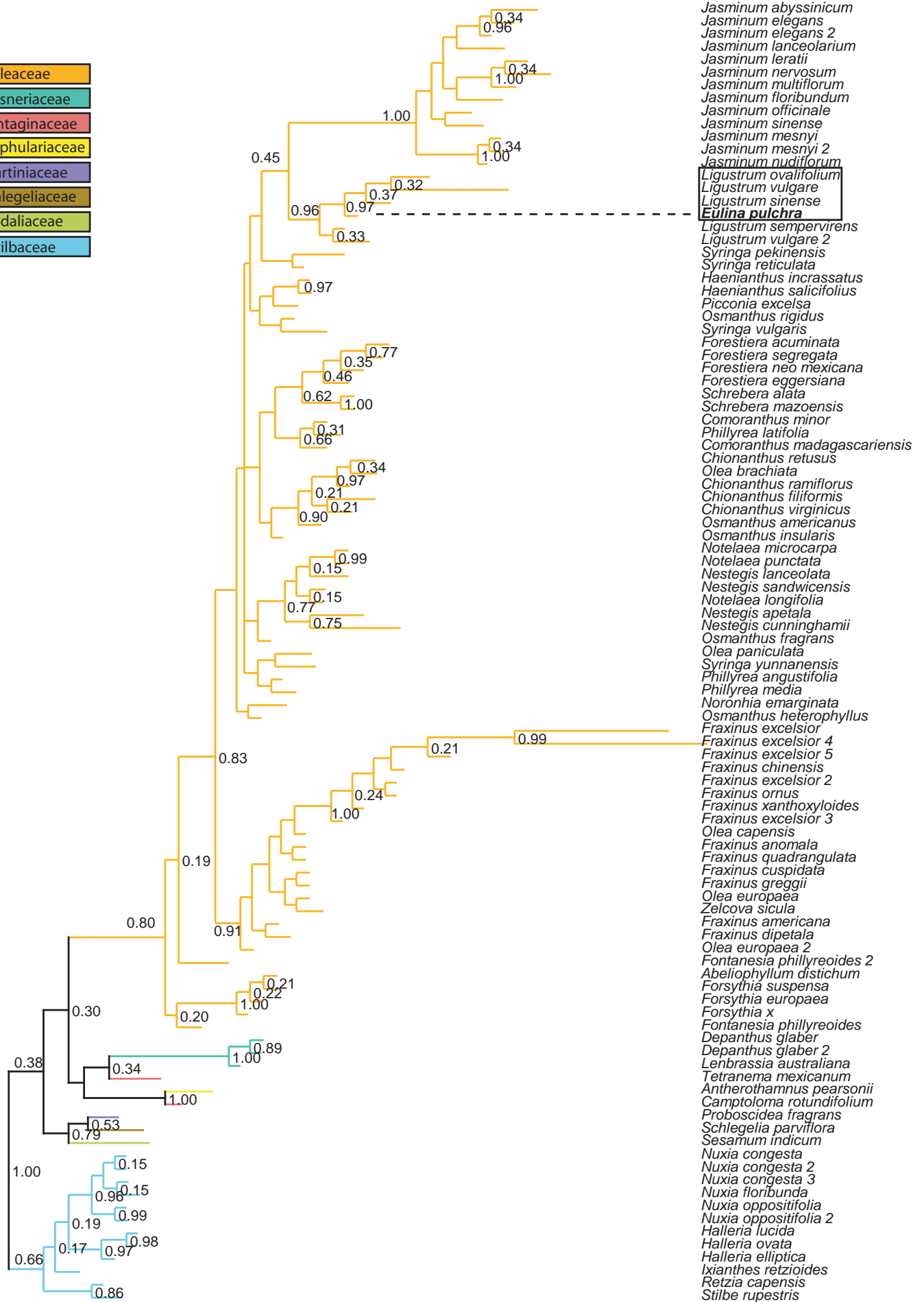
*Novacastría nothofagi* Selman, 1983  
trnL intrón

- Betulaceae
- Ticodendraceae
- Juglandaceae
- Rhoipteleaceae
- Myricaceae
- Nothofagaceae
- Fabaceae



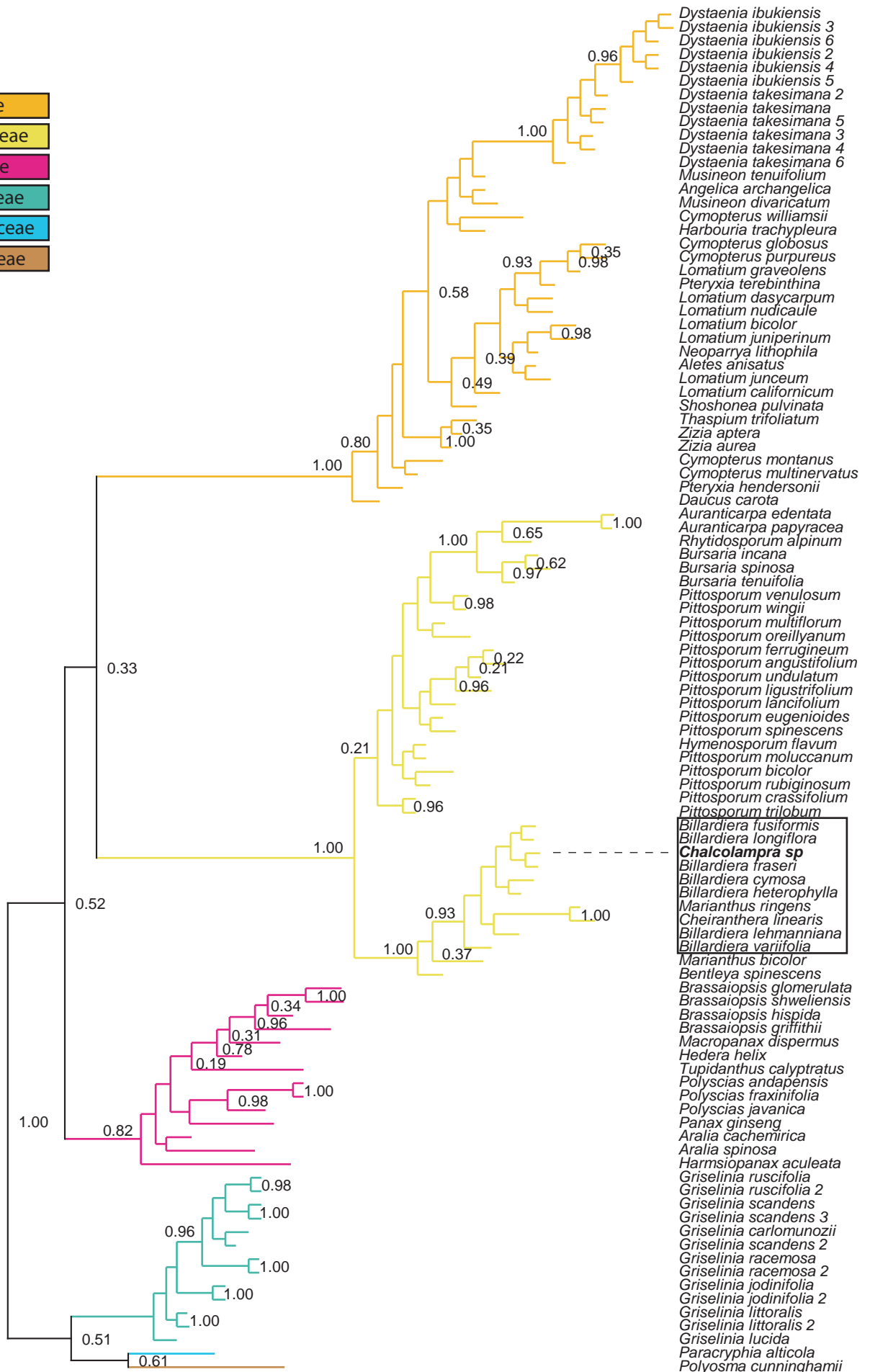
*Eulina pulchra* Lea, 1929  
trnL intrón

- Oleaceae
- Gesneriaceae
- Plantaginaceae
- Scrophulariaceae
- Martiniaceae
- Schlegeliaceae
- Pedaliaceae
- Stilbaceae



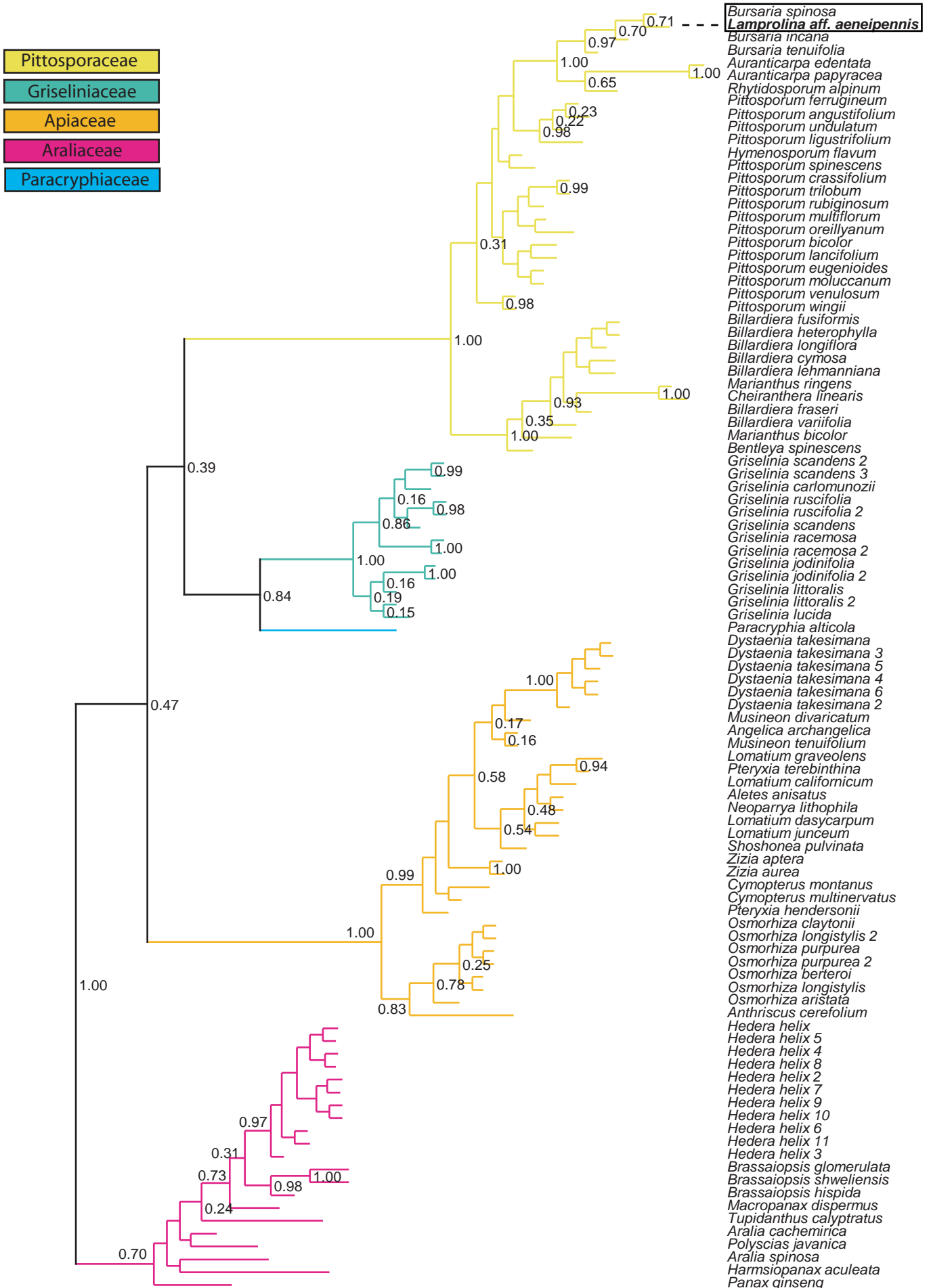
*Chalcolampra* sp. (JAJ131)  
trnL intrón

- Apiaceae
- Pittosporaceae
- Araliaceae
- Griselinaceae
- Paracryphiaceae
- Polyosmaceae



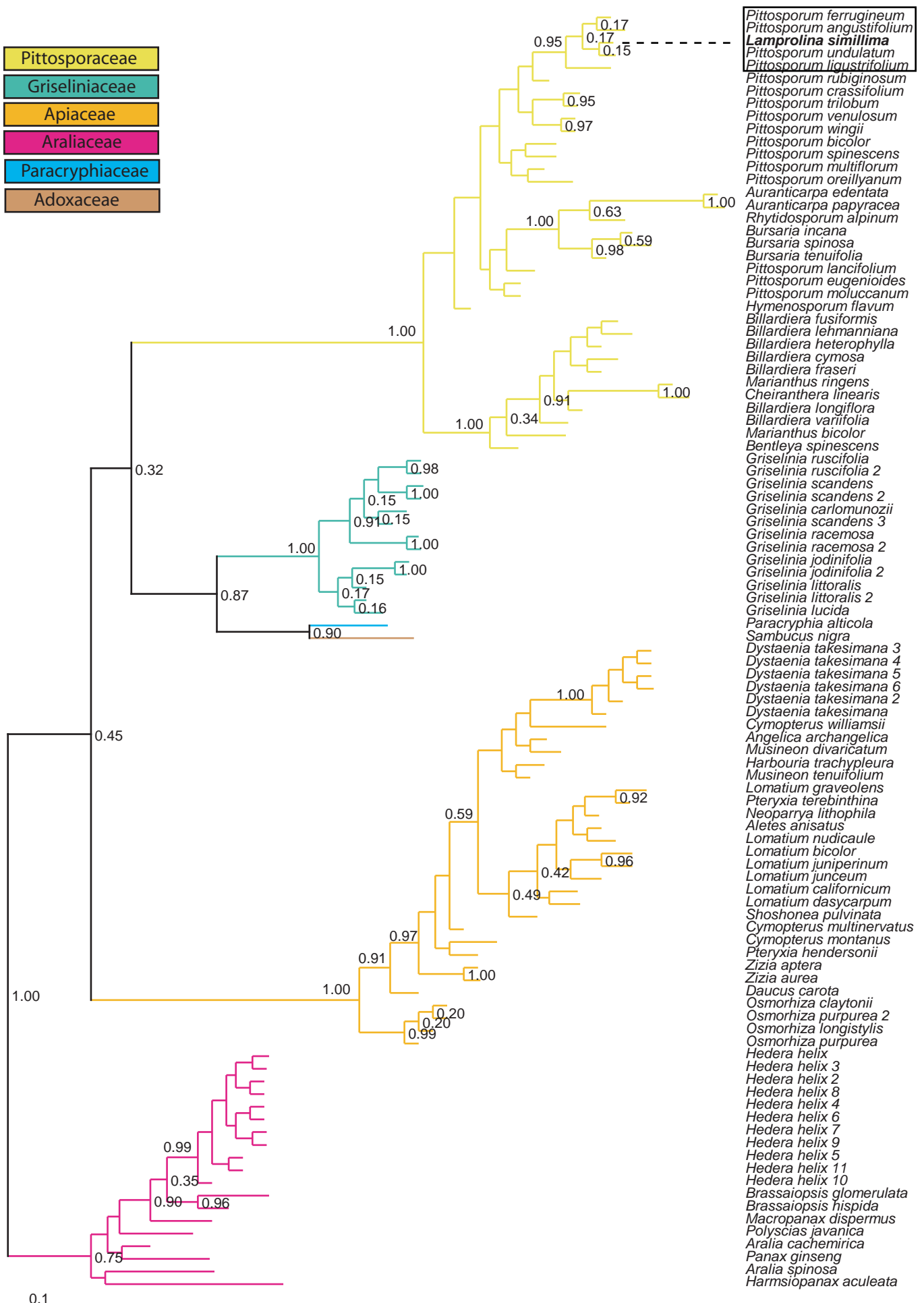
0.1

*Lamprolina aff. aeneipennis* (196180) (Boisduval, 1835)  
trnL intrón



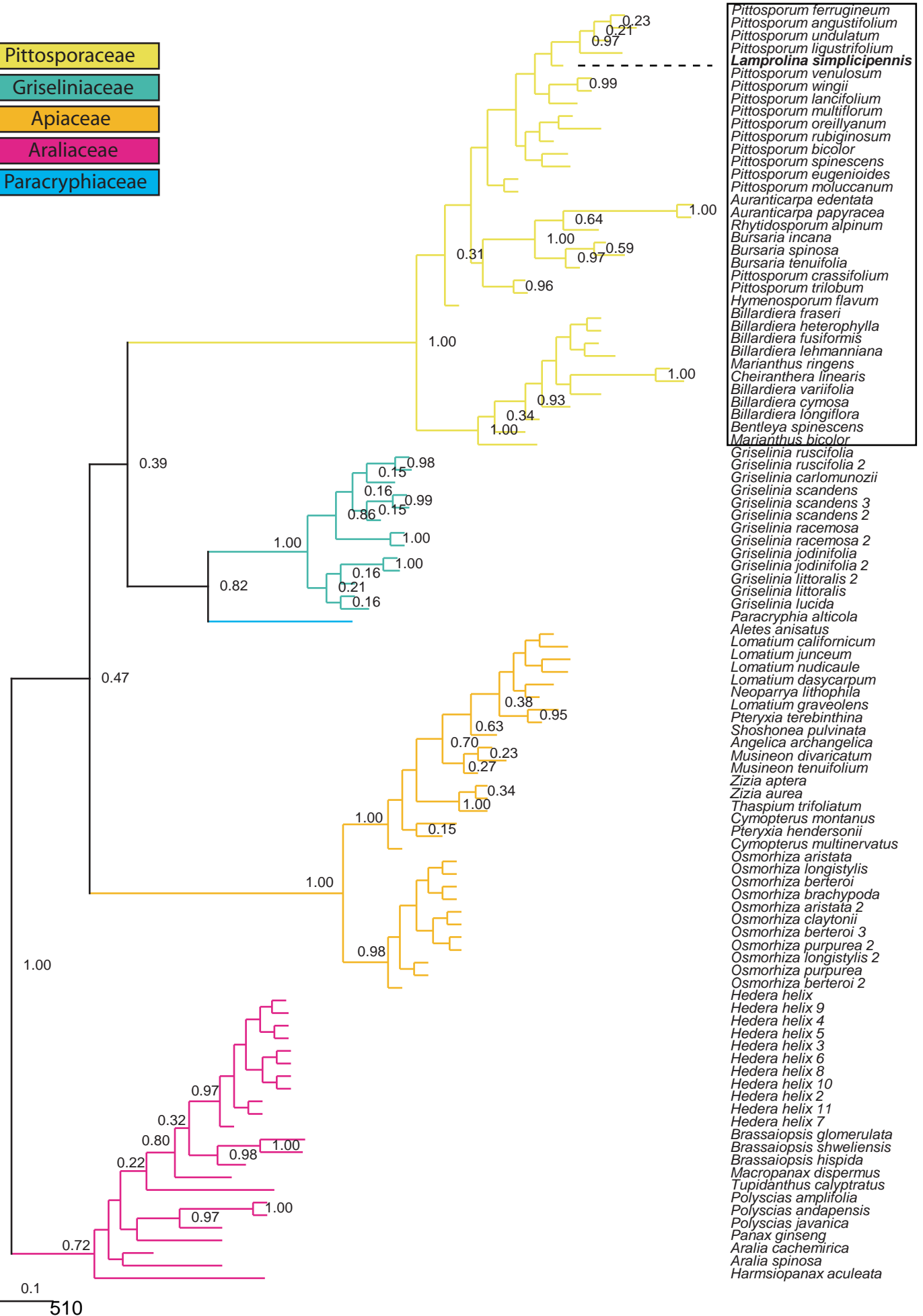
0.1

*Lamprolina simillima* Baly, 1855  
trnL intrón



*Lamprolina simplicipennis* Lea, 1916  
trnL intrón

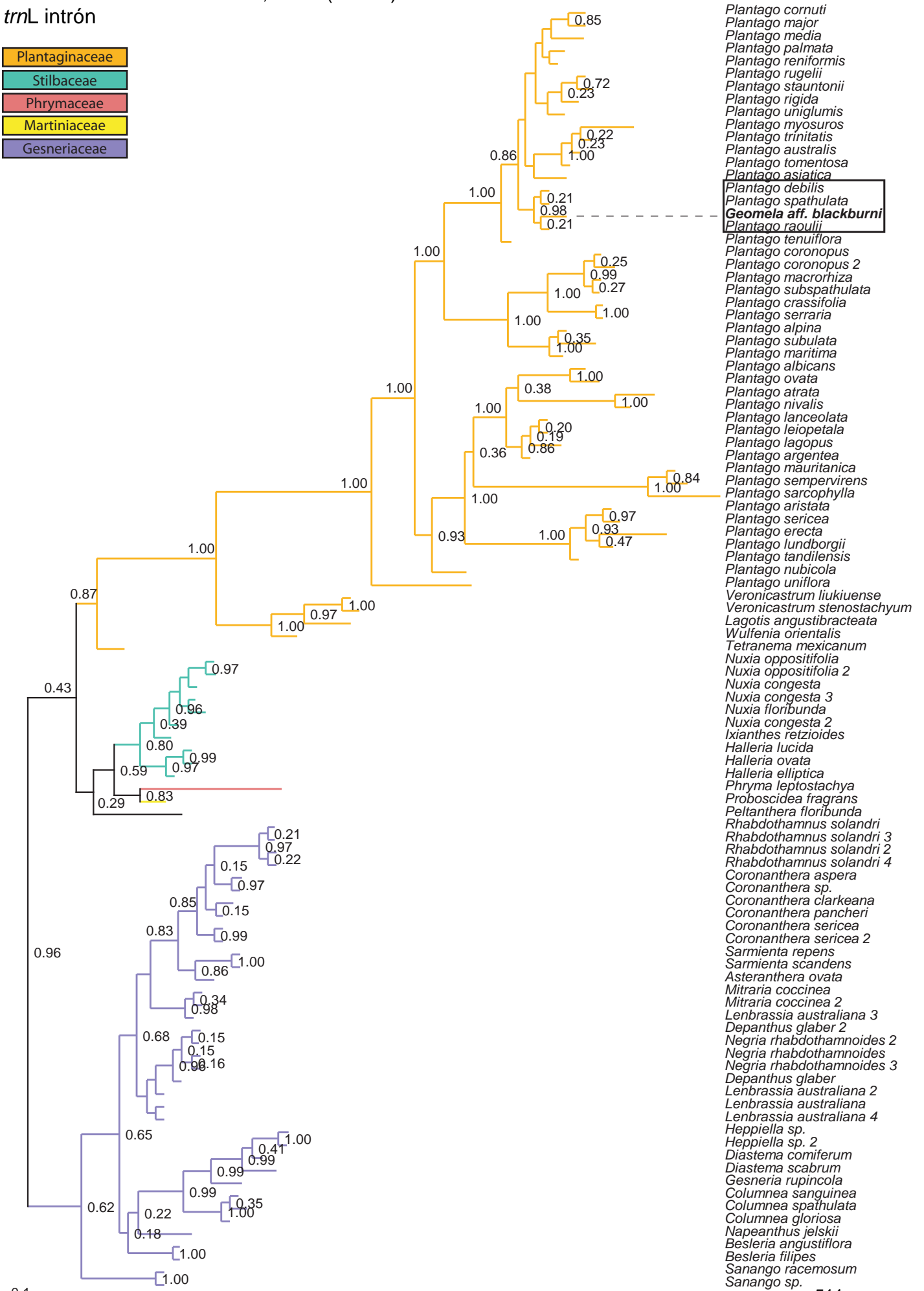
- Pittosporaceae
- Griselinaceae
- Apiaceae
- Araliaceae
- Paracryphiaceae



*Geomela aff. blackburni* Lea, 1916 (JAJ59)

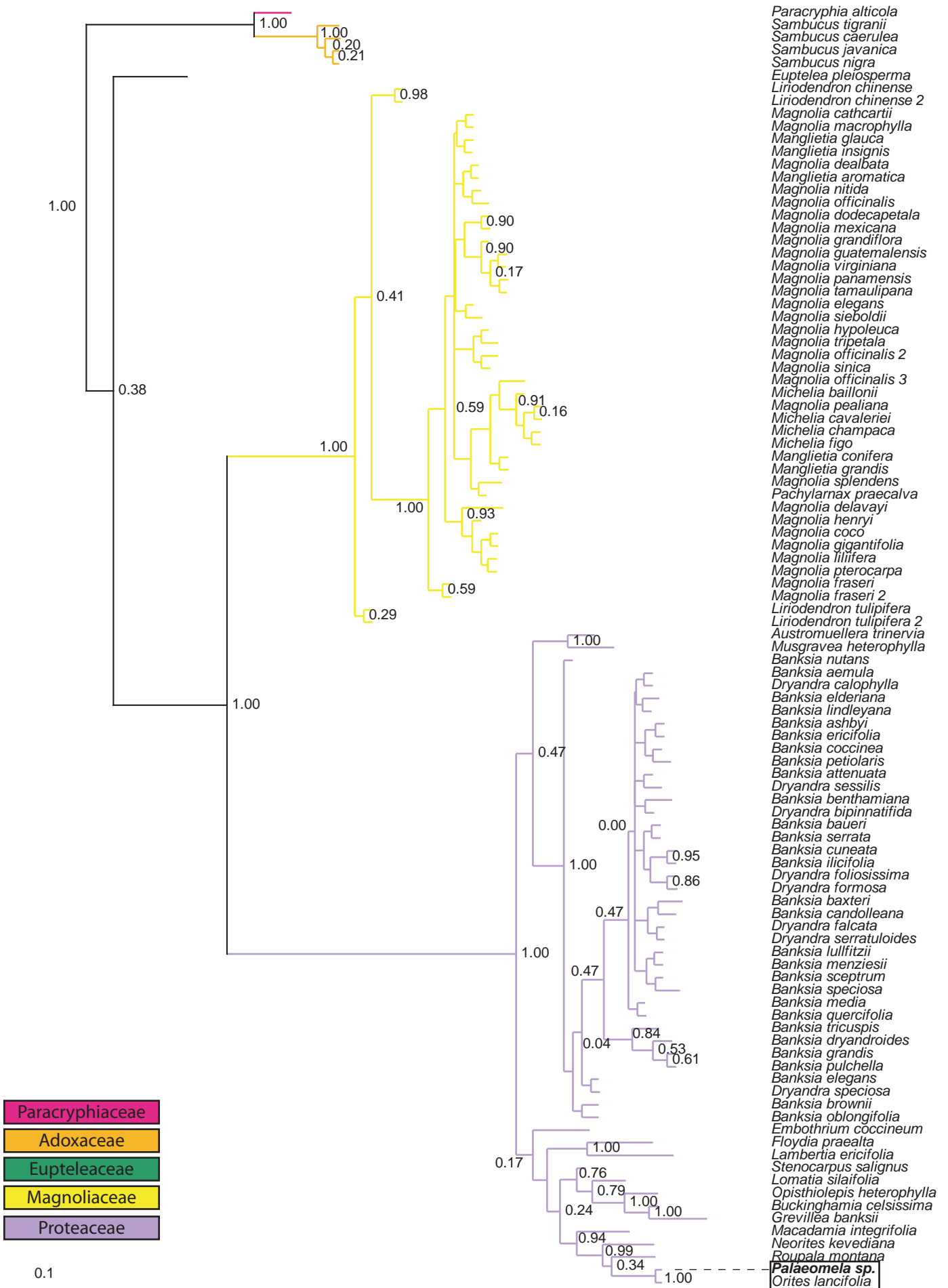
*trnL* intrón

- Plantaginaceae
- Stilbaceae
- Phrymaceae
- Martiniaceae
- Gesneriaceae





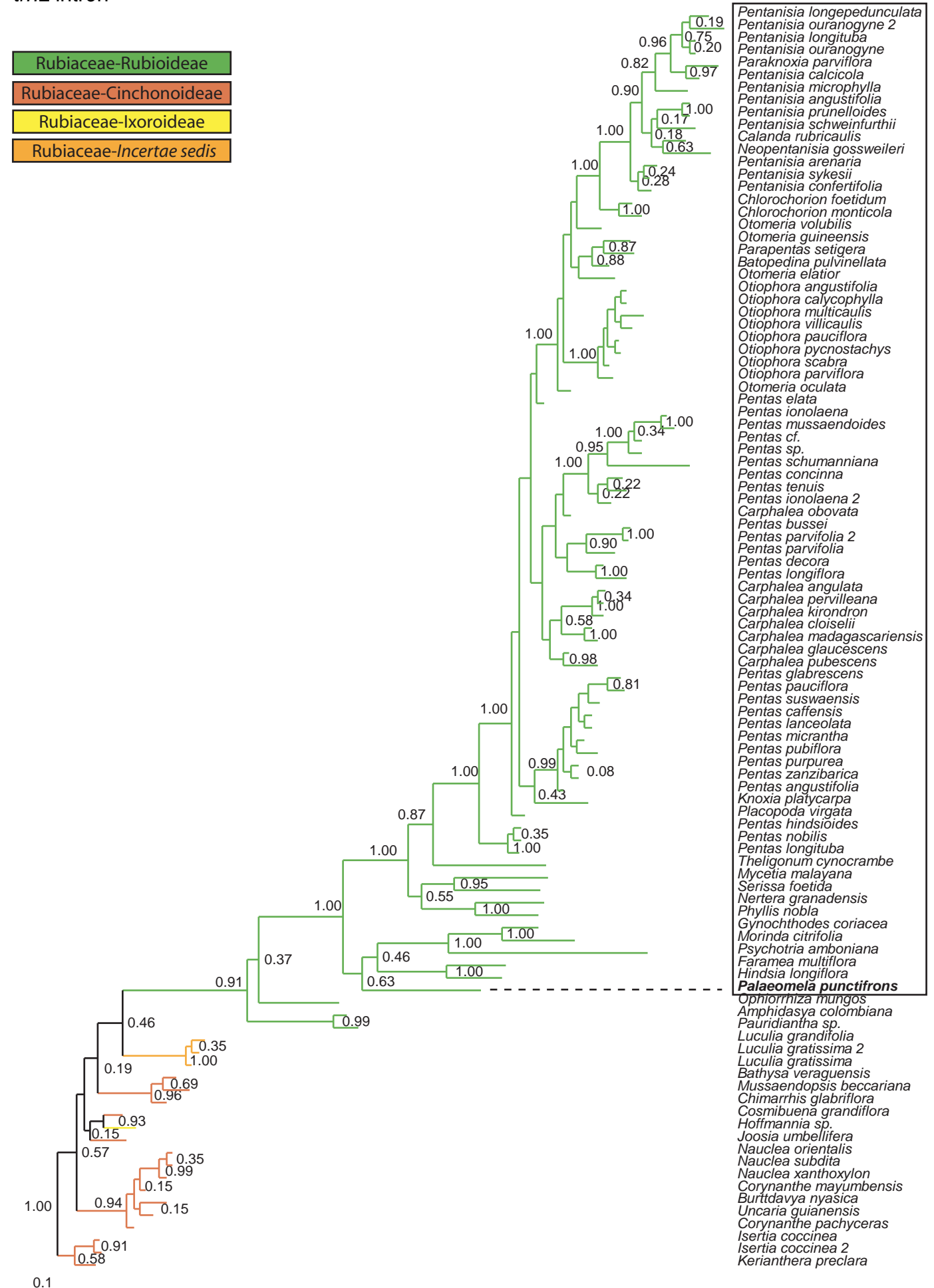
*Palaeomela* sp. (JAJ57)  
trnL intrón



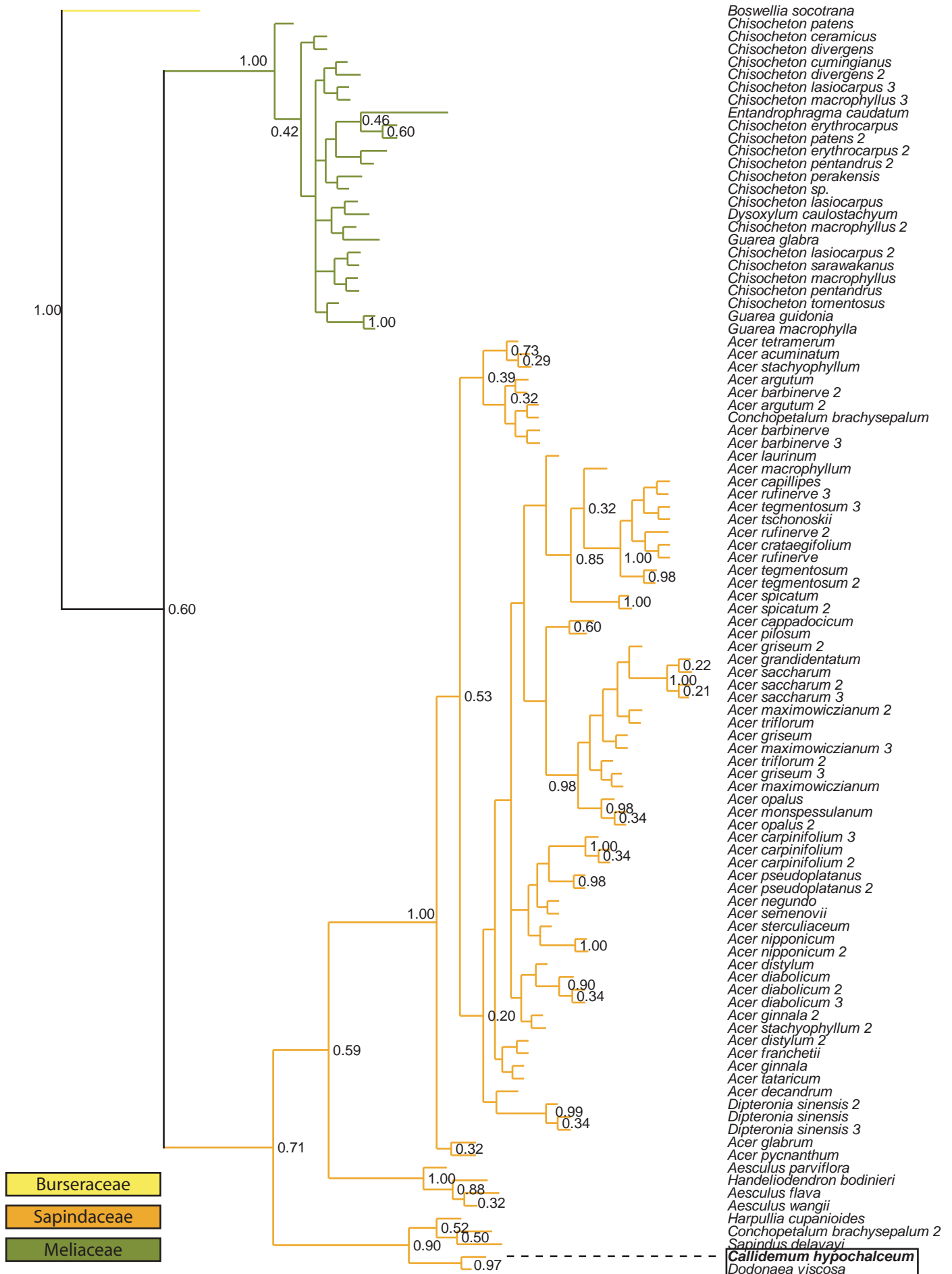
0.1

*Palaeomela punctifrons* (Lea, 1903)  
trnL intrón

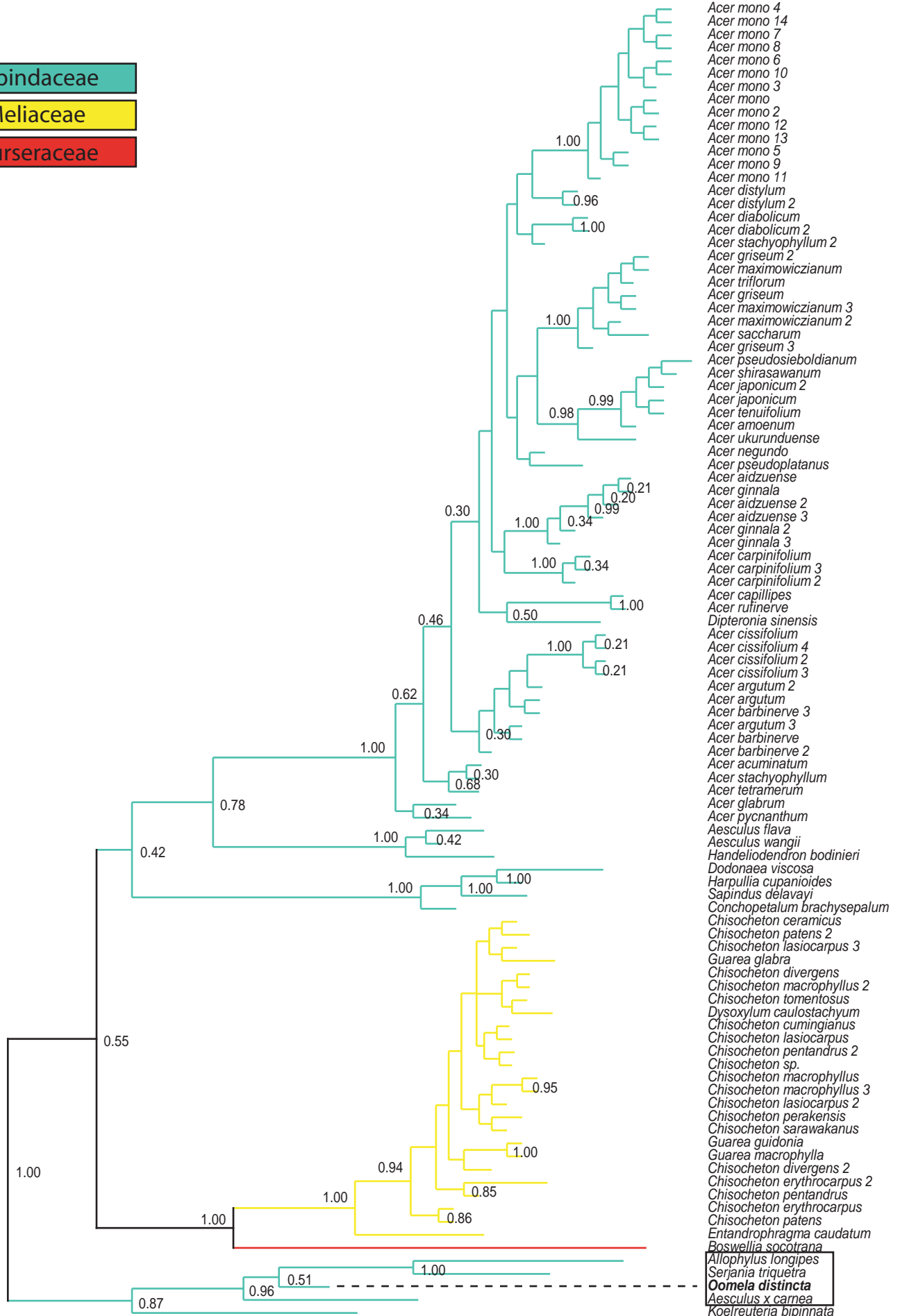
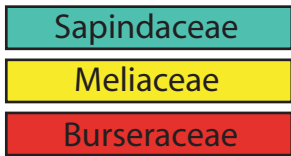
- Rubiaceae-Rubioideae
- Rubiaceae-Cinchonoideae
- Rubiaceae-Ixoroideae
- Rubiaceae-Incertae sedis



*Callidemum hypochalceum* (Germar, 1848)  
trnL intrón

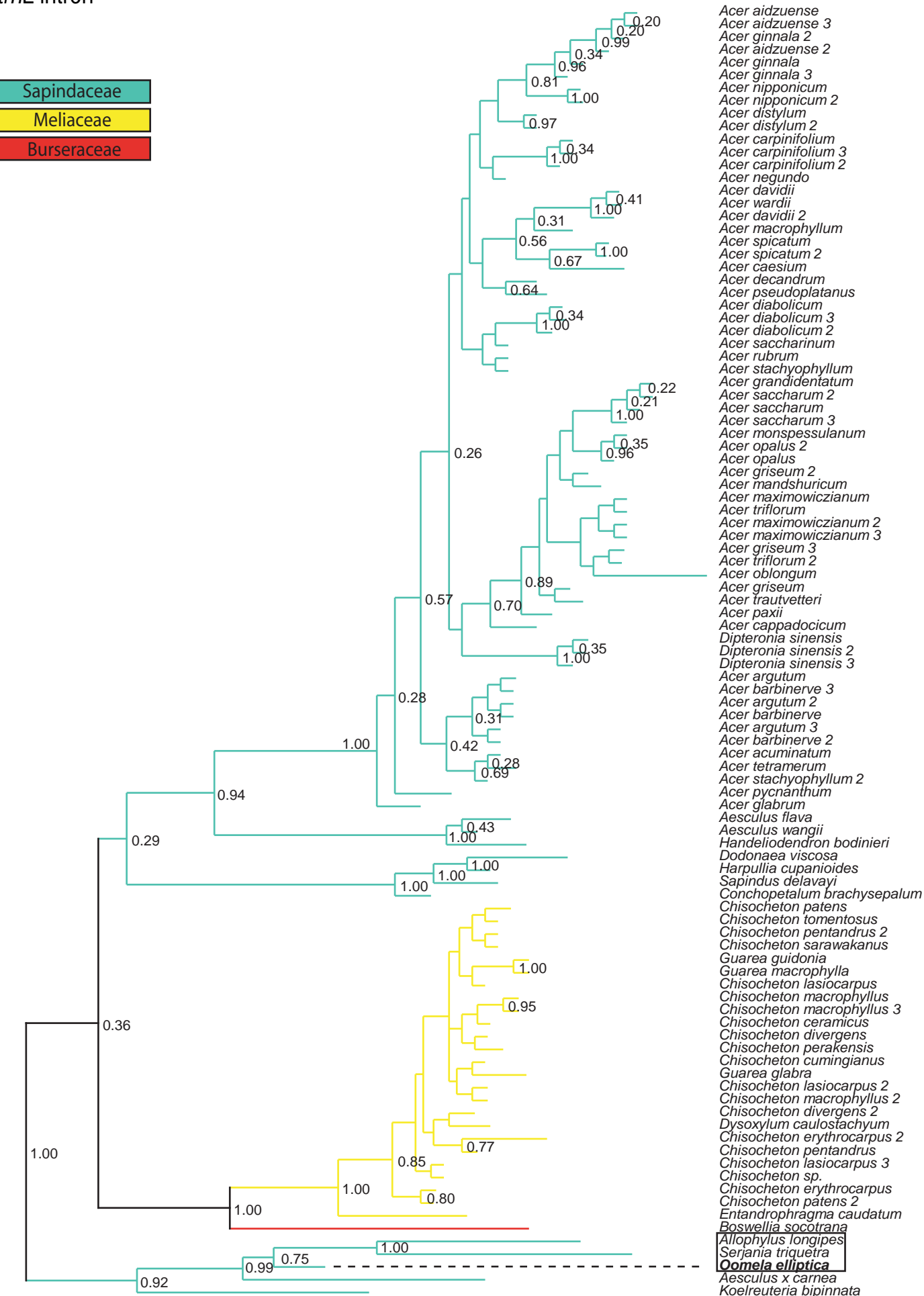
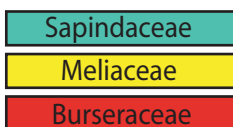


*Oomela distincta* Lea, 1917  
trnL intrón



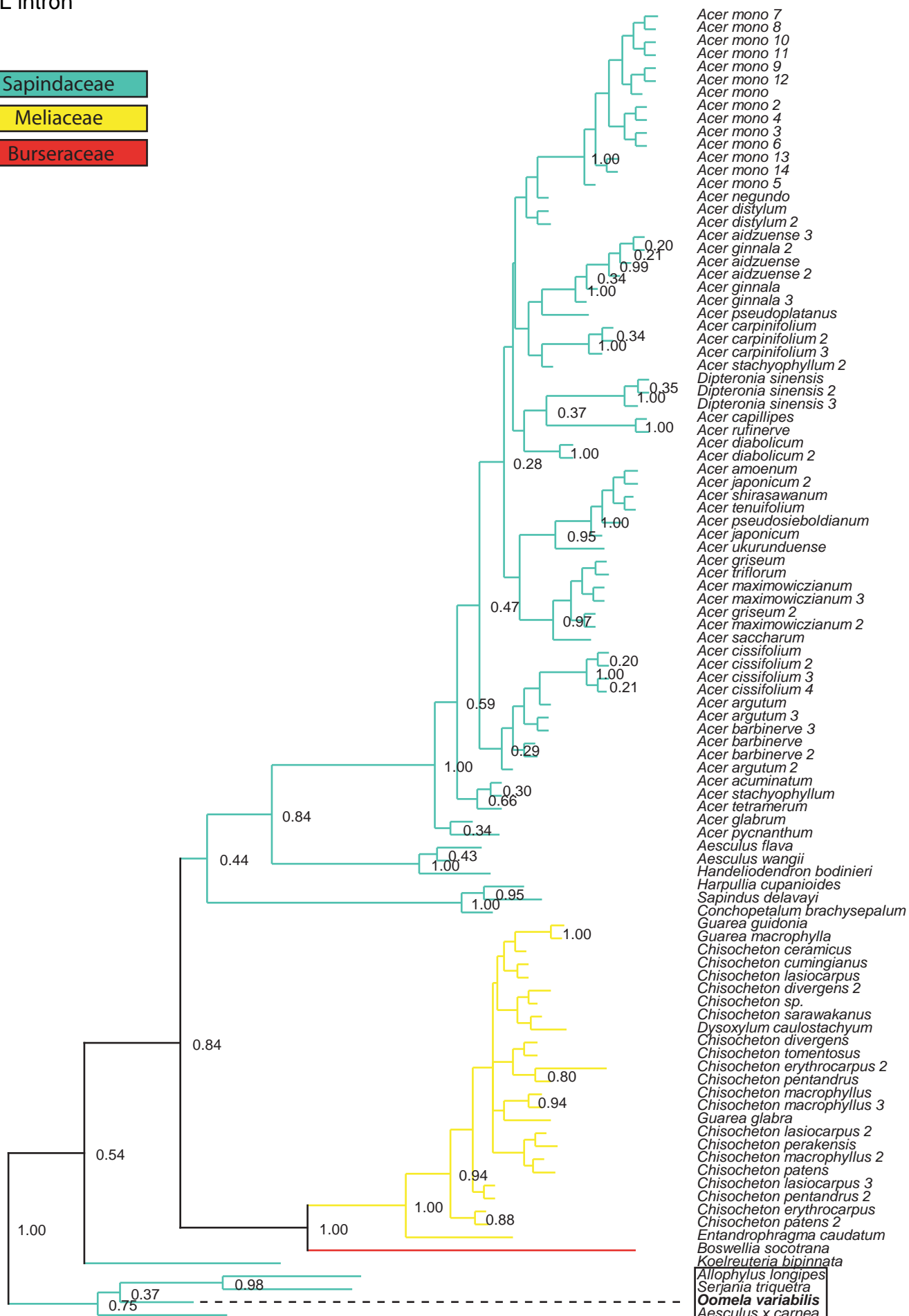
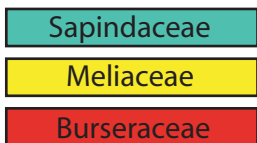
*Oomela elliptica* Lea, 1916

*trnL* intrón



*Oomela variabilis* Lea, 1916

*trnL* intrón

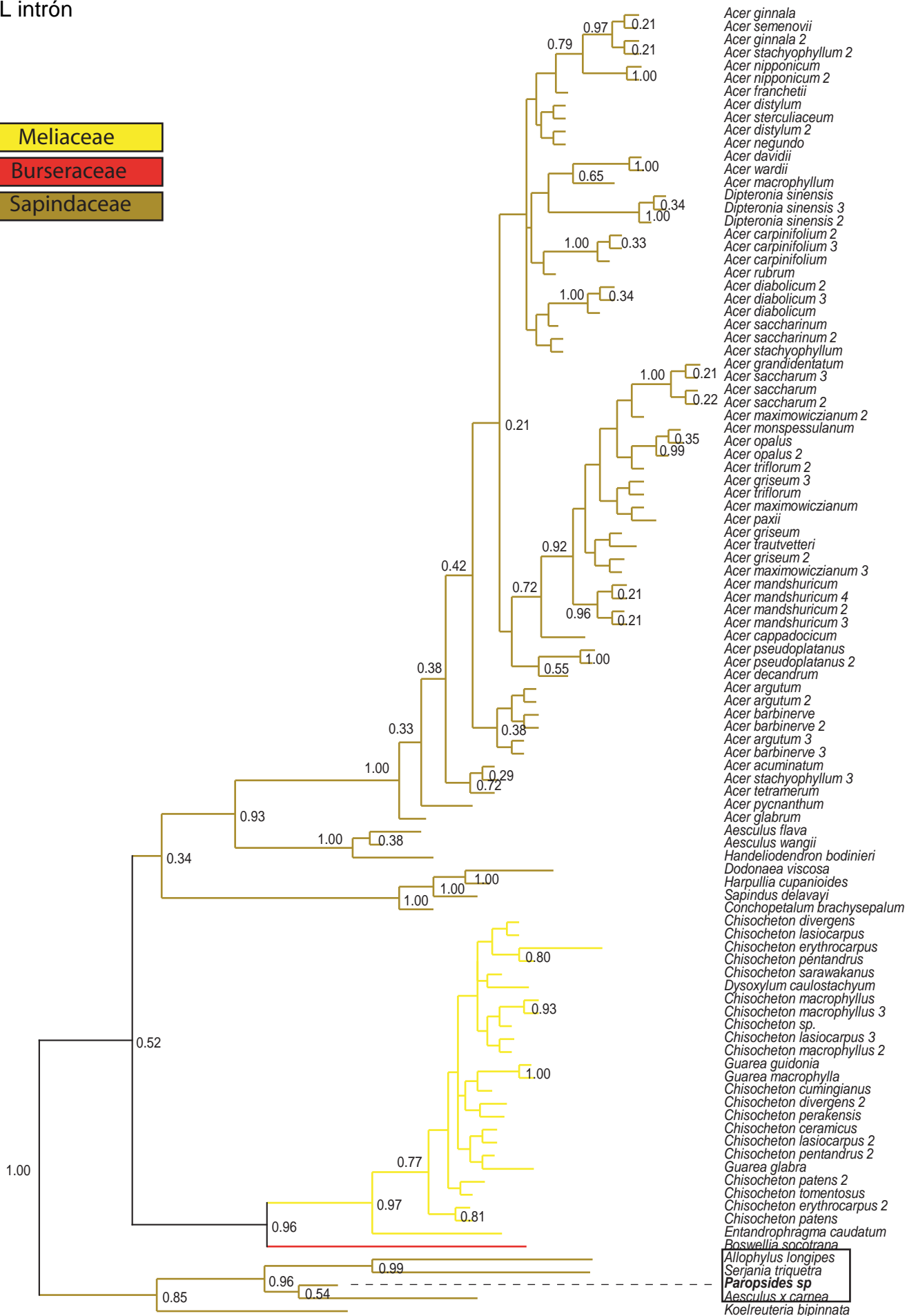


0.1

*Paropsides* sp. (JAJ92)

*trnL* intrón

- Meliaceae
- Burseraceae
- Sapindaceae

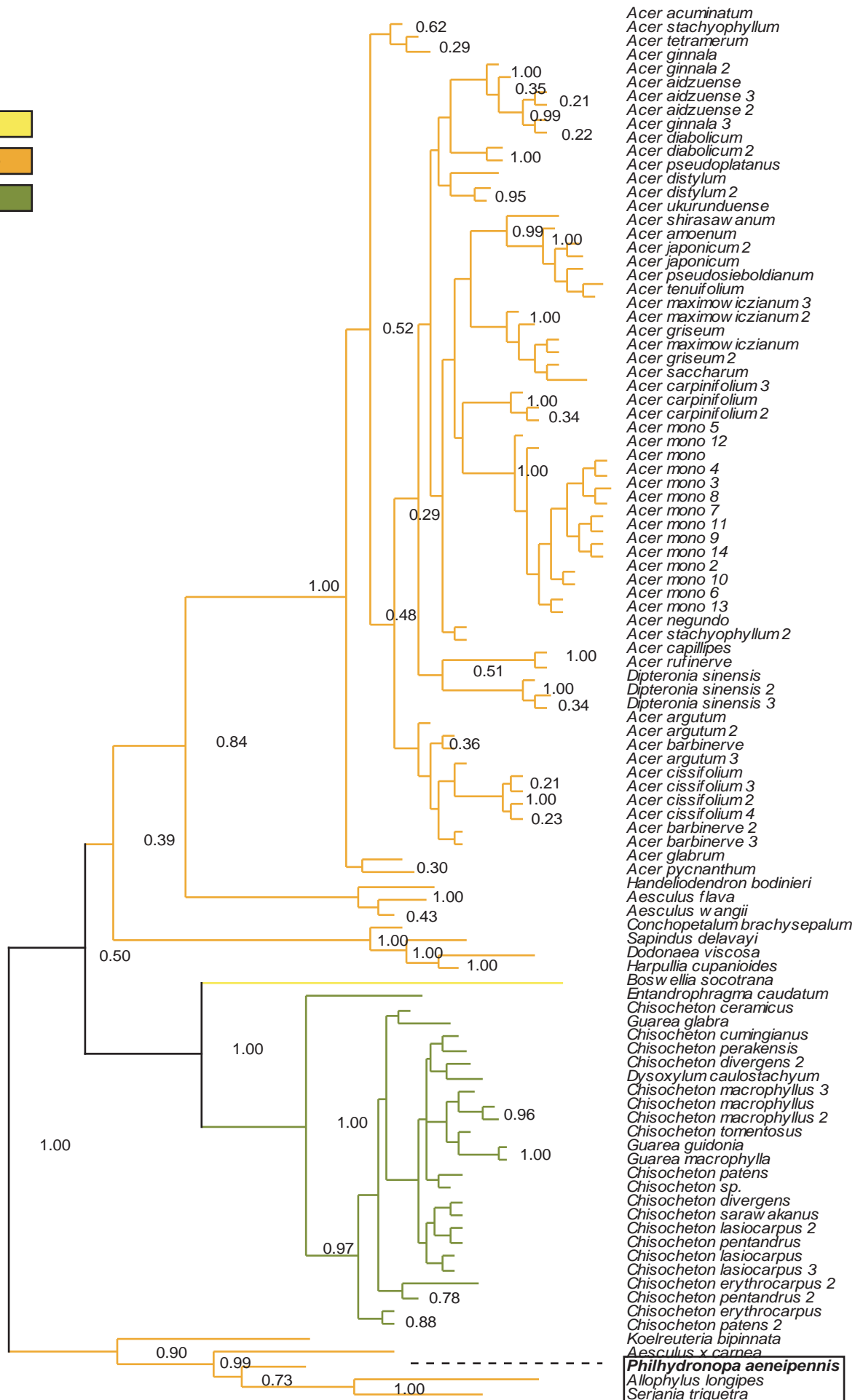


0.1

*Philhydronopa aeneipennis* (Chapuis, 1877)

*trnL* intrón

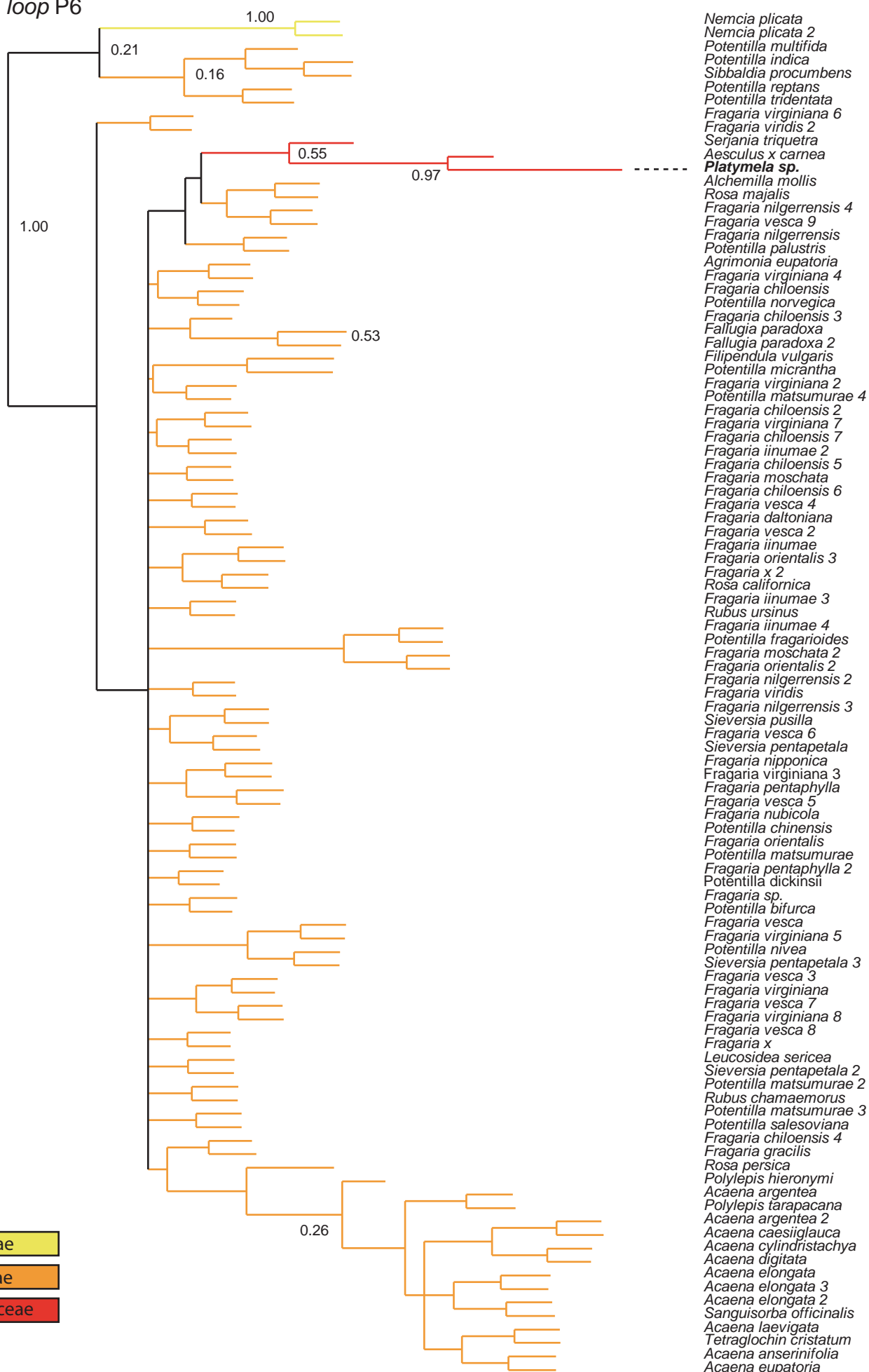
- Burseraceae
- Sapindaceae
- Meliaceae





*Platymela* sp. (JAJ89)

*trnL* intrón loop P6

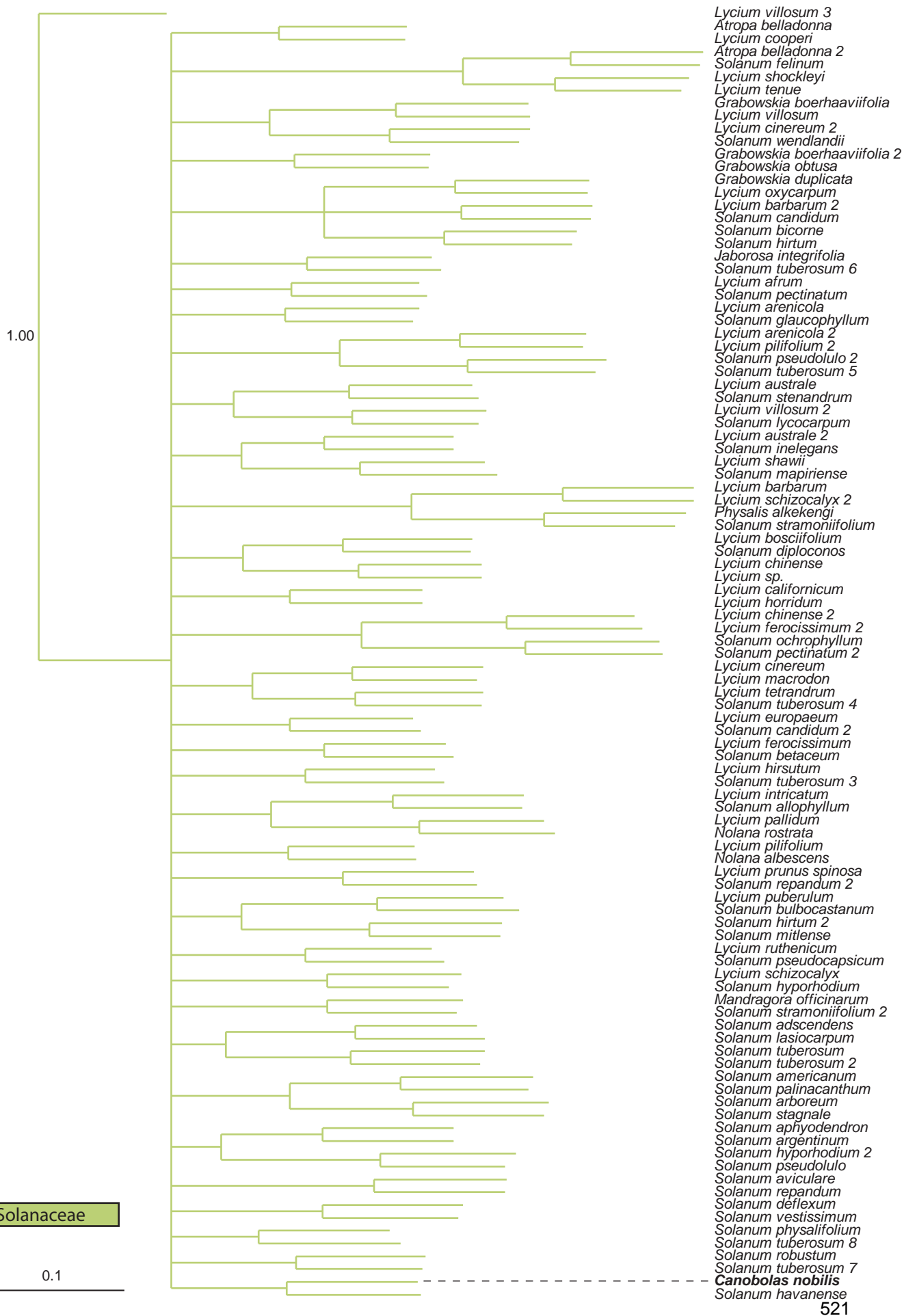


- Fabaceae
- Rosaceae
- Sapindaceae

0.1  
520

*Canobolas nobilis* (Lea, 1917)

*trnL* intrón *loop* P6





## 5.- CONCLUSIONES

El análisis filogenético combinado de los marcadores moleculares *cox1*, *rrnL*, LSU, EF1a y CAD permite la identificación de los principales linajes evolutivos dentro de subfamilia Chrysomelinae. La contribución de los marcadores en cuanto a señal filogenética es desigual, destacando *cox1* como la región más informativa seguida de CAD, *rrnL* y EF1a. La señal filogenética del marcador LSU es muy reducida.

Las hipótesis filogenéticas recuperadas son congruentes entre sí con independencia del número de taxones y de la proporción de posiciones indeterminadas en las matrices de secuencias de ADN alineadas. La filogenia molecular aquí presentada permite el establecimiento de un sistema de clasificación supragenérico para la subfamilia Chrysomelinae: tribus Timarchini y Chrysomelini. La tribu Chrysomelini se puede a su vez dividir en varias subtribus, entre las que se incluyen Chrysomelina, Doryphorina, Phyllocharitina, Entomoscelina y Gonioctenina. A nivel supragenérico, las principales diferencias detectadas con las propuestas taxonómicas anteriores se corresponden con la posición basal en la subfamilia del género endémico de Nueva Zelanda *Aphilon*, la corroboración de la subtribu Doryphorina (tribu Doryphorini *sensu* Kippenberg, 2010) como linaje evolutivo independiente de Gonioctenini (*sensu* Reid (2002), y la pertenencia del endemismo chileno *Araucanomela* a la tribu Phyllocharitini en lugar de al grupo de los goniocteninos como hasta ahora se había pensado. A nivel intragenérico, nuestro estudio contribuye evidencias a favor de la no monofilia de varios géneros tal y como se definen actualmente, sugiriendo la necesidad de revisiones y reorganizaciones taxonómicas para *Callidemum*, *Chalcolampra*, *Chrysolina*, *Paropsisterna*, *Paropsides* y *Peltoschema*. A nivel intergenérico, la filogenia molecular permite la identificación de asociaciones de géneros estrechamente emparentados, facilitando la evaluación de las diversas hipótesis planteadas en este mismo sentido desde un punto de vista morfológico (e.g., Daccordi, 1994, 1996; Matthews y Reid, 2002; Reid, 2002, 2006; Daccordi y de Little, 2003; Jolivet y Verma, 2008; Reid *et al.*, 2009).

Los Chrysomelinae australianos no constituyen un linaje monofilético, por inclusión en el clado que los agrupa de linajes presentes en otras regiones biogeográficas: *Araucanomela*, *Colaspidema*, *Cystocnemis*, *Entomoscelis*, *Gasterantodes*, *Gonioctena*, *Jolivetia*, *Pataya*, *Oreomela* y *Zira*. Esta lista se extendería a todos los géneros de la subfamilia Chrysomelinae excepto *Aphilon* y

Timarchini si se tuviese en cuenta la presencia en Australia del género cosmopolita *Plagiodera*.

El origen de la subfamilia Chrysomelinae se remonta a finales del periodo Cretácico hace unos 76 Ma, probablemente en el territorio que hoy día comprende la región Holártica. El origen de los linajes australianos (sin considerar a *Plagiodera*) se remonta al Eoceno hace unos 42 Ma, cuando Australia aún formaba parte junto con la Antártida y Sudamérica de la provincia Weddeliana. Las subtribus Phyllocharitina, Entomoscelina y Gonioctenina, así como los linajes identificados en nuestro estudio como “clados I, J y K” (Figura 4.1-18), surgieron y evolucionaron en dicha región, en un entorno cálido y húmedo no estacional dominado por formaciones vegetales de tipo *rainforest*. El aislamiento tectónico de Australia hace 30 Ma y el subsiguiente cambio climático hacia condiciones más frías y secas determinaron la contracción de los *rainforests* y la expansión de una flora de tipo esclerófilo. Una gran proporción de los géneros se refugió en los ambientes húmedos y apenas se han diversificado desde entonces o alternativamente han experimentado una elevada tasa de extinción, mientras que otros como *Paropsis*, *Paropsisterna*, *Peltoschema* o *Trachymela* radiaron considerablemente en el nuevo ambiente esclerófilo y hoy día contienen más de la mitad de las especies de crisomelinos australianos. La historia evolutiva de los crisomelinos australianos está relacionada con la de sus plantas hospedadoras. Entre los linajes que evolucionaron en el continente australiano tras su aislamiento, las especies del clado de divergencia temprana representado por la subtribu Phyllocharina están tróficamente especializados en especies vegetales del grupo de las astéridas, mientras que el grupo más derivado integrado por la tribu Gonioctenina lo están en el de las rósidas. La alimentación sobre astéridas o sobre rósidas parece ser el carácter ecológico ancestral de la fauna australiana, a partir del cual tuvieron lugar diferentes episodios de cambios de hospedador en ambientes de *rainforest*. Crisomelinos ancestrales con una alimentación adaptada a la vegetación esclerófila incipiente en los sistemas de *rainforest* secundaron a sus linajes hospedadores en la colonización del nuevo entorno semiárido tras la contracción de los *rainforests*.

La relación filogenética y el tiempo de divergencia entre el género endémico de Australia *Palaeomela* y los endemismos sudamericanos *Jolivetia* y *Pataya* parecen reflejar la fragmentación tectónica de la provincia Weddeliana. La distribuciones transantárticas de los géneros estrechamente emparentados *Araucanomela* (Chile) y *Oomela* (Australia) responden a un patrón de dispersión posterior a la separación de sus respectivos continentes. La colisión entre las placas continentales australiana y

pacífica hace unos 23 Ma es compatible con los tiempos de divergencia obtenidos para los géneros con especies en Australia y en la región Indo-Pacífica (e.g., *Chalcolampra*, *Phola*, *Phyllocharis* y *Promechus*), sugiriendo un origen australiano para los mismos. El género endémico de Nueva Caledonia *Zira* también proviene de ancestros australianos.

De los cuatro marcadores moleculares utilizados en las especies del género *Calomela*, *cox1*, CAD e ITS2 poseen unos niveles de señal filogenética que los hacen recomendables de cara a resolver las relaciones sus evolutivas, mientras que LSU D1-D3 muestra un poder de resolución muy reducido y por tanto no es apropiado para realizar inferencias filogenéticas en este género. Con relación a la utilización de los marcadores en la identificación molecular de especies, las secuencias tanto de *cox1* como de ITS2 garantizan la determinación directa e inequívoca de cualquier especie, mientras que CAD y LSU presentan menor potencial discriminatorio entre especies poco divergentes. A su vez, los caracteres morfológicos relacionados con la superficie del último ventrito del macho, la puntuación, coloración y forma pronotales, el ápice epipleural, la coloración de los élitros y su superficie en la zona posthumeral muestran una distribución no aleatoria sobre la filogenia molecular, permitiendo la identificación de linajes monofiléticos a niveles sistemáticos profundos. La forma corporal también muestra una correlación con la filogenia, apreciándose un gradiente progresivo que tiende a la generación de formas corporales cada vez más alargadas a partir de formas plesiomórficas redondeadas. Nuestros datos demuestran además el carácter parafilético de la forma de las uñas en *Calomela*, un atributo al que tradicionalmente se le ha dado una gran importancia a la hora de tomar decisiones taxonómicas en este grupo de organismos.

El aislamiento genético detectado entre poblaciones de especies de *Calomela* propias de *rainforests* pone de manifiesto una baja capacidad dispersiva en estos taxones que es atribuible a una menor capacidad voladora y a la fragmentación espacial de su hábitat natural, características que podrían asociarse a su forma, diferenciada de las especies propias de ambientes esclerófilos.

El presente estudio contribuye una filogenia molecular para quince especies de *Calomela* con un elevado nivel de resolución y soporte, en la que se demuestra además el carácter monofilético de todos los taxones para los que se han secuenciado dos o más individuos. La vinculación del grado formado por las especies *C. fugitiva*, *C. pulchella* y *C. ruficeps* a los sistemas de tipo *rainforest*, hábito considerado por tanto

como una plesiomorfía, hace que la asociación de las doce especies restantes con los ambientes más secos represente un carácter derivado. Así, el origen del género *Calomela* se remonta a los primitivos sistemas de bosque pluvial que dominaban el continente australiano en el Oligoceno tardío, y donde ya empezaban a diferenciarse las primeras formaciones vegetales esclerófilas. La diversificación de sus linajes responde a un patrón logístico dependiente de la densidad, con fases de aceleración estimuladas por episodios de cambio climático y transformaciones fisiográficas. El periodo con mayor tasa de generación de linajes se corresponde con el Mioceno tardío, un momento marcado en Australia por la transición hacia un clima más árido, frío y estacional, y que provocó la aparición de los biomas árido y monzónico. En la actualidad el género se encuentra próximo a la fase asintótica de diversificación.

La estrecha relación trófica con las plantas del género *Acacia* parece existir desde el inicio de la diversificación de *Calomela*, cuando los ancestros de los linajes vegetales esclerófilos coexistían con las comunidades tipo *rainforest*. Dentro de la elevada especialización trófica en acacias, las especies actuales exhiben un patrón de alimentación eminentemente generalista, observándose una tendencia a la herbivoría sobre acacias de hoja bipinnada por parte de los linajes de *Calomela* propios de los ambientes esclerófilos.

En relación a nuestra propuesta metodológica para inferir la dieta de los insectos fitófagos desde una perspectiva molecular, podemos concluir que funciona de manera robusta y eficaz. El éxito en la amplificación mediante PCR y el nivel de resolución de los árboles filogenéticos obtenidos con el intrón *trnL* demuestran que es un marcador molecular con algunas limitaciones, pero apropiado para este tipo de estudios. Para cada caso donde el trofismo era conocido se recuperó la inferencia correcta. Esta información, combinada con los registros florísticos de la zona de estudio, los conocimientos previos sobre la sistemática del grupo botánico en cuestión, las citas tróficas existentes en la bibliografía y las observaciones de campo del investigador aportan en la mayoría de los casos evidencia más que suficiente para estrechar el círculo de posibles plantas hospedadoras a un reducido número de especies o incluso a una sola especie.

Los resultados obtenidos en el conjunto de Chrysomelinae australianos estudiados ponen de manifiesto la enorme diversidad trófica que estos coleópteros poseen, al tiempo que demuestran el gran potencial del método a la hora de ampliar

nuestros conocimientos sobre la biología, ecología y evolución de los insectos fitófagos.

La investigación futura se centrará en la exploración de otros marcadores moleculares cloroplásticos siguiendo la línea de discusión sobre el *barcoding* vegetal (Kress y Erickson, 2007; Chase *et al.*, 2007; Lahaye *et al.*, 2008; Hollingsworth *et al.*, 2011), donde se propone el uso combinado de regiones genómicas no codificantes de evolución rápida (como sería el caso del intrón *trnL* aquí empleado) con otras codificantes más conservadas. Asimismo, se pretende automatizar mediante el uso de *scripts* informáticos todo el proceso de análisis de datos desde el momento en el que se obtiene la secuencia problema hasta la generación de los árboles filogenéticos editados, de modo que los resultados se vayan actualizando de manera dinámica y programada conforme diariamente crecen las bases de datos públicas de secuencias de ADN.

La implementación de este método en estudios de índole ecológica y evolutiva que tratan con invertebrados herbívoros, y que se ven afectados por lagunas de conocimiento en cuanto a las asociaciones tróficas de las especies implicadas en sus sistemas de estudio, claramente se beneficiarán del método que en este trabajo se propone





## 6.- BIBLIOGRAFIA

- Aguilar C, Reimer J (2010) Molecular phylogenetic hypotheses of *Zoanthus* species (Anthozoa:Hexacorallia) using RNA secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2). *Marine Biodiversity* **40**:195-204.
- Ahrens D, Monaghan MT, Vogler AP (2007) DNA-based taxonomy for associating adults and larvae in multi-species assemblages of chafers (Coleoptera: Scarabaeidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**:436-449.
- Ahrens D, Scott M, Vogler AP (2011) The phylogeny of monkey beetles based on mitochondrial and ribosomal RNA genes (Coleoptera: Scarabaeidae: Hopliini). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **60**:408-415.
- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* **19**:716-723.
- Albach DC, Chase MW (2004) Incongruence in Veroniceae (Plantaginaceae); evidence from two plastid and a nuclear ribosomal DNA region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**:183-197.
- Albach DC, Meudt HM, Oxelman B (2005) Piecing together the "new" plantaginaceae. *American Journal of Botany* **92**:297-315.
- Alfaro ME, Zoller S, Lutzoni F (2003) Bayes or Bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov chain Monte Carlo sampling and Bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Molecular Biology and Evolution* **20**:255-266.
- Althoff D M, Segraves KA, Johnson MT (2014) Testing for coevolutionary diversification: linking pattern with process. *Trends in ecology & evolution* **29**:82-89.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**:403-410.
- Andersson L, Rova JHE (1999) The *rps16* intron and the phylogeny of the Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* **214**:161-186.
- Andrew NR, Hughes L (2007) Potential host colonization by insect herbivores in a warmer climate: a transplant experiment. *Global Change Biology* **13**:1539-1549.
- Andújar C, Soria-Carrasco V, Serrano J, Gómez-Zurita J (2014) Congruence test of molecular clock calibration hypotheses based on Bayes factor comparisons. *Methods in Ecology and Evolution* **5**:226-242.
- Angiosperm Phylogeny Group II (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**:399-436.
- Angiosperm Phylogeny Group (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**:105-121.
- APCD: Australian Plant Census IBIS Database, Centre for Plant Biodiversity Research, Council of Heads of Australian Herbaria, <<http://www.chah.gov.au/apc/index.html>>
- Archer M, Arena R, Bassarova MI, Black K, Brammall J, Cooke B, *et al.* (1999) The evolutionary history and diversity of Australian mammals. *Australian Mammalogy* **21**:1-45.
- Austin AD, Yeates DK, Cassis G, Fletcher MJ, LaSalle J, Lawrence JF, McQuillan PB, Mound LA, Bickel DJ, Gullan PJ, Hales DF, Taylor GS (2004) Insects 'Down Under.' Diversity, endemism and evolution of the Australian insect fauna: examples from select orders. *Australian Journal of Entomology* **43**:216-34.
- Australian Department of the Environment and Water Resources (2007) Australia's native vegetation: A summary of Australia's major vegetation groups. Australian Government, Canberra, ACT.
- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall.

- Azuma T, Kajita T, Yokoyama J, Ohashi H (2000) Phylogenetic relationships of *Salix* (Salicaceae) based on *rbcL* sequence data. *American Journal of Botany* **87**:67-75.
- Baker RH, DeSalle R (1997) Multiple Sources of Character Information and the Phylogeny of Hawaiian Drosophilids. *Systematic Biology* **46**:654-673.
- Balke M, Pons J, Ribera I, Sagata K, Vogler AP (2007) Infrequent and unidirectional colonization of hyperdiverse *Papuadytes* diving beetles in New Caledonia and New Guinea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**:505-516.
- Barker FK, Lutzoni FM (2002) The utility of the incongruence length difference test. *Systematic Biology* **51**:625-637.
- Barker NP, Weston PH, Rutschmann F, Sauquet H (2007) Molecular dating of the “Gondwanan” plant family Proteaceae is only partially congruent with the timing of the break-up of Gondwana. *Journal of Biogeography* **34**:2012-2027.
- Barrett LG, Heil M (2012) Unifying concepts and mechanisms in the specificity of plant–enemy interactions. *Trends in Plant Science* **17**:282-292.
- Baurain D, Brinkmann H, Philippe H (2007) Closely Spaced Cladogeneses or Undetected Systematic Errors? *Molecular Biology and Evolution* **24**:6-9.
- Bayer RJ, Starr JR (1998) Tribal phylogeny of the Asteraceae based on two non-coding chloroplast sequences, the *trnL* intron and the *trnL/trnF* intergenic spacer. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **85**:242-256.
- Beadle NCW (1981) Origins of Australian angiosperm flora. *En: “Ecological biogeography of Australia”*. Keast A (ed.) págs. 407-426. W. Junk, The Hague: Boston, London.
- Becerra JX, Venable DL (1999) Macroevolution of insect-plant associations: The relevance of host biogeography to host affiliation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**:12626-12631.
- Becerra JX (2004) Molecular systematics of *Blepharida* beetles (Chrysomelidae: Alticinae) and relatives. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**:107-117.
- Becerra JX (2007) The impact of herbivore-plant coevolution on plant community structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**:7483-7488.
- Beckert S, Steinhauser S, Muhle H, Knoop V (1999) A molecular phylogeny of bryophytes based on nucleotide sequences of the mitochondrial *nad5* gene. *Plant Systematics and Evolution* **218**:179-192.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2006) *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. Blackwell Publishing.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi Ilene, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2007) GenBank. *Nucleic Acid Research* **35**: D21-D25.
- Bentham G (1875) Revision of the suborder Mimoseae. *Transactions of the Linnean Society of London* **30**:335-664.
- Berger MP, Munson PJ (1991) A novel randomized iterative strategy for aligning multiple protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* **7**:479-484.
- Bernasconi MV, Casati S, Péter O, Piffaretti J-C (2002) *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). *Infection, Genetics and Evolution* **2**:111-120.
- Besega C, Fortunato RH (2011) Section Mimadenia: its phylogenetic relationships within the genus *Mimosa* (Leguminosae, Mimosoideae) using plastid *trnL-F* sequence data. *Australian Systematic Botany* **24**:104-110.
- Bienkowski A O (2004) Leaf-Beetles (Coleoptera; Chrysomelidae) of the Eastern Europe. New keys to subfamilies, genera, and species. Mikron print, Moscow, 278 pags.
- Bienkowski A O (2007) A monograph of the genus *Chrysolina* Motschulsky, 1860 (Coleoptera: Chrysomelidae) of the world. Part 1. Techpolygraphcentre Publ., Moscow. 417 pags.

- Birkett M, Chamberlain K, Khan Z, Pickett J, Toshova T, Wadhams L, Woodcock C (2006) Electrophysiological responses of the lepidopterous stemborers *Chilo partellus* and *Busseola fusca* to volatiles from wild and cultivated host plants. *Journal of Chemical Ecology* **32**:2475-2487.
- Birky Jr CW (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual review of genetics* **35**:125-148.
- Blackburn T (1896) Revision of the genus *Paropsis*, part I. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* **1896**:637-693.
- Blackburn T (1897) Revision of the genus *Paropsis*, part II. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* **1897**:166-189.
- Blackburn T (1898) Revision of the genus *Paropsis*, part III. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* **1898**:218-263.
- Blackburn T (1898) Revision of the genus *Paropsis*, part IV. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* **1898**:656-700.
- Blackburn T (1899) Revision of the genus *Paropsis*, part V. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* **1899**:482-521.
- Blackburn T (1901) Revision of the genus *Paropsis*, part VI. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* **1901**:159-196.
- Blackburn T (1901) Revision of the genus *Paropsis*. Part VI. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* **26**:159-196.
- Bocakova M, Constantin R, Bocak L (2011) Molecular phylogenetics of the melyrid lineage (Coleoptera: Cleroidea). *Cladistics* **28**:117-129.
- Bohonak AJ (2002) IBD (Isolation by Distance): A Program for Analyses of Isolation by Distance. *Journal of Heredity* **93**:153-154.
- Bologna MA, Oliverio M, Pitzalis M, Mariottini P (2008) Phylogeny and evolutionary history of the blister beetles (Coleoptera, Meloidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **48**:679-693.
- Borsch T, Hilu KW, Quandt D, Wilde V, Neinhuis C, Barrthlott W (2003) Noncoding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *Journal of Evolutionary Biology* **16**:558-576.
- Bouchard P, Grebennikov VV, Smith ABT, Douglas H (2009) Biodiversity of Coleoptera [págs.265–301]. *En: Foottit RG, Adler PH (Eds.). Insect biodiversity: science and society*. Blackwell Publishing, Oxford, 656 págs.
- Bourdonné J-C, Doguet S (1991) Données sur la biosystématique des *Chrysolina l. s.* (Coleoptera: Chrysomelidae: Chrysomelinae). *Annales de la Société Entomologique de France (N. S.)* **27**:29-64.
- Bowe LM, Coat G, dePamphilis CW (2000) Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: Extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales' closest relatives are conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**:4092-4097.
- Brady SG, Litman JR, Danforth BN (2011) Rooting phylogenies using gene duplications: An empirical example from the bees (Apoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **60**:295-304.
- Brammer CA, von Dohlen CD (2007) Evolutionary history of Stratiomyidae (Insecta: Diptera): The molecular phylogeny of a diverse family of flies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**:660-673.
- Bremer B, Manen JF (2000) Phylogeny and classification of the subfamily Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* **225**:43-72.
- Bremer K (1994) Branch support and tree stability. *Cladistics* **10**: 295-304.
- Bremer K, Friis EM, Bremer B (2004) Molecular Phylogenetic Dating of Flowering Plants Shows Early Cretaceous Diversification. *Systematic Biology* **53**:496-505.
- Brežná B, Hudecová L, Kuchta T (2006) Detection of pea in food by real-time polymerase chain reaction (PCR). *European Food Research and Technology* **222**:600-603.

- Briggs BG, Johnson LAS (1979) Evolution in the Myrtaceae: evidence from inflorescence structure. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* **102**:158-256.
- Britton T, Anderson C, Jacquet D, Lundqvist S, Bremer K (2007) Estimating divergence times in large phylogenetic trees. *Systematic Biology* **56**:741-752.
- Brock CD, Harmon LJ, Alfaro ME (2011) Testing for temporal variation in diversification rates when sampling is incomplete and nonrandom. *Systematic Biology* **60**:410-419.
- Brooker MIH (2000) A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae). *Australian Systematic Botany* **13**:79-148.
- Brooksbank C, Bergman MT, Apweiler R, Birney E, Thornton J (2014) The European Bioinformatics Institute's data resources 2014. *Nucleic acids research* **42**:D18-D25.
- Brower AV (1994) Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**:6491-6495.
- Brower AVZ, DeSalle R (1998) Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference. *Insect Molecular Biology* **7**:1-10.
- Brown GG, Simpson MV (1982) Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **79**:3246-3250.
- Brown GK, Udovicic F, Ladiges PY (2001) Molecular phylogeny and biogeography of *Melaleuca*, *Callistemon* and related genera (Myrtaceae). *Australian Systematic Botany* **14**:565-585.
- Brown WM, George M Jr., Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**:1967-1971.
- Buckler ES, Ippolito A, Holtsford TP (1997) The evolution of ribosomal DNA: Divergent paralogous and phylogenetic implications. *Genetics* **145**:821-832.
- Bull JJ, Huelsenbeck JP, Cunningham CW, Swofford DL, Waddell PJ (1993) Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* **42**:384-397.
- Byrne M, Steane DA, Joseph L, Yeates DK, Jordan GJ, Crayn D, Aplin K, Cantrill DJ, Cook LG, Crisp MD, Keogh JS, Melville J, Moritz C, Porch N, Sniderman JMK, Sunnucks P, Weston PH (2011) Decline of a biome: evolution, contraction, fragmentation, extinction and invasion of the Australian mesic zone biota. *Journal of Biogeography* **38**:1635-1656.
- Cabrera NC (2004) Description of immature stages of *Plagiodera erythroptera* Blanchard (Coleoptera: Chrysomelidae: Chrysomelinae). *The Coleopterists Bulletin* **58**:149-158.
- Campbell CL, McCaffrey JP (1991) Population trends, seasonal phenology, and impact of *Chrysolina quadrigemina*, *C. hyperici* (Coleoptera: Chrysomelidae), and *Agilus hyperici* (Coleoptera: Buprestidae) associated with *Hypericum perforatum* in northern Idaho. *Environmental Entomology* **20**:300-315.
- Cantino PD, Olmstead RG, Wagstaff SJ (1997) A Comparison of Phylogenetic Nomenclature with the Current System: A Botanical Case Study. *Systematic Biology* **46**:313-331.
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**:540-552.
- Casu M, Sanna D, Cossu P, Lai T, Francalacci P, Curini-Galletti M (2011) Molecular phylogeography of the microturbellarian *Monocelis lineata* (Platyhelminthes: Proseriata) in the North-East Atlantic. *Biological Journal of the Linnean Society* **103**:117-135.

- Caterino MS, Cho S, Sperling FAH (2000) The Current State Of Insect Molecular Systematics: A Thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology* **45**:1-54.
- Cayzer LW, Crisp MD, Telford RH (2004) Cladistic analysis and revision of *Billardiera* (Pittosporaceae). *Australian Systematic Botany* **17**:83-125.
- Chaboo CS, Friero-Costa FA, Gómez-Zurita J, Westerduijn R (2014) Origins and diversification of subsociality in leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae: Chrysomelinae). *Journal of Natural History* <http://dx.doi.org/10.1080/00222933.2014.909060>
- CHAH-Council of Heads of Australasian Herbaria (2013). Australian Plant Census (<http://www.anbg.gov.au/chah/apc/index.html>)
- Chandler GT, Plunkett GM, Pinney SM, Cayzer LW, Gemmill EC (2007) Molecular and morphological agreement in Pittosporaceae: phylogenetic analysis with nuclear ITS and plastid *trnL-trnF* sequence data. *Australian Systematic Botany* **20**:390-401.
- Chang H, Liu Q, Hao D, Liu Y, An Y, Qian L, Yang X (2013) DNA barcodes and molecular diagnostics for distinguishing introduced *Xyleborus* (Coleoptera: Scolytinae) species in China. *Mitochondrial DNA* **25**:63-69.
- Chapin III FS, Matson PA, Vitousek PM (2012) Trophic Dynamics. *En: Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology* (pp. 297-320). Springer New York.
- Chapman AR, Maslin BR (1992) *Acacia* Miscellany 5. A review of the *A. bivenosa* group (Leguminosae: Mimosoideae: section Phyllodineae. *Nuytsia* **8**: 249-283.
- Chapuis F (1874) Phytophages. *En: Histoire Naturelle des Insectes. Genera des Coléoptères*, Tome XI. Lacordaire T y Chapuis F (eds.) Librairie Encyclopédique de Roret. Paris. Págs. 1-419.
- Chapuis F (1877) Synopsis des espèces du genre *Paropsis*. *Annales de la Société Entomologique de Belgique* **20**:67–101.
- Charleston MA, Robertson DL (2002) Preferential host switching by primate lentiviruses can account for phylogenetic similarity with the primate phylogeny. *Systematic Biology* **51**:528-535.
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, Duvall MR, Price RA, Hills HG, Qiu Y-L, Kron KA, Rettig JH, Conti E, Palmer JD, Manhart JR, Sytsma KJ, Michaels HJ, Kress WJ, Karol KG, Clark WD, Hedren M, Gaut BS, Jansen RK, Kim K-J, Wimpee CF, Smith JF, Furnier GR, Strauss SH, Xiang Q-Y, Plunkett GM, Sotis PS, Swensen SM, Williams SE, Gadek PA, Quinn CJ, Eguiarte LE, Golenberg E, Learn GH, Jr., Graham SW, Barrett SC, Dayanandan S, Albert VA (1993) Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **80**:528-580.
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, van der Berg C, Madriñán S, Petersen G, Seberg O, Jorgensen T, Cameron KM, Carine M, Pedersen N, Hedderson TAJ, Conrad F, Salazar GA, Richardson JE, Hollingsworth ML, Barraclough TG, Kelly L, Wilkinson M (2007) A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* **56**:295-299.
- Chaw S-M, Parkinson CL, Cheng Y, Vincent TM, Palmer JD (2000) Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: Monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 4086-4091.
- Chen CW, Huang YM, Kuo LY, Nguyen QD, Luu HT, Callado JR, Farrar DR, Chiou WL (2013) *trnL-F* is a powerful marker for DNA identification of field vittarioid gametophytes (Pteridaceae). *Annals of botany*: mct004.
- Chen L, Fadamiro HY (2007) Differential electroantennogram response of females and males of two parasitoid species to host-related green leaf volatiles and inducible compounds. *Bulletin of Entomological Research* **97**:515-522.

- Chen SL, Yao H, Han JP, Liu C, Song JY, et al. (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* **5**: e8613.
- Chen SY, Xia T, Wang YJ, Liu JQ, Chen SL (2005) Molecular systematics and biogeography of *Crawfordia*, *Metagentiana* and *Tripterospermum* (Gentianaceae) based on nuclear ribosomal and plastid DNA sequences. *Annals of Botany* **96**:413-424.
- Chen T-W, NG C-C, Wang C-Y, Shyu Y-Y (2007) Molecular identification and analysis of *Psidium guajava* L. from indigenous tribes of Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis* **15**:82-88.
- Chen Y, Giles KL, Payton ME, Greenstone MH (2000) Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. *Molecular Ecology* **9**:1887-1898.
- Chepherd RCH (1985) The present status of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and its biological control agents in Victoria, Australia. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **12**:141-149.
- Cho S, Mitchell A, Regier JC, Mitter C, Poole RW, Friedlander TP, Zhao S (1995) A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor-1 alpha recovers morphology-based tree for heliothine moths. *Molecular Biology Evolution* **12**:650-656.
- Cho Y, Qiu Y-L, Kuhlman P, Palmer JD (1998) Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**:14244-14249.
- Cho Y, Mower JP, Qiu Y-L., Palmer JD (2004) Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**:17741-17746.
- Clarke HD, Downie SR, Seigler DS (2000) Implications of chloroplast DNA restriction site variation for systematics of *Acacia* (Fabaceae: Mimosoideae). *Systematic Botany* **25**:618-632.
- Clegg MT, Zurawski G (1992) Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. *En: Molecular Systematics of Plants*. Soltis PS, Soltis DE, Doyle JJ (eds.), págs. 1-13. Chapman and Hall, New York.
- Clegg MT (1993) Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **90**:363-367.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**:1657-1659.
- Coleman AW (2000) The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist* **151**:1-9.
- Coleman AW, Vacquier VD (2002) Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: a test case for abalone (*Haliotis*). *Journal of Molecular Evolution* **54**:246-257.
- Coleman AW (2003) ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* **19**:370-375.
- Coleman AW (2007) Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research* **35**:3322-3329.
- Coleman AW (2009) Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **50**:197-203.
- Collot J, Geli L, Lafoy Y, Vially R, Cluzel D, Klingelhoefer F, Nouzé H (2008) Tectonic history of northern New Caledonia Basin from deep offshore seismic reflection: relation to late Eocene obduction in New Caledonia, southwest Pacific. *Tectonics* **27**:1-20.
- Conti E, Litt A, Wilson PG, Graham SA, Briggs BG, Johnson LAS, Sytsma KJ (1997) Interfamilial Relationships in Myrtales: Molecular Phylogeny and Patterns of Morphological Evolution. *Systematic Botany* **22**:629-647.

- Contreras-Díaz H, López H, Oromí P, Juan C (2006) Microsatellite loci development in endangered pamphagid grasshoppers endemic to the Canary Islands (Orthoptera). *Conservation Genetics* **7**:767-771.
- Contreras-Díaz HG, Moya O, Oromí P, Juan C (2007) Evolution and diversification of the forest and hypogean ground-beetle genus *Trechus* in the Canary Islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**:687-699.
- Cook LG, Crisp MD (2005) Not so ancient: the extant crown group of *Nothofagus* represents a post-Gondwanan radiation. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **272**:2535-2544.
- Coolen MJL, Volkman JK, Abbas B, Muyzer G, Schouten S, Damste JSS (2007) Identification of organic matter sources in sulfidic late Holocene Antarctic fjord sediments from fossil rDNA sequence analysis. *Palaeoceanography* **22**:PA2211
- Cooper SJB, Hinze S, Leys R, Watts CHS, Humphreys WF (2002) Islands under the desert: molecular systematics and evolutionary origins of stygobitic water beetles (Coleoptera: Dytiscidae) from central Western Australia. *Invertebrate Systematics* **16**:589-590.
- Costin AB, Gray M, Totterdell CJ, Wimbush DJ (1979) Kosciuszko Alpine Flora. CSIRO and Collins, Melbourne and Sydney.
- Cox ML (1994) Egg bursters in the Chrysomelidae, with a review of their occurrence in the Chrysomeloidea (Coleoptera). *En: Jolivet PH, Cox ML, Petitpierre E (eds.). Novel aspects of the biology of Chrysomelidae. Series Entomologica.* **50**:75-110. Dordrecht Kluwer Academic Publishers.
- CPBM: Checklist to the plants of Black Mountain, Centre for Plant Biodiversity Research. & Australian National Herbarium. <<http://www.anbg.gov.au/cpbr/Adams-Black-Mtn-key/checklists/index.html>>.
- Craft KJ, Owens JD, Ashley MV (2007) Application of plant DNA markers in forensic botany: Genetic comparison of *Quercus* evidence leaves to crime scene trees using microsatellites. *Forensic Science International* **165**:64-70.
- Cranston PS (2009) Biodiversity of Australasian insects. *In Insect Biodiversity, Science and Society.* Footitt R, Adler P (eds.), págs. 83-105. Wiley-Blackwell.
- Crisp MD (1991) Contributions towards a revision of *Daviesia* Smith (Fabaceae: Mirbelieae). II. The *D. Latifolia* group. *Australian Systematic Botany* **4**:229-298.
- Crisp MD, Cook LG (2003) Phylogeny and evolution of anomalous roots in *Daviesia* (Fabaceae: Mirbelieae). *International Journal of Plant Sciences* **164**:603-612.
- Crisp M, Cook L, Steane D (2004) Radiation of the Australian flora: what can comparisons of molecular phylogenies across multiple taxa tell us about the evolution of diversity in present-day communities? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B* **359**:1551-1571
- Crisp MD, Cook LG (2007) A congruent molecular signature of vicariance across multiple plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **43**:1106-1117.
- Crisp MD, Cook LG (2013) How Was the Australian Flora Assembled Over the Last 65 Million Years? A Molecular Phylogenetic Perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **44**:12.1-12.22
- Crowson R (1981) *The biology of the Coleoptera*. London, UK: Academic Press.
- Cruaud A, Rønsted N, Chantarasuwan B, Chou LS, Clement WL, Coulloux A, Cousins B, Genson G, Harrison RD, Hanson PE, Hossaert-Mckey M, Jabbour-Zahab R, Jousset E, Kerdelhué C, Kjellberg F, Lopez-Vaamonde C, Peebles J, Peng Y-Q, Santinelo RA, Schramm T, Ubaidillah R, van Noort S, Weiblen GD, Yang D-R, Yodpinyanee A, Libeskind-Hadas R, Cook JM, Rasplus J-Y, Savolainen V (2012) An extreme case of plant–insect codiversification: figs and fig-pollinating wasps. *Systematic biology*, sys068.
- Cryan JR, Wiegmann BM, Deitz LL, Dietrich CH (2000) Phylogeny of the Treehoppers (Insecta: Hemiptera: Membracidae): Evidence from Two Nuclear Genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **17**:317-334.



- Cryan JR, Urban JM (2012) Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic?. *Systematic Entomology* **37**:7-21.
- Daccordi M (1983) Quelques réflexions sur la distribution des Chrysomelinae (Col. Chrysomelidae). *Bulletin de la Société entomologique de France* **88**:448-451.
- Daccordi M (1994) Notes for phylogenetic study of Chrysomelinae, with descriptions of new taxa and a list of all known genera (Coleoptera: Chrysomelidae: Chrysomelinae). *En: Furthy, D.G. (ed.). Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Chrysomelidae*, Beijing, 1992. Backhuys, Leyden, págs. 60-84.
- Daccordi M (1996) Notes on the distribution of the Chrysomelinae and their possible origin. *En: Jolivet, P.H.A. & Cox, M.L. (eds.) Chrysomelidae biology, vol. 1: the classification, phylogeny and genetics*. SPB Academic Publishing, Amsterdam, págs. 399-412.
- Daccordi M (2000) New Australian Chrysomelinae taxa (Coleoptera: Chrysomelidae, Chrysomelinae). *Bollettino del Museo regionale di scienze naturali, Torino*, **17**:187-204.
- Daccordi M (2003a) New species of Chrysomelinae from New South Wales (Coleoptera Chrysomelidae: Chrysomelinae). Monografie, Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino **35**:379-412.
- Daccordi M (2003b) New species of Chrysomelinae in the Northern Territory (Coleoptera Chrysomelidae: Chrysomelinae). Monografie, Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino **35**:461-502.
- Daccordi M, de Little DW (2003) New taxa of Chrysomelinae of Tasmania (Coleoptera Chrysomelidae: Chrysomelinae). Monografie, Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino **35**:343-378.
- Danforth BN, Ji S (1998) Elongation factor-1 $\alpha$  occurs as two copies in bees: Implications for phylogenetic analysis of EF-1 $\alpha$  sequences in insects. *Molecular Biology and Evolution* **15**:225-235.
- Danforth BN (2002) Evolution of sociality in a primitively eusocial lineage of bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**:286-290.
- Danforth BN, Lin C-P, Fang J (2005) How do insect nuclear ribosomal genes compare to protein-coding genes in phylogenetic utility and nucleotide substitution patterns? *Systematic Entomology* **30**:549-562.
- Danforth BN, Fang J, Sipes SD (2006) Analysis of family level relationships in bees (Hymenoptera: Apiformes) using 28S and two previously unexplored nuclear genes: CAD and RNA polymerase II. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **39**:358-372.
- Darlu P, Lecointre G (2002) When Does the Incongruence Length Difference Test Fail? *Molecular Biology and Evolution* **19**:432-437.
- Darwin C (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. 1st edition. London: John Murray, 502 págs.
- Davies RW, Waring RB, Ray JA, Brown TA, Scazzocchio C (1982) Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria. *Nature* **300**:719 - 724.
- de Boer G, Hanson FE (1984) Foodplant selection and induction of feeding preference among host and non-host plants in larvae of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **35**:177-193.
- de Candolle AP (1828) Myrtaceae. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis* **3**:207-296.
- de Little DW (1979a) A preliminary review of the genus *Paropsis* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae) in Tasmania. *Australian Journal of Entomology* **18**:91-107.
- de Little DW (1979b) *Taxonomic and ecological studies of the Tasmanian Eucalyptus-defoliating paropsids*. Ph.D. thesis. University of Tasmania, Hobart.
- de Little DW (1985) Favourability of fagaceous foliage as food for *Novacastria nothofagi* Selman. *Australian Entomological Magazine* **12**:13-14.

- de Rijk P, Caers A, Van de Peer Y, De Wachter R (1998) Database on the structure of large ribosomal subunit RNA. *Nucleic Acids Research* **26**:183-186.
- de Ruiter PC, Wolters V, Moore JC (2005) Dynamic Food Webs. *En: Dynamic Food Webs: Multispecies Assemblages, Ecosystem Development and Environmental Change*. De Ruiter PC, Wolters V & Moore JC (eds.) Academic Press, San Diego.
- de Vienne D, Giraud T, Martin CM (2007) A congruence index for testing topological similarity between trees. *Bioinformatics* **23**:3119-3124.
- DeSalle R, Gatesy J, Wheeler W, Grimaldi D (1992) DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* **257**:1933-1936.
- DEST: Department of the Environment, Sport and Territories (1994). Australia's Biodiversity: an overview of selected significant components. Canberra: Commonwealth of Australia.
- Dettmann ME, Pocknall DT, Romero EJ, Carmen-Zamaloa MD (1990) Nothofagidites Erdtman ex Potonie, 1960; a catalogue of species with notes on the palaeogeographic distribution of *Nothofagus* Bl. (southern beech). *New Zealand Geological Survey Paleontological Bulletin* **60**:1-79.
- Djernæs M, Damgaard J (2006) Exon-intron structure, paralogy and sequenced regions of elongation factor-1 alpha in Hexapoda. *Arthropod Systematics and Phylogeny* **64**:45-52.
- Dobler S, Müller JK (2000) Resolving Phylogeny at the Family Level by Mitochondrial Cytochrome Oxidase Sequences: Phylogeny of Carrion Beetles (Coleoptera, Silphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **15**:390-402.
- Dodson JR, Macphail MK (2004) Palynological evidence for aridity events and vegetation change during the Middle Pliocene, a warm period in southwestern Australia. *Global and Planetary Change* **41**:285-307.
- Dole SA, Jordal BH, Cognato AI (2010) Polyphyly of *Xylosandrus* Reitter inferred from nuclear and mitochondrial genes (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**:773-782.
- Dolphin K, Belshaw R, Orme CDL, Donald LJ (2000) Quicke, Noise and Incongruence: Interpreting Results of the Incongruence Length Difference Test. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **17**:401-406.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* **19**:4008.
- Dong W, Liu J, Yu J, Wang L, Zhou S (2012) Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PLoS One*: **7**:e35071.
- Donoso C, Premoli A, Gallo L (2004) *Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*. Santiago. Editorial Universitaria.
- Doucet SM, Meadows MG (2009) Iridescence: a functional perspective. *Journal of the Royal Society Interface* **6**:S115-S132.
- Downie DA, Gullan PJ (2004) Phylogenetic analysis of mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae) based on DNA sequences from three nuclear genes, and a review of the higher classification. *Systematic Entomology* **29**:238-260.
- Drummond AJ, Ho SYW, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* **4**:699-710.
- Drummond AJ, Ho SYW, Rawlence N, Rambaut A (2007) A rough guide to BEAST 1.4. University of Auckland, New Zealand.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* **29**:1969-1973.

- Duckett CN, Gillespie JJ, Kjer KM (2004) Relationships among the subfamilies of Chrysomelidae inferred from small subunit ribosomal DNA and morphology, with special emphasis on the relationship among the flea beetles and the Galerucinae. *En: Jolivet P, Santiago-Blay JA, Schmitt M, editors. New Developments in the Biology of Chrysomelidae*. The Hague, SPB Academic Publishing. págs. 3-18.
- Dutra TL (2004) Paleofloras da antártica e sua relação com os eventos tectônicos e paleoclimáticos nas altas latitudes do sul. *Revista Brasileira de Geociências* **34**:401-410.
- Eastop V (1979) *Sternorrhyncha* as angiosperm taxonomists. *Symbolae Botanicae Upsaliensis* **22**:120-134.
- Eberhard WG (1981) The natural history of *Doryphora* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae) and the function of its sternal horn. *Annals of the Entomological Society of America* **74**:445-448.
- Ehrlich PR, Raven PH (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* **18**:586-608.
- Eitzinger B, Micic A, Körner M, Traugott M, Scheu S (2013) Unveiling soil food web links: New PCR assays for detection of prey DNA in the gut of soil arthropod predators. *Soil Biology and Biochemistry* **57**:943-945.
- Ezcurra C, Endress ME, Leeuwenberg AJM (1992) Apocynaceae. *In* R. Spichiger & L. Ramela (eds.), *Flora del Paraguay*, Vol. 17. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, Geneva and Missouri Botanical Garden, St. Louis.
- Ezcurra MD, Agnolín FL (2012) A New Global Palaeobiogeographical Model for the Late Mesozoic and Early Tertiary. *Systematic Biology* **61**:553-566.
- Fairley A, Waterhouse D (2005) *West Sydney Wild: Exploring Nature in Sydney's Western Suburbs*. Everbest Printing Co. Limited: Dural, NSW 185 págs.
- Farrell BD (1998) "Inordinate fondness" explained: why are there so many beetles? *Science* **281**:555-559.
- Farrell BD, Sequeira AS (2004) Evolutionary rates in the adaptive radiation of beetles on plants. *Evolution* **58**:1984-2001.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1994) Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**:315-319.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1995) Constructing a Significance Test for Incongruence. *Systematic Biology* **44**:570-572.
- Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW, Newmaster SG, Husband BC, Percy DM, Hajibabaei M, Barrett SC (2008) Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS One* **3**:e2802.
- FBWAF: *FloraBase: the Western Australia Flora*. Department of Environment and Conservation. Western Australian Herbarium, <<http://florabase.calm.wa.gov.au/>>
- Feliner GN, Rosselló JA (2007) Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**:911-919.
- Feller RJ, Zagursky G, Day EA (1985) Deep-sea food web analysis using cross-reacting antisera. *Deep Sea Research* **32**:485-497.
- Felsenstein J (1973) Maximum-likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Zoology* **22**:240-249.
- Feng DF, Doolittle RF (1987) Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *Journal of Molecular Evolution* **25**:351-360.
- Fenton B, Malloch G, Moxey E (1997) Analysis of eriophyid mite rDNA internal transcribed spacer sequences reveals variable simple sequence repeats. *Insect Molecular Biology* **6**:23-32.

- Fernández E, Pérez-Pérez A, Gamba C, Prats E, Cuesta P, Anfruns J, Molist M, Arroyo-Pardo E, Turbón D (2014) Ancient DNA Analysis of 8000 BC Near Eastern Farmers Supports an Early Neolithic Pioneer Maritime Colonization of Mainland Europe through Cyprus and the Aegean Islands. *PLoS genetics* **10**: e1004401.
- Fernández PC, Meiners T, Björkman C, Hilker M (2007) Electrophysiological responses of the blue willow leaf beetle, *Phratora vulgatissima*, to volatiles of different *Salix viminalis* genotypes. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **125**:157-164.
- FI: Flora Ibérica. *Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Real Jardín Botánico. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. España. <<http://www.rjb.csic.es/floraiberica/>>
- FNSW: Flora of New South Wales. National Herbarium of New South Wales. Royal Botanic Gardens & Domain Trust, Sydney Australia <<http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/floraonline.htm>>
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**:294-299.
- Fordyce JA (2010) Interpreting the  $\gamma$  Statistic in Phylogenetic Diversification Rate Studies: A Rate Decrease Does Not Necessarily Indicate an Early Burst. *PLoS ONE* **5**:e11781.
- Forster SP, Harris MO (1997) Behavioral manipulation methods for insects pest-management. *Annual Review of Entomology* **42**:123-146.
- Fourment M, Gibbs MJ (2006) PATRISTIC: a program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. *BMC Evolutionary Biology* **6**:1.
- Freitas PD, Martins DS, Galetti PM (2008) CID: a rapid and efficient bioinformatic tool for the detection of SSRs from genomic libraries. *Molecular Ecology Resources* **8**:107-108.
- Friedlander TP, Regier JC, Mitter C, Wagner DL (1996) A nuclear gene for higher level phylogenetics: phosphoenolpyruvate carboxykinase tracks Mesozoic-aged divergences within Lepidoptera (Insecta). *Molecular Biology and Evolution* **13**:594-604.
- Fry B, Joern A, Parker PL (1978) Grasshopper food web analysis: use of carbon isotope ratios to examine feeding relationships among terrestrial herbivores. *Ecology* **59**:498-506.
- Funk DJ, Filchak KE, Feder JL (2002) Herbivorous insects: model systems for the comparative study of speciation ecology. *Genetica* **116**:251-267.
- Futuyma DJ (1986) *Evolutionary Biology*. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Futuyma DJ, Moreno G (1988) The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics* **19**:207-233.
- Galimberti A, De Mattia F, Losa A, Bruni I, Federici S, Casiraghi M, Martellos S, Labra M (2013) DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food research international* **50**:55-63.
- Gallagher SJ, Greenwood DR, Taylor D, Smith AJ, Wallace MW, Holdgate GR (2003) The Pliocene climatic and environmental evolution of southeastern Australia: evidence from the marine and terrestrial realm. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **193**:349-382.
- Gallego D, Galián J (2001) The internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of the rDNA differentiates the bark beetle forest pests *Tomicus destruens* and *T. piniperda*. *Insect Molecular Biology* **10**:415-420.
- Gamerschlag S, Mehlhorn H, Heukelbach J, Feldmeier H, D'Haese J (2008) Repetitive sequences in the ITS1 region of the ribosomal DNA of *Tunga penetrans* and other flea species (Insecta, Siphonaptera). *Parasitology Research* **102**:193-199.

- Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, et al. (2010) Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology* **130**:116-121.
- García-Robledo C, Erickson DL, Staines CL, Erwin TL, Kress WJ (2013). Tropical plant–herbivore networks: reconstructing species interactions using DNA barcodes. *PloS one* **8**:e52967.
- Garnock-Jones P, Albach D, Briggs BG (2007) Botanical names in Southern Hemisphere *Veronica* (Plantaginaceae): sect. *Detzneria*, sect. *Hebe*, and sect. *Labiatoides*. *Taxon* **56**:571-582.
- Gausterer C, Stein C, Stimpfl T (2012) Application of direct PCR in a forensic case of yew poisoning. *International journal of legal medicine* **126**:315-319.
- Ge D, Gómez-Zurita J, Chesters D, Yang X, Vogler AP (2012) Suprageneric systematics of flea beetles (Chrysomelidae: Alticinae) inferred from multilocus sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **62**:793-805.
- Gibbs PE (1966) Revision of the genus *Genista* L. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh* **27**:11-99.
- Gielly L, Taberlet P (1994) The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Molecular Biology and Evolution* **11**:769-777.
- Gielly L, Taberlet P (1996) A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast *trnL* (UAA) intron sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* **120**:57-75.
- Gillespie J, Cannone J, Gutell R, Cognato A (2004) A secondary structural model of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 from rootworms and related leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae; Galerucinae). *Insect Molecular Biology* **13** 495-518.
- Gillespie JJ, Munro JB, Heraty JM, Yoder MJ, Owen AK, Carmichael AE (2005) A Secondary Structural Model of the 28S rRNA Expansion Segments D2 and D3 for Chalcidoid Wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Molecular Biology and Evolution* **22**:1593-1608.
- Golubchik T, Wise MJ, Easteal S, Jermini LS (2007) Mind the gaps: evidence of bias in estimates of multiple sequence alignments. *Molecular Biology and Evolution* **24**:2433-2442.
- Gómez-Zurita J, Juan C, Petitpierre E (2000) Sequence, secondary structure and phylogenetic analyses of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in the *Timarcha* leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Molecular Biology* **9**:591-604.
- Gómez-Zurita J, Vogler AP (2003) Incongruent nuclear and mitochondrial phylogeographic patterns in the *Timarcha goettingensis* species complex (Coleoptera, Chrysomelidae). *Journal of Evolutionary Biology* **16**:833-843.
- Gómez-Zurita J (2004) Molecular systematics and time-scale for the evolution of *Timarcha*, a leaf-beetle genus with a disjunct Holarctic distribution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**:647-665.
- Gómez-Zurita J, Vogler AP, Funk DJ (2004) Diagnosing an Overlooked North American Taxon: Biological Observations and Mitochondrial Insights on *Calligrapha suturella* Schaeffer, New Status (Coleoptera, Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America* **97**:28-36.
- Gómez-Zurita J, Jolivet P, Vogler AP (2005) Molecular systematics of Eumolpinae and the relationships with Spilopyrinae (Coleoptera, Chrysomelidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34**:584-600.
- Gómez-Zurita J, Funk DJ, Vogler AP (2006) The Evolution Of Unisexuality In *Calligrapha* Leaf Beetles: Molecular And Ecological Insights On Multiple Origins Via Interspecific Hybridization. *Evolution* **60**:328-347.

- Gómez-Zurita J, Hunt T, Kopliku F, Vogler AP (2007a) Recalibrated tree of leaf beetles (Chrysomelidae) indicates independent diversification of angiosperms and their insect herbivores. *PLoS One* **2**:e360.
- Gómez-Zurita J, Garnería I, Petitpierre E (2007b) Molecular phylogenetics and evolutionary analysis of shape in the genus *Cyrtonus* Latreille (Coleoptera, Chrysomelidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **45**:317-328.
- Gómez-Zurita J, Hunt T, Vogler AP (2008) Multilocus ribosomal RNA phylogeny of the leaf beetles (Chrysomelidae). *Cladistics* **24**:34-50.
- Gómez-Zurita J, Cardoso A, Jurado-Rivera JA, Jolivet P, Cazères S, Mille C (2010) Discovery of a new species of New Caledonian *Arsipoda* Erichson, 1842 (Coleoptera: Chrysomelidae) and insights on their ecology and evolution using DNA markers. *Journal of Natural History* **44**:2557-2579.
- Gómez-Zurita J, Sassi D, Cardoso A, Balke M (2012) Evolution of *Cryptocephalus* leaf beetles related to *C. sericeus* (Coleoptera: Chrysomelidae) and the role of hybridization in generating species mtDNA paraphyly. *Zoologica Scripta* **41**:47-67.
- Gómez-Zurita J, Cardoso A (2014) Systematics of the New Caledonian endemic genus *Taophila* Heller (Coleoptera: Chrysomelidae, Eumolpinae) combining morphological, molecular and ecological data, with description of two new species. *Systematic Entomology* **39**:111-126.
- González-Orozco CE, Laffan SW, Miller JT (2011) Spatial distribution of species richness and endemism of the genus *Acacia* in Australia. *Australian Journal of Botany* **59**:601-609.
- Gotoh O (1993) Optimal alignment between groups of sequences and its application to multiple sequence alignment. *Computer Applications in the Biosciences* **9**:361-370.
- Grasso C, Lee C (2004) Combining partial order alignment and progressive multiple sequence alignment increases alignment speed and scalability to very large alignment problems. *Bioinformatics* **20**:1546-1556.
- Greenstone MH, Rowley DL, Weber DC, Payton ME, Hawthorne DJ (2007) Feeding mode and prey detectability half-lives in molecular gut-content analysis: an example with two predators of the Colorado potato beetle. *Bulletin of Entomological Research* **97**:201-209.
- Gressitt JL (1963) Economic chrysomelid beetles from New Guinea, with new species. *Papua and New Guinea Agricultural Journal* **16**:105-116.
- Griebel T, Brinkmeyer M, Böcker S (2008) EPoS: a modular software framework for phylogenetic analysis. *Bioinformatics* **24**:2399-2400.
- Gross J, Fatouros NE, Hilker M (2004) The significance of bottom-up effects for host plant specialization in *Chrysomela* leaf beetles. *Oikos* **105**: 368-376.
- Groves RH (ed.) (1994) *Australian Vegetation*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**:307-21.
- Guinet P, Vassal J, Evans CS, Maslin BR (1980) *Acacia* (Mimosoideae): composition and affinities of the series Pulchellae Bentham. *Botanical Journal of the Linnean Society* **80**:53-68.
- Guo YJ, Ji QH, Zhou XQ, Hu YP, Guo LY, Jiang H, Zeng JW (2013) Genetic background of *Citrus nobilis* Lour. 'Gonggan' based on the chloroplast *trnL* gene. *Genetics and molecular research* **12**:3079-3087.
- Gupta PK (2007) *Genetics Classical To Modern*. Rastogi Publications 984 págs.
- Gutell RR, Fox GE (1988) A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. *Nucleic Acids Research* **16S**:r175-r269.

- Gutell RR, Schnare MN, Gray MW (1990) A compilation of large subunit (23S-like) ribosomal RNA sequences presented in a secondary structure format. *Nucleic Acids Research* **18S**: 2319-2330.
- Gutell RR, Gray M W, Schnare MN (1993) A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures: 1993. *Nucleic Acids Research* **21**:3055-3074.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleid Acids Symposium Series* **41**:95-98.
- Hamby KR, Zimmer EA (1992) Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. *En: Molecular systematics of plants* (Soltis PS, Soltis DE, and Doyle JJ, eds). Chapman and Hall, New York.
- Hancock JM, Dover GA (1990) 'Compensatory slippage' in the evolution of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research* **18**:5949-5954.
- Hancock JM, Vogler AP (2000) How slippage-derived sequences are incorporated into rRNA variable region secondary structure: implications for phylogeny reconstruction. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **14**:366-374.
- Hanner R (2009) Data Standards for BARCODE Records in INSDC (BRIs) (Database Working Group, Consortium for the Barcode of Life) [Internet]. [http://www.barcodeoflife.org/sites/default/files/legacy/pdf/DWG\\_data\\_standards-Final.pdf](http://www.barcodeoflife.org/sites/default/files/legacy/pdf/DWG_data_standards-Final.pdf)
- Harden G.J (ed.) (1991). *Flora of New South Wales*. NSW University Press, Kensington, New South Wales. Australia.
- Haring E, Aspöck U (2004) Phylogeny of the Neuropterida: a first molecular approach. *Systematic Entomology* **29**:415-430.
- Harmon LJ, Schulte JA, Larson A, Losos JB (2003) Tempo and mode of evolutionary radiation in iguanian lizards. *Science* **301**:961-964.
- Harper GL, King RA, Dodd CS, Harwood JD, Glen DM, Bruford MW, Symondson WOC (2005) Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets. *Molecular Ecology* **14**:819-828.
- Harpke D, Peterson A (2008) 5.8S motifs for the identification of pseudogenic ITS regions. *Botany* **86**:300-305.
- Harrington MG, Edwards KJ, Johnson SA, Chase MW, Gadek PA (2005) Phylogenetic Inference in Sapindaceae sensu lato Using Plastid *matK* and *rbcL* DNA Sequences. *Systematic Botany* **30**:366-382.
- Harris SA, Ingram R (1991) Chloroplast DNA and Biosystematics: The effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon* **40**: 393-412.
- Hartmut R, Mackie IM, Pryde S, Gonzales-Sotelo C, Medina I, Perez-Martin R, Quinteiro J, Rey-Mendez M (1999) Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: Validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA-patterns. *Food Chemistry* **64**:263-268.
- Hashiguchi Y, Nishida M (2005) Evolution of vomeronasal-type odorant receptor genes in the zebrafish genome. *Gene* **362**:19-28.
- Hassouna N, Mithot B, Bachellerie J-P (1984) The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA In higher eukaryotes. *Nucleic Acids Research* **12**:3563-3583.
- Hastings WK (1970) Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* **57**:97.
- Hawkeswood TJ (1986). New Food Plants for Adults of Three Species of the Australian Genus *Lamprolina* (Coleoptera: Chrysomelidae) *The Coleopterists Bulletin* **40**:104.
- Hawkeswood TJ (1988) A survey of the leaf beetles (Coleoptera:Chrysomelidae) from the Townsville district, northern Queensland, Australia. *Giornale Italiano di Entomologia* **4**:93-112.

- Hawkeswood TJ, Takizawa H (2002) Taxonomy, biology and host plant of the Australian leaf beetle *Stethomela submetallica* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae) from the wet forests of north-eastern New South Wales, Australia, with descriptions of the egg, larva and adult. *Mauritiana* (Altenburg) **18**:245-249.
- Hay WW, DeConto RM, Wold CN, Wilson KM, Voigt S, Schulz M, Wold-Rosby A, Dullo WC, Ronov AB, Balukhovskiy AN, Soeding E (1999) Alternative global Cretaceous paleogeography. *En: Evolution of Cretaceous Ocean/climate systems*. Barrera E and Johnson C (eds.), págs. 1-48. Special Paper 332, Geological Society of America, Boulder, CO.
- Heads M (2006) Panbiogeography of *Nothofagus* (Nothofagaceae): analysis of the main species massings. *Journal of Biogeography* **33**:1066-1075.
- Heads M (2009) Inferring biogeographic history from molecular phylogenies. *Biological Journal of the Linnean Society* **98**:757-774.
- Heatwole H (1987) Major components and distribution of the terrestrial fauna. *En: Fauna of Australia*, Vol 1A, General Articles, Dyne GR, Walton DW (eds.), pp 101-135. Australian Government Printing Service, Canberra, Australia.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**:313-321.
- Hembry DH, Yoder JB, Goodman KR (2014) Coevolution and the Diversification of Life. *The American Naturalist* **184**:425-438.
- Hereward JP, Walter GH (2012) Molecular interrogation of the feeding behaviour of field captured individual insects for interpretation of multiple host plant use. *PLoS one* **7**:e44435.
- Hill RS, Read J (1991) A revised infrageneric classification of *Nothofagus* (Fagaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **105**:37-72.
- Hill RS (1994) *En: History of the Australian vegetation: Cretaceous to Recent*. Cambridge University Press.
- Hill RS (1998) Fossil evidence for the onset of xeromorphy and scleromorphy in Australian Proteaceae. *Australian Systematic Botany* **11**:391-400.
- Hill RS, Truswell EM, McLoughlin S, Dettman ME (1999) The Evolution of the Australian Flora: Fossil Evidence. *En: Orchard AE and Thompson HS (eds.). Flora of Australia*. Australian Biological Resources Study/CSIRO Publishing.
- Hill RS (2004) Origins of the southeastern Australian vegetation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences*. **359**:1537-1549.
- Hill W, Pickering CM (2006) Vegetation associated with different walking track types in the Kosciuszko alpine area, Australia. *Journal of Environmental Management* **78**:24-34.
- Hille R, Lambers D (1979) Aphids as botanists? *Symbolae Botanicae Upsaliensis* **22**:114-119.
- Hillis DM, Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology* **66**:411-453.
- Hilu KW, Borsch T, Müller K, Soltis DE, Soltis PS, Savolainen V, Chase MW, Powell MP, Alice LA, Evans R, Sauquet H, Neinhuis C, Slotta TAB, Rohwer JG, Campbell CS, Chatrou LW (2003) Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *American Journal of Botany* **90**:1758-1776.
- Ho S, Phillips M (2009) Accounting for calibration uncertainty in phylogenetic estimation of evolutionary divergence times. *Systematic Biology* **58**:367-380.
- Hofacker L (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Research* **31**:3429-3431.
- Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP (2011) Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS one* **6**:e19254.



- Holt BG, Lessard J-F, Borregaard MK, Fritz SA, Araújo MB, Dimitrov D, Fabre P-H, Graham CH, Graves GR, Jonsson KA, Nogués-Bravo D, Wang, Z, Whittaker RJ, Fjeldsa J, Rahbek C (2013) An update of Wallace's zoogeographic regions of the world. *Science* **339**: 74-77.
- Hoogendoorn M, Heimpel GE (2001) PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Molecular Ecology* **10**:2059-2067.
- Hoot SB, Douglas AW (1998) Phylogeny of the Proteaceae based on *atpB* and *atpB-rbcL* intergenic spacer region sequences. *Australian Systematic Botany* **11**:301-320.
- Hope FW (1840) *The Coleopterist's Manual*. Part 3. 191 págs. London.
- Hovemann B, Richter S, Walldorf U, Cziepluch C (1988) Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. *Nucleic Acids Research* **16**:3175-3194.
- Howden HF (1981) Zoogeography of some Australian Coleoptera as exemplified by the Scarabaeoidea. *En: Ecological Biogeography of Australia*, Keast A (ed.), The Hague: Dr W. Junk.
- Hsiao J, Li H (1973) Chromatographic Studies on the Red Horse-Chestnut (*Aesculus X carnea*) and its Putative Parent Species. *Brittonia* **25**:57-63.
- Hsiao TH (1994) Molecular techniques for studying systematics and phylogeny of Chrysomelidae. págs. 237-248 *En: Jolivet PH, Cox ML, Petitpierre E (eds.) Novel aspects of the biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Huang TI, Reed DA, Perring TM, Palumbo JC (2014) Host selection behavior of *Bagrada hilaris* (Hemiptera: Pentatomidae) on commercial cruciferous host plants. *Crop Protection* **59**:7-13.
- Huang X (1992) A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics* **14**:18-25.
- Hudelot C, Gowri-Shankar V, Jow H, Rattray M, Higgs P (2003) RNA-based Phylogenetic Methods: Application to Mammalian Mitochondrial RNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **28**:241-252.
- Hung G-C, Chilton NB, Beveridge I, Gasser RB (1999) Secondary structure model for the ITS-2 precursor rRNA of strongyloid nematodes of equids: implications for phylogenetic inference. *International Journal for Parasitology* **29**:1949-1964.
- Hunt AJ, Gullan PJ, Reid CAM (1996) Chrysomelidae (Coleoptera) and other phytophagous insects in a plantation of black wattle, *Acacia mearnsii* De Wild., in southeastern Australia. *Australian Journal of Entomology* **35**:85-92.
- Hunt T, Bergsten J, Levkanicova Z, Papadopoulou A, St John O, Wild R, Hammond PM, Ahrens D, Balke M, Caterino MS, Gómez-Zurita J, Ribera I, Barraclough TG, Bocakova M, Bocak L, Vogler AP (2007) A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science* **318**:1913-1916.
- Hunter JT (2002) Vegetation and floristics of Mount Canobolas State Recreation Area, Orange, New South Wales. *Cunninghamia* **7**:501-526.
- Hurvich CM, Tsai C-L (1989) Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika* **76**:297-307.
- IBM Company (2009) PASW Statistics 18. Somers, New York.
- Imaizumi K, Akutsu T, Miyasaka S, Yoshino M (2007) Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA. *International Journal of Legal Medicine* **121**:184-191.
- Inda LA, Pimentel M, Chase MW (2010) Contribution of mitochondrial *cox1* intron sequences to the phylogenetics of tribe Orchideae (Orchidaceae): Do the distribution and sequence of this intron in orchids also tell us something about its evolution?. *Taxon* (2010):1053-1064.

- Irwin D, Kocher T, Wilson A (1991) Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* **32**:128-144.
- Isley FB, Alexander G (1949) Analysis of insect food habits by crop examination. *Science* **109**:115-116.
- Iwabe N, Hara Y, Kumazawa Y, Shibamoto K, Saito Y, Miyata T, Katoh K (2005) Sister group relationship of turtles to the bird-crocodilian clade revealed by nuclear DNA-coded proteins. *Molecular Biology and Evolution* **22**:810-813.
- Jackson RR (1986) Silk utilization and defensive behavior of *Thiania*, an iridescent jumping spider (Araneae, Salticidae) from Malaysia. *New Zealand Journal of Zoology* **13**:553-561.
- Jackson RR, Hallas SEA (1986) Predatory versatility and intraspecific interactions of spartaeine jumping spiders (Araneae: Salticidae): *Brettus adonis*, *B. cingulatus*, *Cyrrba algerina* and *Phaecius* sp. indet. *New Zealand Journal of Zoology* **13**:491-520.
- Jackson WD (1968) Fire and the Tasmanian Flora. *En: Tasmanian Year Book 2/1968*, págs. 50-55. Government printer. Hobart.
- Janz N (2011) Ehrlich and Raven revisited: mechanisms underlying codiversification of plants and enemies. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **42**:71-89.
- Janzen DH (1985) On ecological fitting. *Oikos* **45**:308-310.
- Janzen DH, Hallwachs W (1994) *All Taxa Biodiversity Inventory (ATBI) of Terrestrial Systems. A generic protocol for preparing wildland biodiversity for non-damaging use*. Report of a NSF Workshop, 16-18 April 1993, Philadelphia, PA.
- Jermey T (1994) Hypotheses on oligophagy: how far the case of the Colorado potato beetle supports them. *En: P.H. Jolivet, M.L. Cox and E. Petitpierre (eds.). Novel aspects of the biology of Chrysomelidae*, 127-139. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Johnson CD (1980) The use of host preferences as taxonomic characters of bruchid beetles (Coleoptera: Bruchidae) feeding in the seeds of *Cassia* (Leguminosae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **53**:27-34.
- Johnson LAS, Briggs BG (1975) On the Proteaceae-the evolution and classification of a southern family. *Botanical Journal of the Linnean Society* **70**:83-182.
- Johnson LA, Soltis DE (1998) Assessing congruence: Empirical examples from molecular data. *En: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ (eds.) Molecular systematics of plants II: DNA sequencing* Kluwer, Norwell, Massachusetts. Págs. 297-348.
- Jolivet P, Hawkeswood TJ (1995) *Host-plants of Chrysomelidae of the world*. Backhuys, Leiden, 281 págs.
- Jolivet P, Petitpierre E (1976) Les plantes-hôtes connues des *Chrysolina* (Col Chrys) Essai sur les types de sélection trophique. *Annales de la Société Entomologique de France (N. S.)* **12**:123-149.
- Jolivet P, Verma KK (2008) On the origin of the chrysomelid fauna of New Caledonia. *En: Research on Chrysomelidae*, Vol. 1. Jolivet PJ, Santiago-Blay, Schmitt M (eds.), págs. 309-319. Brill Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Jordal BH (2002) Elongation Factor 1  $\alpha$  resolves the monophyly of the haplodiploid ambrosia beetles Xyleborini (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Molecular Biology* **11**:453-465.
- Jordal BH, Kirkendall LR, Harkestad K (2004) Phylogeny of a Macaronesian radiation: host-plant use and possible cryptic speciation in *Liparthrum* bark beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**:554-571
- Jordal BH, Sequeira AS, Cognato AI (2011) The age and phylogeny of wood boring weevils and the origin of subsociality. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **59**:708-724.
- Jordal BJ, Normark BB, Farrell BD, Kirkendall LR (2002) Extraordinary haplotype diversity in haplodiploid inbreeders: phylogenetics and evolution of the bark beetle genus *Coccotrypes*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **23**:171-188.

- Joseph N, Krauskopf E, Vera MI, Michot B (1999) Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Research* **27**:4533-4540.
- Jost MC, Shaw KL (2006) Phylogeny of Ensifera (Hexapoda: Orthoptera) using three ribosomal loci, with implications for the evolution of acoustic communication. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**:510-530.
- Juen A, Traugott M (2005) Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: a case study using a soil insect predator-prey system. *Oecologia* **142**:344-352.
- Jurado-Rivera JA, Vogler AP, Reid CAM, Petitpierre E, Gómez-Zurita J (2009) DNA barcoding insect-host plant associations. *Proceedings of the Royal Society B* **276**:639-648.
- Kambhampati S (1995) A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**:2017-2020.
- Kanthaswamy S, Binida-Emonds O, Warden C, Viray J, Smith D (2001) Use of SSR fragment length homozygotes for orangutan systematics. *Primates* **42**:35-45.
- Katoh K, Kuma K-I, Toh H, Miyata T (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* **33**:511-518.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**:3059-3066.
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution* **30**:772-780.
- Katoh K, Toh H (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* **9**:286-298.
- Kearns AM, Joseph L, Cook L (2013) A multilocus coalescent analysis of the speciation history of the Australo-Papuan butcherbirds and their allies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **66**:941-952.
- Keller A, Schleicher T, Förster F, Ruderisch B, Dandekar T, Müller T, Wolf M (2008) ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (Sphaeropleales). *BMC Evolutionary Biology* **8**:218.
- Kennedy, JS (1953) *Host plant selection in Aphididae*. Transactions of the 9<sup>th</sup> International Congress of Entomology (Amsterdam) **2**:106-113.
- Kergoat GJ, Silvain J-F, Buranapanichpan S, Tuda M (2007) When insects help to resolve plant phylogeny: evidence for a paraphyletic genus *Acacia* from the systematics and host-plant range of their seed-predators. *Zoologica Scripta* **36**:143-152.
- Kershaw AP, Martin HA, McEwen Mason JRC (1994) The Neogene: a period of transition. *En: History of the Australian vegetation: Cretaceous to Recent*. Hill RS (ed.), págs. 299-327. Cambridge University Press.
- Kim CG, Zhou HZ, Imura Y, Tominaga O, Su ZH, Osawa S (2000) Pattern of morphological diversification in the *Leptocarabus* ground beetles Coleoptera, Carabidae as deduced from mitochondrial ND5 gene and nuclear 28S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* **17**:137-145.
- Kim K-J, Jansen RK (1995) *ndhF* sequence evolution and the major clades in the sunflower family. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**:10379-10383.
- Kim MJ, Jung KS, Park NS, Wan X, Kim KG, Jun J, Yoon TJ, Bae YJ, Lee SM, Kim I (2014) Molecular phylogeny of the higher taxa of Odonata (Insecta) inferred from COI, 16S rRNA, 28S rRNA, and EF1- $\alpha$  sequences. *Entomological Research* **44**:65-79.

- Kimoto S (1962) A phylogenetic consideration of Chrysomelinae based on immature stages of Japanese species. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* **12**:67-115.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**:111-120.
- Kippenberg H (2010) *Catalogue of Palaearctic Coleoptera* Vol.6 Chrysomeloidea. Löbl I, Smetana A (eds.). Apollo Books, Stenstrup, Denmark págs.390-442.
- Kjer KM (1995) Use of rRNA Secondary Structure in Phylogenetic Studies to Identify Homologous Positions: An Example of Alignment and Data Presentation from the Frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **4**:314-330.
- Kjer KM, Baldrige GD, Fallon AM (1994) Mosquito large subunit ribosomal RNA: simultaneous alignment of primary and secondary structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* **1227**:147-155.
- Klein H (2011) A catalogue of the insects, mites and pathogens that have been used or rejected, or are under consideration, for the biological control of invasive alien plants in South Africa. *African Entomology: Biological control of invasive alien plants in South Africa* (1999-2010): Special Issue 2, **19**:515-549.
- Knapp M, Stöckler K, Havell D, Delsuc F, Sebastiani F, Lockhart PJ (2005) Relaxed molecular clock provides evidence for long-distance dispersal of *Nothofagus* (southern beech). *Plos Biology* **3**:e14.
- Koch K (1992) *Die Käfer Mitteleuropas 3, Ökologie*. Goecke & Evers, Krefeld, Germany.
- Koetschan C, Förster F, Keller A, Schleicher T, Ruderisch B, Schwarz R, Müller T, Wolf M, Schultz J (2010) The ITS2 Database III - sequences and structures for phylogeny. *Nucleic Acids Research* **38**:D275-279.
- Köpf A, Rank NE, Roininen H, Julkunen-Tiitto R, Pasteels JM, Tahvanainen J (1998) The Evolution of Host-Plant Use and Sequestration in the Leaf Beetle Genus *Phratora* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Evolution* **52**:517-528.
- Kress WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *Plos One* **6**:e508.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**:8369-8374.
- Krienitz L, Bock C, Dadheech PK, Pröschold T (2011) Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species. *Phycologia* **50**:89-106.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**:150-163.
- Kundrata R, Bocak L (2011) The phylogeny and limits of Elateridae (Insecta, Coleoptera): is there a common tendency of click beetles to soft-bodiedness and neoteny? *Zoologica Scripta* **40**:364-378.
- Kundrata R, Bocakova M, Bocak L (2014) The comprehensive phylogeny of the superfamily Elateroidea (Coleoptera: Elateriformia). *Molecular phylogenetics and evolution* **76**:162-171.
- Kuschel, G. (1990) *Beetles in a suburban environment: a New Zealand case study. The identity and status of Coleoptera in the natural and modified habitats of Lynfield, Auckland (1974-1989)*. DSIR Plant Protection Report No. 3. 119 págs.
- Ladiges PY (1997) Phylogenetic history and classification of eucalypts. *En: Eucalypt Ecology: Individuals to Ecosystems*. Williams J, Woinarski J (eds.). págs. 16-29. Cambridge University Press, Melbourne.
- Ladiges PY, McFadden GI, Middleton N, Orlovich DA, Treloar N, Udovicic F (1999) Phylogeny of *Melaleuca*, *Callistemon*, and related genera of the *Beaufortia*

- suballiance (Myrtaceae) based on 5S and ITS-1 spacers regions of nrDNA. *Cladistics* **15**:151-172.
- Ladiges PY, Udovicic F (2000) Comment on a new classification of the eucalypts. *Australian Systematic Botany* **13**:149-152.
- Ladiges PY, Udovicic F, Nelson G (2003) Australian biogeographical connections and the phylogeny of large genera in the plant family Myrtaceae. *Journal of Biogeography* **30**:989-998.
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V (2008) DNA barcoding the floras of diversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**:2923-2928.
- Lam N, Wilson PG, Heslewood MM, Quinn CJ (2002) A phylogenetic analysis of the *Chamalaucium* alliance (Myrtaceae). *Australian Systematic Botany* **15**:535-543.
- Landis CA, Campbell HJ, Begg JG, Mildenhall DC, Paterson AM, Trewick SA (2008) The Waipounamu Erosion Surface: questioning the antiquity of the New Zealand land surface and terrestrial fauna and flora. *Geological Magazine* **145**:173-197.
- Landrum LR, Stevenson D (1986) Variability of embryos in subtribe Myrtinae (Myrtaceae). *Systematic Botany* **11**:155-162.
- Lawrence JF, Hastings AM, Dallwitz MJ, Paine TA, Zurcher EJ (1999) Beetles of the World: A key and information system for families and subfamilies. CSIRO Publishing. Australia.
- Lawson SA, McDonald J (2005) Emerging insect pest of *Corymbia*. *Corymbia Research Meeting*. The State of Queensland, Department of Primary Industries and Fisheries, Queensland, Australia.
- Lawver LA, Gahagan LM (2003) Evolution of Cenozoic seaways in the circum-Antarctic region. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **198**:11-37.
- Lea AM (1903) Descriptions of some new species of Australian and Tasmanian Chrysomelidae. *Report of the Australasian Association for the Advancement of Science* **9**:384-431.
- Lea AM (1916) Notes on some miscellaneous Coleoptera, with descriptions of new species, part II. *Transactions of the Royal Society of South Australia* **40**:272-436.
- Lea AM (1916) Notes on some miscellaneous Coleoptera. Part II. *Transactions of the Royal Society of South Australia* **40**:272-436.
- Lea AM (1917) Descriptions of new species of Australian Coleoptera. Part xiii. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* **42**:545-582.
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**:203-221.
- Li J, Alexander JH, Zhang D (2002) Paraphyletic *Syringa*: evidence from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS and ETS regions. *Systematic Botany* **27**:592-597.
- Li X, Yang Y, Henry RJ, Rossetto M, Wang Y, Chen S (2014) Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews*. DOI: 10.1111/brv.12104
- Li YW, Zhou X, Feng G, Hu HY, Niu LM, et al. (2010) COI and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae). *Molecular Ecology Resources* **10**:31-40.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**:1451-1452.
- Lin C-P, Danforth BN (2004) How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**:686-702.
- Lipman DJ, Pearson WR (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* **227**:1435-1441.

- Liu J-Q, Gao T-G, Chen Z-D, Lu A-M (2002) Molecular phylogeny and biogeography of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Nannoglottis* (Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **23**:307-325.
- Liu Y, Yan H-F, Cao T, Ge X-J (2010) Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (mosses). *Journal of Systematics and Evolution* **48**:36-46.
- Livshultz T, Middleton DJ, Endress ME, Williams JK (2007) Phylogeny of Apocynoideae and the Apsa clade (Apocynaceae s.l.). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **94**:324-359.
- Loch AD (2005) Mortality and recovery of eucalypt beetle pest and beneficial arthropod populations after commercial application of the insecticide alpha-cypermethrin. *Forest Ecology and Management* **217**:255-265.
- Lohman DJ, Bruyn M, Page T, von Rintelen K, Hall R, Ng PKL, Shih H-T, Carvalho GR, von Rintelen T (2011) Biogeography of the Indo-Australian Archipelago. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **42**:205-226.
- Long EO, Dawid IB (1980) Repeated genes in Eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry* **49**:727-764.
- López-Giráldez F, Townsend JP (2011) PhyDesign: an online application for profiling phylogenetic informativeness. *BMC Evolutionary Biology* **11**:152.
- López-Vaamonde C, Wikstrom N, Labandeira C, Godfray HCJ, Goodman SJ, Cook JM (2006) Fossil-calibrated molecular phylogenies reveal that leaf-mining moths radiated millions of years after their host plants. *Journal of Evolutionary Biology* **19**:1314-1326.
- Louda SM, Kendall D, Connor J, Simberloff D (1997) Ecological effects of an insect introduced for the biological control of weeds. *Science* **277**:1088-1090.
- Löytynoja A, Vilella AJ, Goldman N (2012) Accurate extension of multiple sequence alignments using a phylogeny-aware graph algorithm. *Bioinformatics* **28**:1684-1691.
- Luckow M, Miller JT, Murphy DJ, Livshultz T (2003) A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. *En: Advances in Legume Biology, part 10, Higher Level Systematics*. págs. 197-220. Klitgaard BB, Bruneau A (eds.). Kew: Royal Botanic Gardens.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM (1996) The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* **5**:153-165.
- Lynch M (2010) Evolution of the mutation rate. *Trends in Genetics* **26**:345-352.
- Macphail MK (2007) Australian Palaeoclimates: Cretaceous to Tertiary: a Review of Palaeobotanical and Related Evidence to the Year 2000. Special Volume. CRC LEME.
- Macphail MK, Hill RS (2001) Palaeobotany of *Acacia* and related Mimosaceae. In "Flora of Australia. Volume 11A: Mimosaceae, *Acacia* part 1. Ed. Australian Biological Resource Study págs. 13-29. SCIRO Publishing, Melbourne.
- Maddison DR, Swofford DL, Maddison WP (1997) NEXUS: an extendible file format for systematic information. *Systematic Biology* **46**:590-621.
- Maddison DR, Maddison WP (2005) MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.08a. <http://macclade.org>
- Maddison WP, Maddison DR (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>
- Maekawa K, Lo N, Kitade O, Miura T., Matsumoto T (1999) Molecular phylogeny and geographic distribution of wood-feeding cockroaches in east Asian islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **13**:360-376.
- Magnacca KN, Brown MJF (2010) Tissue segregation of mitochondrial haplotypes in heteroplasmic Hawaiian bees: implications for DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* **10**:60-68.

- Mai J, Coleman A (1997) The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *Journal of Molecular Evolution* **44**:258-271.
- Majer JD, Recher HF, Wellington AB, Woinarski JCZ, Yen AL (1997) Invertebrates of eucalypt formations. *En: Eucalypt Ecology: Individuals to Ecosystems*. Williams JE, Woinarski JCZ (eds.), págs. 278-302. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Malcomber ST (2002) Phylogeny of *Gaertnera* Lam. (Rubiaceae) Based on Multiple DNA Markers: Evidence of a Rapid Radiation in a Widespread, Morphologically Diverse Genus. *Evolution* **56**:42-57.
- Malek O, Lättig K, Hiesel R, Brennicke A, Knoop V (1996) RNA editing in bryophytes and a molecular phylogeny of land plants. *EMBO Journal* **15**:1403-1411.
- Manos PS (1997) Systematics of *Nothofagus* (Nothofagaceae) based on rDNA spacer sequences (ITS): Taxonomic congruence with morphology and plastid sequences. *American Journal of Botany* **8**:1137-1155.
- Mardulyn P, Milinkovitch MC, Pasteels JM (1997) Phylogenetic Analyses of DNA and Allozyme Data Suggest that *Gonioctena* Leaf Beetles (Coleoptera; Chrysomelidae) Experienced Convergent Evolution in Their History of Host-Plant Family Shifts. *Systematic Biology* **46**:722-747.
- Maroni G (1993) *An atlas of Drosophila genes*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Marsham T (1802) Entomologia Britannica, sistens insecta britanniae indigena, secundum methodum linnaeanam disposita. Tomus I. Coleoptera. White J, London XXXI. 548 págs.
- Martin HA (1994) Australian Tertiary phytogeography: evidence from palynology. In History of the Australian vegetation: Cretaceous to Recent. Hill RS (ed.), págs. 104-142. Cambridge University Press.
- Martin HA (2006) Cenozoic climatic change and the development of the arid vegetation in Australia. *Journal of Arid Environments* **66**:533-563.
- Martins TR, Barkman TJ (2005) Reconstruction of Solanaceae Phylogeny Using the Nuclear Gene SAMT. *Systematic Botany* **30**:435-447.
- Maslin BR (1975) Studies in the genus *Acacia* (Mimosaceae). A revision of the series *pulchellae*. *Nuytsia* **1**:388-494.
- Maslin BR, Pedley L (1988) Patterns of Distribution of *Acacia* in Australia. *Australian Journal of Botany* **36**:385-393.
- Maslin BR (1995) *Acacia* miscellany 14. Taxonomy of some Western Australian "Univerves-Racemosae" species (Leguminosae: Mimosoideae: section Phyllodineae). *Nuytsia* **10**:181-203.
- Maslin BR (2001) Introduction to *Acacia*. *En: Flora of Australia*, Vol. 11A Mimosaceae, *Acacia* Part 1. Orchard AE, Wilson AJG (eds.), págs. 3-13. ABR/CSIRO Publishing, Melbourne, Australia.
- Maslin BR (coordinator) (2001) *WATTLE Acacias of Australia*. CD ROM Publication. Australian Biological Resources Study, Canberra and Department of Conservation and Land Management, Perth, Western Australia, Australia.
- Maslin BR, Miller JT, Seigler DS (2003) Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Australian Systematic Botany* **16**:1-18.
- Matheson CD, Muller GC, Junnila A, Vernon K, Hausmann A, Miller MA, Greenblatt C, Schlein Y (2008) A PCR method for detection of plant meals from the guts of insects. *Organism, Diversity and Evolution* **7**:294-303.
- Matthews EG, Reid CAM (2002) *A guide to the genera of beetles of South Australia*. Part 8. Polyphaga: Chrysomeloidea: Chrysomelidae. South Australian Museum, Adelaide, Australia.
- May RM (1988) How many species are there on earth? *Science* **241**:1441-1449.
- Mayr E (1969) Principles of Systematic Zoology. McGraw-Hill, New York, 428 págs.
- McDade LA, Daniel TF, Kiel CA, Vollesen K (2005) Phylogenetic relationships among *Acantheae* (Acanthaceae): major lineages present contrasting patterns of

- molecular evolution and morphological differentiation. *Systematic Botany* **30**:834-862.
- McDougall KL, Walsh NG (2007) Treeless vegetation of the Australian Alps. *Cunninghamia* **10**:1-57.
- McGowran B, Holdgate GR, Li Q, Gallagher SJ (2004) Cenozoic stratigraphic succession in southeastern Australia. *Australian Journal of Earth Sciences*, **51**:459-496.
- McLoughlin S (2001) The breakup history of Gondwana and its impact on pre-Cenozoic floristic provincialism. *Australian Journal of Botany* **49**:271-300.
- Messing J, Vieira J (1982) A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene* **19**:269-276.
- Michot B, Joseph N, Mazan S, Bachellerie JP (1999) Evolutionarily conserved structural features in the ITS2 of mammalian pre-rRNAs and potential interactions with the snoRNA U8 detected by comparative analysis of new mouse sequences. *Nucleic Acids Research* **27**:2271-2282.
- Mickevich MF, Farris JS (1981) The implications of congruence in *Menidia*. *Systematic Zoology* **30**:351-370.
- Miller JT, Bayer RJ (2001) Molecular phylogenetics of *Acacia* (Fabaceae: Mimosoideae) based on the chloroplast *matK* coding sequence and flanking *trnK* intron spacer regions. *American Journal of Botany* **88**:697-705.
- Miller JT, Bayer RJ (2003) Molecular phylogenetics of *Acacia* subgenera *Acacia* and *Aculeiferum* (Fabaceae: Mimosoideae), based on the chloroplast *matK* coding sequence and flanking *trnK* intron spacer regions. *Australian Systematic Botany* **16**:27-33.
- Miller JT, Grimes JW, Murphy DJ, Bayer R.J, Ladiges PY (2003) A phylogenetic analysis of the Acacieae and Ingeae (Mimosoideae: Fabaceae) based on *trnK*, *matK*, *psbA-trnH*, and *trnL/trnF* sequence data. *Systematic Botany* **28**:558-566.
- Miller JT, Murphy DJ, Brown GK, Richardson DM, González-Orozco CE (2011) The evolution and phylogenetic placement of invasive Australian *Acacia* species. *Diversity and Distributions* **17**:848-860.
- Miller JT, Seigler D (2012) Evolutionary and taxonomic relationships of *Acacia sl* (Leguminosae: Mimosoideae). *Australian Systematic Botany* **25**:217-224.
- Miller JT, Murphy DJ, Ho SY, Cantrill DJ, Seigler D (2013) Comparative dating of *Acacia*: combining fossils and multiple phylogenies to infer ages of clades with poor fossil records. *Australian Journal of Botany* **61**:436-445.
- Miller KB, Bergsten J (2014) The Phylogeny and Classification of Predaceous Diving Beetles. En: *Ecology, Systematics, and the Natural History of Predaceous Diving Beetles (Coleoptera: Dytiscidae)* (págs. 49-172). Springer Netherlands.
- Mitchell A, Cho S, Regier JC, Mitter C, Poole RW, Matthews M (1997) Phylogenetic utility of elongation factor-1 alpha in noctuoidea (Insecta: Lepidoptera): the limits of synonymous substitution. *Molecular Biology and Evolution* **14**:381-390.
- Mitter C, Farrell BD, Futuyma DJ (1991) Phylogenetic studies of insect-plant interactions: insight into the genesis of diversity. *Trends in Ecology and Evolution* **6**:290-293.
- Monaghan MT, Inward DJG, Hunt T, Vogler AP (2007) A molecular phylogenetic analysis of the Scarabaeinae (dung beetles). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **45**:674-692.
- Monteith GB (1990) Rainforest insects: biodiversity, bioguesstimation, or just hand-waving? *Myrmecia* **26**:93-95.
- Monteith GB (1991) Corrections to published information on *Johannica gemellata* (Westwood) and other Chrysomelidae. *Victorian Entomologist* **21**:147-154.
- Moreau CS, Bell CD, Vila R, Archibald SB, Pierce NE (2006) Phylogeny of the ants: Diversification in the age of angiosperms. *Science* **312**: 101-104.
- Morgan TH, Bridges CB, Sturtevant AH (1925) The genetics of *Drosophila melanogaster*. *Bibliographia Genetica* **2**:1-262.



- Morris DC, Schwarz MP, Cooper SJB, Mound LA (2002) Phylogenetics of Australian Acacia thrips: the evolution of behaviour and ecology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **25**:278-292.
- Morris DC, Schwarz MP, Crespi BJ, Cooper SJB (2001) Phylogenetics of gall-inducing thrips on Australian *Acacia*. *Biological Journal of the Linnean Society* **74**:73-86.
- Motschulsky V (1860) Coléoptères de la Sibirie orientale et un particulier des rives de l'Amour. Schrenk (ed.) *Reisen und Forschungen im Amurlande*. Vol. 2. St. Petersburg. 77-257 págs.
- Moulton JK, Wiegmann BM (2004) Evolution and phylogenetic utility of CAD (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**:363-378.
- Mtambo J, Van Bortel W, Madder M, Roelants P, Backeljau T (2006) Comparison of Preservation Methods of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) for Reliable DNA Amplification by PCR. *Experimental and Applied Acarology* **38**:189-199.
- Müller T, Philippi N, Dandekar T, Schultz J, Wolf M (2007) Distinguishing species. *RNA* **13**:1469-1472.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro by a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335-350.
- Murdoch FA (2005) *Restoration ecology in the semi-arid woodlands of north-west Victoria*. Ph.D. Thesis. School of Science and Engineering, University of Ballarat. Victoria, Australia.
- Murphy DJ, Udovicic F, Ladiges PY (2000) Phylogenetic analysis of Australian *Acacia* (Leguminosae:Mimosoideae) by using sequence variations of an intron and two intergenic spacers of chloroplast DNA. *Australian Systematic Botany* **13**:745-754.
- Murphy DJ, Miller JT, Bayer RJ, Ladiges PY (2003) Molecular phylogeny of *Acacia* subgenus *Phyllodineae* (Mimosoideae; Leguminosae) based on DNA sequences of the internal transcribed spacer region. *Australian Systematic Botany* **16**:19-26.
- Murphy DJ, Brown GK, Miller JT, Ladiges P (2010) Molecular phylogeny of *Acacia* Mill. (Mimosoideae: Leguminosae): Evidence for major clades and informal classification. *Taxon* **59**:7-19.
- Murphy SM (2004) Enemy-free space maintains swallowtail butterfly host shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**:18048-18052.
- Nahrung HF, Allen GR (2004) Population dynamics of the chrysomelid leaf beetle *Chrysophtharta agricola* (Chapuis), a pest of *Eucalyptus nitens* plantations in Tasmania. *Tasforests* **15**:67-84.
- Nakai T (1920) *Chosenia*, a new genus of Salicaceae. *Botanical Magazine (Tokyo)* **34**:66-69.
- Nee S, Mooers AO, Harvey PH (1992) Tempo and mode of evolution revealed from molecular phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**:8322-8326.
- Nee SC, May RM, Harvey P (1994) The reconstructed evolutionary process. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* **344**:305-311.
- Nei M, Li W-H (1979) Mathematical models for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**:5269-5273.
- New TR (1984) *A biology of Acacias*. Oxford University Press in association with La Trobe University Press, 153 págs.
- New TR, Yen AL (2012) Insect conservation in Australia. En: *Insect Conservation: Past, Present and Prospects* (págs. 193-212). Springer Netherlands.

- Nickrent KA, Soltis DE (1995) A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear 18S rDNA and *rbcL* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **81**:484-533.
- Niedenzu F (1898) Myrtaceae. *En: Engeler A., Prantl K. (eds.) Die natürlichen Pflanzenfamilien*, vol. 3. Engelmann, Leipzig, págs. 57-105.
- Nielsen EB, West JG (1994) Biodiversity research and biological collections: transfer of information. *In Forey PL, Humphries CJ, y Vane-Wright RI (eds.), Systematics and Conservation Evaluation*. Systematics Association Special Volume **50**:101-121. Oxford.
- Nishikawa T, Vaughan DA, Kadowaki K-i (2005) Phylogenetic analysis of *Oryza* species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes. *Theoretical and Applied Genetics* **110**:696-705.
- Nishiyama T, Wolf PG, Kugita M, Sinclair RB, Sugita M, Sugiura C, Wakasugi T, Yamada K, Yoshinaga K, Yamaguchi K, Ueda K, Hasebe M (2004) Chloroplast phylogeny indicates that bryophytes are monophyletic. *Molecular Biology and Evolution* **21**:1813-1819.
- Normark BB, Jordal BH, Farrell BD (1999) Origin of a haplodiploid beetle lineage. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **266**:2253-2259.
- Nuin PAS, Wang Z, Tillier ERM (2006) The accuracy of several multiple sequence alignment programs for proteins. *BMC Bioinformatics* **7**:471
- Nye TMW, Liò P, Gilks WR (2006) A novel algorithm and web-based tool for comparing two alternative phylogenetic trees. *Bioinformatics* **22**:117-119.
- Nylander JAA (2004) MrAIC.pl. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- O'Brien MM, Quinn CJ, Wilson PG (2000) Molecular systematics of the *Leptospermum* suballiance (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany* **48**: 621-628.
- O'Grady PM, Remsen J, Gatesy JE (2002) Partitioning of multiple data sets in phylogenetic analysis. *En: Methods and Tools in Biosciences and Medicine. Techniques in Molecular Systematics and Evolution*, págs. 102-119. DeSalle R, Giribet G, Weeler W (eds.) Birkhäuser, Berlin.
- Ochieng JW, Steane DA, Ladiges PY, Baverstock PR, Henry RJ, Shepherd M (2007) Microsatellites retain phylogenetic signals across genera in eucalypts. *Genetics and Molecular Biology* **30**:1125-1134.
- Ohmart CP, Edward PB (1991) Insect herbivory on *Eucalyptus*. *Annual Review of Entomology* **36**:637-657.
- Ohmart CP (1996) Population dynamics of chrysomelid beetles feeding on *Eucalyptus*. *En: Jolivet PH, Cox ML (eds.) Chrysomelidae biology*, vol. 2: Ecological studies. SPB Academic Publishing, New York, 263-269.
- Ohmart CP, Stewart LG, Thomas JR (1985) Effects of food quality, particularly nitrogen concentrations, of *Eucalyptus blakelyi* foliage on the growth of *Paropsis atomaria* larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *Oecologia* **65**:543-549.
- Oliveira FB, Cassola Molina E, Marroig G (2010) Paleogeography of the South Atlantic: a Route for Primates and Rodents into the New World? *En: Garber PA, Estrada A, Bicca-Marques JC, Heymann EW, Strier KB (eds.). South American primates, developments in primatology: progress and prospects*. Houten (The Netherlands): Springer Science. págs. 55-68.
- Olivier AG (1807) Entomologie, ou Historie Naturelle des Insectes Coléoptères. Tome Cinquième. Chez Desray. Paris.
- Olmstead RG, dePamphilis CW, Wolfe AD, Young ND, Elisons WJ, Reeves PA (2001) Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* **88**:348-361.
- Olmstead RG, Reeves PA (1995) Evidence for the Polyphyly of the Scrophulariaceae Based on Chloroplast *rbcL* and *ndhF* Sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **82**:176-193.

- Orchard AE, Wilson AJG (eds.) (2001) Flora of Australia. Volume 11A & 11B, Mimosaceae, Acacia. Australian Biological Resources Study, Canberra, & CSIRO Publishing: Melbourne, Australia.
- Otte D, Joern A (1977) On feeding patterns in desert grasshoppers and the evolution of specialized diets. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **128**:89-126.
- Õunap E, Javoš J, Viidalepp J, Tammaru T (2011) Phylogenetic relationships of selected European Ennominae (Lepidoptera: Geometridae). *European Journal of Entomology* **108**:267-273.
- Palmer JD (1991) Plastid chromosomes: structure and evolution. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* **7**:5-53.
- Palmer W, Senaratne K (2007) The host range and biology of *Cometaster pyrula*; a biocontrol agent for *Acacia nilotica* subsp. *indica* in Australia. *BioControl* **52**:129-143.
- Pang X, Song J, Zhu Y, Xie C, Chen S (2010) Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae. *Planta Medica* **76**:1784-1786.
- Papadopoulou A, Anastasiou I, Keskin B, Vogler AP (2009) Comparative phylogeography of tenebrionid beetles in the Aegean archipelago: the effect of dispersal ability and habitat preference. *Molecular Ecology* **18**:2503-2517.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: An R package for analyses of phylogenetics and evolution. *Bioinformatics* **20**:289-290.
- Pardo C, Cubas P, Tahiri H (2004) Molecular phylogeny and systematics of *Genista* (Leguminosae) and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (*trnL-trnF* intergenic spacer). *Plant Systematics and Evolution* **244**:93-119.
- Parker AR (1998) Colour in Burgess Shale animals and the effect of light on evolution in the Cambrian. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **265**:967-972.
- Parra-O C, Bayly M, Udovicic F, Ladiges P (2006) ETS sequences support the monophyly of the eucalypt genus *Corymbia* (Myrtaceae). *Taxon* **55**:653-663.
- Pasteels JM, Rowell-Rahier M, Braekman JC, Daloz D (1994) Chemical defense of adult leaf beetles updated. págs. 289-301 *En: Jolivet PH, Cox ML, Petitpierre E (eds.) Novel Aspects of the Biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Pasteels JM, Termonia A, Daloz D, Windsor DM (2000) Distribution of toxins in chrysomeline leaf beetles: Possible taxonomic inferences. págs. 261-275 *En: Furth DG, Macedo MV (eds.) Special Topics in Leaf Beetle Biology*. Proceedings of the Vth International Symposium on the Chrysomelidae. BG-Sofia: Pensoft.
- Pasteels JM, Termonia A, Daloz D, Windsor DM (2003) Distribution of Toxins in Chrysomeline Leaf Beetles: Possible Taxonomic Inferences. *En: Furth DG, Special Topics in Leaf Beetle Biology*. Proceedings of the Fifth Symposium on the Chrysomelidae. Sofia: Pensoft Publishers, pp.261-275.
- Pearman PB, Lavergne S, Roquet C, Wüest R, Zimmermann NE, Thuiller W (2014) Phylogenetic patterns of climatic, habitat and trophic niches in a European avian assemblage. *Global Ecology and Biogeography* **23**:414-424.
- Pedley L (1975) Revision of the extra-Australian species of *Acacia* subg. *Heterophyllum*. *Contributions from the Queensland Herbarium* **18**:1-24.
- Pedley L (1978) A revision of *Acacia* Mill. in Queensland. *Austrobaileya* **1**:75-234.
- Pedley L (1986) Derivation and dispersal of *Acacia* (Leguminosae) with particular reference to Australia, and the recognition of *Senegalia* and *Racosperma*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **92**:219-254.
- Pelletier B (2006) Geology of the New Caledonia region and its implications for the study of the New Caledonian biodiversity. *En: Compendium of marine species*

- from New Caledonia. Payri C, Richer de Forges B (eds.). págs. 19-32. Dossiers Scientifiques et Techniques, II. IRD, Nouméa, New Caledonia.
- Petitpierre E, Gatewood JM, Schmid CW (1988) Satellite DNA from the beetle *Tenebrio molitor*. *Experientia* 44:498-499.
- Petitpierre E (1994) Estudi faunístic i ecològic dels Coleòpters Crisomèlids de la Vall d'Aran. *Butlletí de la Institució Catalana d'Història Natural* 62:77-108.
- Petitpierre E (1997) Los Chrysomelidae (Coleoptera) del Moncayo (Aragón). *ZAPATERI* 7:273-280.
- Petitpierre E, Elgueta M (2006) A cytogenetic study on three Chilean species of Chrysomelinae (Coleoptera, Chrysomelidae). *Folia Biologica (Kraków)* 54:87-91.
- Petitpierre E, Elgueta M (2012) A chromosomal analysis of four species of Chilean Chrysomelinae (Coleoptera, Chrysomelidae). *Comparative cytogenetics* 6:335.
- Pfossor MF, Guzy-Wróbelska J, Sun, B-Y, Stuessy TF, Sugawara T, Fujii N (2002) The Origin of Species of *Acer* (Sapindaceae) Endemic to Ullung Island, Korea. *Systematic Botany* 27:351-367.
- Phillimore AB, Price TD (2008) Density-dependent cladogenesis in birds. *PLoS biology* 6:e71.
- Phister TG, Rawsthorne H, Joseph CML, Mills DA (2007) Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Hanseniaspora* species from wine and juice. *American Journal of Enology and Viticulture* 58: 229-233.
- Pignatti E, Pignatti S, Lucchese F (1993) Plant Communities of the Stirling Range, Western Australia. *Journal of Vegetation Science* 4:477-488.
- Plazzi F, Passamonti M (2010) Towards a molecular phylogeny of Mollusks: Bivalves' early evolution as revealed by mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57:641-657.
- Pole M (1994) The New Zealand flora - entirely long-distance dispersal? *Journal of Biogeography* 21:625-635.
- Pond SLK, Frost SDW, Muse SV (2005) HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21:676-679.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, Hazell S, Kamoun S, Sumlin WD, Vogler AP (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic biology* 55:595-609.
- Pons J, Ribera I, Bertranpetit J, Balke M (2010) Nucleotide substitution rates for the full set of mitochondrial protein-coding genes in Coleoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56:796-807.
- Portlock C, Koch A, Scott W, Hanly P, Dutton S (1994). *Yalgorup National Park Management Plan 1995-2005*. Department of Conservation and Land Management for the National Parks and Nature Conservation Authority, Western Australia, Australia.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253-1256.
- Post DM (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83:703-718.
- Powell W, Machray GC, Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science* 1:215-222.
- Prasad PK, Tandon V, Biswal DK, Goswami LM, Chatterjee A (2009) Use of sequence motifs as barcodes and secondary structures of Internal Transcribed spacer 2 (ITS2, rDNA) for identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda: Fasciolidae). *Bioinformation* 3:314-320.
- Pybus OG, Harvey PH (2000) Testing macro-evolutionary models using incomplete molecular phylogenies. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 267:2267-2272.

- Qiu YL, Li L, Wang B, Xue JY, Hendry TA, LI RQ, Brown JW, Liu Y, Hudson GT, Chen ZD (2010) Angiosperm phylogeny inferred from sequences of four mitochondrial genes. *Journal of Systematics and Evolution* **48**:391-425.
- Quandt D, Müller K, Stech M, Frahm JP, Frey W, Hilu KW, Borsch T (2004) Molecular evolution of the chloroplast *trnL-F* region in land plants. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* **98**:13-37.
- R Development Core Team (2012) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria.
- Rabosky DL (2006a) Likelihood methods for detecting temporal shifts in diversification rates. *Evolution* **60**:1152-1164.
- Rabosky DL (2006b) LASER: a maximum likelihood toolkit for detecting temporal shifts in diversification rates from molecular phylogenies. *Evolutionary Bioinformatics Online* **2**:257-260.
- Rabosky DL, Lovette IJ (2008a) Density-dependent diversification in North American wood warblers. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **275**:2363-2371.
- Rabosky DL, Lovette IJ (2008b) Explosive evolutionary radiations: decreasing speciation or increasing extinction through time? *Evolution* **62**:1866-1875.
- Rahn K (1996) A phylogenetic study of the Plantaginaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **120**:145-198.
- Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4, <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution* **19**:2092-2100.
- Rasmussen C, Cameron Sa (2007) A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology* **32**:26-39.
- Raven PH, Yeates DK (2007) Australian biodiversity: threats for the present, opportunities for the future. *Australian Journal of Entomology* **46**:177-187.
- Regier JC, Paukstadt U, Paukstadt LH, Mitter C, Peigler RS (2005) Phylogenetics of Eggshell Morphogenesis in *Antheraea* (Lepidoptera: Saturniidae): Unique Origin and Repeated Reduction of the Aeropyle Crown. *Systematic Biology* **54**:254-267.
- Regier JC, Shultz JW (1997) Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods. *Molecular Biology and Evolution* **14**:902-913.
- Regier JC, Shultz JW, Zwick A, Hussey A, Ball B, Wetzler R, Martin JW, Cunningham CW (2010) Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences. *Nature* **463**:1079-1083.
- Reid CAM (1989) A new species of *Calomela* Hope (Coleoptera: Chrysomelidae) from New South Wales, with habitat and distribution notes on other species in the genus. *Australian Entomological Magazine* **16**:69-73.
- Reid CAM (1991) Immature stages of the genera *Johannica* Blackburn, *Lamprolina* Baly and *Chalcolampra* Blanchard (Coleoptera: Chrysomelidae: Chrysomelinae). *Journal of Natural History* **25**:341-357.
- Reid CAM (1992) *Calomela nigripennis* Lea, a valid species (Coleoptera: Chrysomelidae). *Australian Entomological Magazine* **19**:125-132.
- Reid CAM (1993) Description of the constricta species-group of the genus *Chalcolampra* Blanchard (Coleoptera: Chrysomelidae: Chrysomelinae). *Journal of the Australian Entomological Society* **32**:253-263.
- Reid CAM (1995) A cladistic analysis of subfamilial relationships in the Chrysomelidae sensu lato (Chrysomeloidea) Pakaluk J, Slipinski SA (eds.). pp 559-631 *En: Biology, phylogeny and classification of Coleoptera: papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN: Warszawa.
- Reid CAM (2000) Spilopyrinae Chapuis: a new subfamily in the Chrysomelidae and its systematic placement (Coleoptera). *Invertebrate Taxonomy* **14**:837-862.

- Reid CAM, Ślipiński SA (2001) *Peltoschema* Reitter a hitherto unrecognized chrysomeline: redescription and systematic placement (Coleoptera: Chrysomelidae). *The Coleopterists Bulletin* **55**:330-337.
- Reid CAM (2002) A new genus of Chrysomelinae from Australia (Coleoptera: Chrysomelidae). *The Coleopterists Bulletin* **56**:589-596.
- Reid CAM, Smith K, Beatson M (2004) Key to the Chrysomelinae of New South Wales. [http://keys.australianmuseum.net.au/chrysomelinae\\_intro.htm](http://keys.australianmuseum.net.au/chrysomelinae_intro.htm)
- Reid CAM, Smith KI (2004) A new genus and first record of Chrysomelinae from New Caledonia (Coleoptera: Chrysomelidae). *Memoirs of the Queensland Museum* **49**:705-711.
- Reid CAM (2006) A taxonomic revision of the Australian Chrysomelinae, with a key to the genera (Coleoptera: Chrysomelidae). *Zootaxa* **1292**:1-119.
- Reid CAM, Beatson M, Hasenpusch J (2009) The morphology and biology of *Pterodunga mirabile* Daccordi, an unusual subsocial Chrysomeline (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Natural History* **43**:373-398.
- Reid CAM, Jurado-Rivera JA, Beatson M (2009) A new genus of Chrysomelinae from Australia (Coleoptera: Chrysomelidae). *Zootaxa* **2207**:53-66.
- Revell LJ (2011) phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* **3**:217-223.
- Ribera I, Bilton DT, Vogler AP (2003) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of *Meladema* diving beetles on the Atlantic Islands and in the Mediterranean basin (Coleoptera, Dytiscidae). *Molecular Ecology* **12**:153-167.
- Ricklefs RE, Cox GW (1972) Taxon cycles in the West Indian avifauna. *American Naturalist* 195-219.
- Ridley M (2004) *Evolution*. 3rd edition. Blackwell Scientific Publishing, Malden, Massachusetts.
- Robinson DF, Foulds LR (1981) Comparison of phylogenetic trees. *Mathematical Biosciences* **53**:131-147.
- Robinson J, Harris SA (2000) A plastid DNA phylogeny of the genus *Acacia* Miller (Acaciaeae, Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **132**:195-222.
- Roe AD, Sperling FAH (2007) Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**:325-345.
- Rokas A, Nylander JAA, Ronquist F, Stone GN (2002) A Maximum-Likelihood Analysis of Eight Phylogenetic Markers in Gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae): Implications for Insect Phylogenetic Studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **22**:206-219.
- Rokas A, Krüger D, Carroll SB (2005) Animal evolution and the molecular signature of radiations compressed in time. *Science* **23**:1933-1938.
- Ronning SB, Rudi K, Berdal KG, Holst-Jensen A (2005) Differentiation of important and closely related cereal plant species (Poaceae) in food by hybridization to an oligonucleotide array. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **53**:8874-8880.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572-1574.
- Rønsted N, Chase MW, Albach DC, Bello MA (2002) Phylogenetic relationships within *Plantago* (Plantaginaceae): evidence from nuclear ribosomal ITS and plastid *trnL-F* sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society* **139**:323-338.
- Room PM (1990) Ecology of a simple plant-herbivore system: biological control of *Salvinia*. *Trends in Ecology and Evolution* **5**:74-79.
- Roskov Y, Abucay L, Orrell T, Nicolson D, Kunze T, Culham A, Bailly N, Kirk P, Bourgoin T, DeWalt RE, Decock W, De Wever A, eds. (2014). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 19th September 2014. Digital resource at [www.catalogueoflife.org/col](http://www.catalogueoflife.org/col). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands.

- Rova JHE, Delprete PG, Andersson L, Albert VA (2002) A *trnL-F* cpDNA sequence study of the Condamineeae-Rondeletieae-Spinaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. *American Journal of Botany* **89**:145-159.
- Rowell-Rahier M (1984) The food plant preferences of *Phratora vitellinae* (Coleoptera: Chrysomelidae). A. Field observations. *Oecologia* **3**:369-374.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *En: Krawetz S, Misener S (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. pp 365-386. Humana Press, Totowa, NJ.
- Ruhl MW, Wolf M, Jenkins TM (2010) Compensatory base changes illuminate morphologically difficult taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**:664-669.
- Ruiz C, Jordal B, Serrano J (2009) Molecular phylogeny of the tribe Sphodrini (Coleoptera: Carabidae) based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **50**:44-58.
- Sale MM, Potts BM, West AK, Reid JB (1993) Relationships within *Eucalyptus* using chloroplast DNA. *Australian Systematic Botany* **6**:127-138.
- Samways MJ (1993) Insects in biodiversity conservation: Some perspectives and directives. *Biodiversity and Conservation* **2**:258-282.
- Sánchez-González J (2003) *Schradera reticulata* (Rubiaceae), una Nueva Especie de Costa Rica y Panama. *Novon* **13**:477-479.
- Sanderson M, Shafer HB (2002) Troubleshooting molecular phylogenetic analyses. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**:49-72.
- Sanger F, Nicklen G, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **74**:5463-5467.
- Sanmartín I, Ronquist F (2004) Southern Hemisphere Biogeography Inferred by Event-Based Models: Plant versus Animal Patterns. *Systematic Biology* **53**:216-243.
- Sanmartín I, Wanntorp L, Winkworth RC (2007) West Wind Drift revisited: testing for directional dispersal in the Southern Hemisphere using event-based tree fitting. *Journal of Biogeography* **34**:398-416.
- Savolainen V, Chase MW, Hoot SB, Morton CM, Soltis DE, Bayer C, Fay MF, De Bruijn AY, Sullivan S, Qui Y-L (2000) Phylogenetics of Flowering Plants Based on Combined Analysis of Plastid *atpB* and *rbcl* Gene Sequences *Systematic Biology* **49**:306-362.
- Scharaschkin T, Doyle JA (2005) Phylogeny and historical biogeography of *Anaxagorea* (Annonaceae) using morphology and noncoding chloroplast sequence data. *Systematic Botany* **30**:712-735.
- Schauer JC (1841) Monographia Myrtacearum xerocarpicum. Sectio 1. Chamaelauciearum hucusque cognitarum genera et species illustrans.
- Schlein Y, Jacobson RL (1999) Sugar meals and longevity of the sandfly *Phlebotomus papatasi* in an arid focus of *Leishmania major* in the Jordan Valley. *Medical and Veterinary Entomology* **13**:65-71.
- Schluter D (2000) The Ecology of Adaptive Radiation. Oxford Series in Ecology and Evolution. Oxford University Press. Oxford.
- Schmidt HA, Strimmer K, Vingron M, von Haeseler A (2002) TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* **18**:502-504.
- Schnare MN, Damberger SH, Gray MW, Gutell RR (1996) Comprehensive comparison of structural characteristics in eukaryotic cytoplasmic large subunit (23S-like) ribosomal RNA. *Journal of Molecular Biology* **256**:701-719.
- Schneider D (1957) Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo-und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners. *Bombyx mori* L. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* **40**: 8-41.

- Schoeps K, Syrett P, Emberson RM (1996) Summer diapause in *Chrysolina hyperici* and *C. quadrigemina* (Coleoptera: Chrysomelidae) in relation to biological control of St. John's wort, *Hypericum perforatum* (Clusiaceae). *Bulletin of Entomological Research* **86**:591-597.
- Schoonhoven LM (1999) Insects and plants: two worlds come together. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **91**:1-6.
- Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M (2005) *Insect-Plant Biology*. Oxford University Press, New York.
- Schultz J, Wolf M (2009) ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: A how-to manual for molecular systematics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **52**:520-523.
- Schultz TR, Cocroft RB, Churchill GA (1996) The reconstruction of ancestral states. *Evolution* **50**:504-511.
- Schutze MK, Mather PB, Clarke AR (2006) Species status and population structure of the Australian *Eucalyptus* pest *Paropsis atomaria* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae). *Agricultural and Forest Entomology* **8**:323-332.
- Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* **6**:461-464.
- Seago AE, Brady P, Vigneron JP, Schultz TD (2009) Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural colour mechanisms in beetles (Coleoptera). *Journal of the Royal Society Interface* **6**:S165-S184.
- Sears BB (1980) Elimination of plastids during spermatogenesis and fertilization in the plant kingdom. *Plasmid* **4**:233-255.
- Seeno TN, Wilcox JA (1982) Leaf beetle genera (Coleoptera: Chrysomelidae). *Entomography* **1**:1-221.
- Seibel PN, Müller T, Dandekar T, Schultz J, Wolf M (2006) 4SALE - A tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. *BMC Bioinformatics* **7**:498.
- Seibel PN, Müller T, Dandekar T, Wolf M (2008) Synchronous visual analysis and editing of RNA sequence and secondary structure alignments using 4SALE. *BMC Research Notes* **1**:91.
- Seifert, KA (2009) Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* **9**:83-89.
- Selman BJ (1975) *Macelola*, a new genus of the subfamily Chrysomelinae (Coleoptera: Chrysomelidae) from Australia. *Journal of the Australian Entomological Society* **14**:65-70.
- Selman BJ (1976) *Lamecola* gen. n. (Coleoptera: Chrysomelidae) a genus new to Australia. *Journal of Natural History* **10**:681-684.
- Selman BJ (1977) A review of the genera *Carystea* Baly and *Paralepta* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae). *Australian Journal of Zoology* **25**:133-145.
- Selman BJ (1979) A Reappraisal of the Australian Species of the Genus *Calomela* Hope (Coleoptera: Chrysomelidae). *Australian Journal of Zoology* **27**:561-584.
- Selman BJ, Lowman MD (1983) The biology and herbivory rates of *Novacastria nothofagi* Selman (Coleoptera: Chrysomelidae), a new genus and species of *Nothofagus moorei* in Australian temperate rainforest. *Australian Journal of Zoology* **31**:179-191.
- Shaw AJ, Cox CJ, Goffinet B, Buck WR, Boles SB (2003) Phylogenetic evidence of a rapid radiation of pleurocarpous mosses (Bryophyta). *Evolution* **57**:2226-2241.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* **92**:142-166.
- Shimodaira H, Hasegawa M (1999) Multiple Comparisons of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference. *Molecular Biology and Evolution* **16**:1114-1116.



- Shimodaira H (2000) Another calculation of the p-value for the problem of regions using the scaled bootstrap resamplings. Technical report No. 2000-35. Department of Statistics, Stanford University.
- Shimodaira H, Hasegawa M (2001) CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* **17**:1246-1247.
- Silfverberg H (1994) Chrysomelidae in the Arctic. *En: Jolivet PH, Cox ML, Petitpierre E (eds.). Novel aspects of the biology of Chrysomelidae. Series Entomologica. 50:503-510. Dordrecht Kluwer Academic Publishers.*
- Simmons RB, Weller SJ (2001) Utility and Evolution of Cytochrome b in Insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20**:196-210.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighing, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**:651-701.
- Simon S, Schierwater B, Hadrys H (2010) On the value of Elongation factor-1 $\alpha$  for reconstructing pterygote insect phylogeny, *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**:651-656.
- Simpson GG (1961) *Principles of Animal Taxonomy*. Columbia University Press. New York.
- Sinou C, Forest F, Lewis GP, Bruneau A (2009) The genus *Bauhinia* s.l. (Leguminosae): a phylogeny based on the plastid *trn L-trn F* region. *Botany* **87**:947-960.
- Smith SA, Dunn CW (2008) Phyutility: a phyloinformatics tool for trees, alignments and molecular data. *Bioinformatics* **24**:715-716.
- Smith TF, Waterman MS (1981) "Identification of common molecular subsequences". *Journal of Molecular Biology* **147**: 195-197.
- Sneath HA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- Soetens P, Pasteels JM (1994) Synergistic effect of secondary compounds and nutrients in the host plant choice of a salicaceous-feeding leaf beetle: *Phratora vitellinae*. *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent* **59**:685-689.
- Soltis DE, Soltis PS, Nickrent DL, Johnson LA, Hahn WJ, Hoot SB (1997) Angiosperm phylogeny inferred from 18S ribosomal DNA sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **84**:1-49.
- Soltis DE, Soltis PS, Endress PK, Chase MW (2005) *Phylogeny and evolution of Angiosperms*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Soltis DE, Soltis PS, Zanis MJ (2002) Phylogeny of seed plants based on evidence from eight genes. *American Journal of Botany* **89**:1670-1681.
- Soltis PS, Soltis DE, Wolf PG, Nickrent DL, Chaw S-M, Chapman RL (1999) The Phylogeny of Land Plants Inferred from 18S rDNA Sequences: Pushing the Limits of rDNA Signal? *Molecular Biology and Evolution* **16**:1774-1784.
- Sonnenberg R, Nolte AW, Tautz D (2007) An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology* **4**:6.
- Sorenson MD, Franzosa EA (2007) TreeRot, version 3. Boston University, Boston, MA.
- Soria-Carrasco V, Valens-Vadell M, Peña A, Antón J, Amann R, Castresana J, Rosselló-Mora R (2007) Phylogenetic position of *Salinibacter ruber* based on concatenated protein alignments. *Systematic and Applied Microbiology* **30**:171-179.
- Sota T, Vogler AP (2003) Reconstructing species phylogeny of the carabid beetles *Ohomopterus* using multiple nuclear DNA sequences: heterogeneous information content and the performance of simultaneous analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**:139-154.
- Spangler RE, Olmstead RG (1999) Phylogenetic Analysis of Bignoniaceae Based on the cpDNA Gene Sequences *rbcl* and *ndhF*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **86**:33-46.

- Stam JM, Kroes A, Li Y, Gols R, van Loon JJ, Poelman EH, Dicke M (2014) Plant interactions with multiple insect herbivores: from community to genes. *Plant Biology* **65**:689-713.
- Stamatakis A (2014) RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics* doi:10.1093/bioinformatics/btu033
- Staudacher K, Wallinger C, Schallhart N, Traugott M (2011) Detecting ingested plant DNA in soil-living insect larvae. *Soil Biology and Biochemistry* **43**:346-350.
- Steane D, Nicolle D, McKinnon GE, Vaillancourt RE, Potts BM (2002) Higher-level relationships among the eucalypts are resolved by ITS-sequence data. *Australian Systematic Botany* **15**:49-62.
- Steane DA, De Kok RPJ, Olmstead RG (2004) Phylogenetic relationships between *Clerodendrum* (Lamiaceae) and other Ajugoid genera inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**:39-45.
- Stebbins GL (1974) *Flowering plants. Evolution above the species level*. Belknap Press, Cambridge, MA.
- Steconni M, Marchelli P, Puntieri J, Picca P, Gallo L (2004) Natural Hybridization between a deciduous (*Nothofagus antarctica*, Nothofagaceae) and an evergreen (*N. dombeyi*) forest tree species: evidence from morphological and isoenzymatic traits. *Annals of Botany* **94**:775-786.
- Steinhausen WR (1998) Comparative morphology of pupae of the leaf beetle subfamilies Chrysomelinae and Galerucinae. *En: Fourth International Symposium on the Chrysomelidae*, págs. 311-318. (Biondi M, Daccordi M, Furth DG (eds.). Museo Regionale di Scienze Naturali. Torino.
- Stephens JMC, Molan PC, Clarkson BD (2005) A review of *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae) in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* **43**:431-449.
- Stone C, Bacon PE (1994) Insect Herbivory in a River Red Gum (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) Forest in Southern New South Wales. *Australian Journal of Entomology* **33**:51-56.
- Strimmer K, Rambaut A (2002) Inferring confidence sets of possibly misspecified gene trees. *Proceedings of the Royal Society of London B* **269**:137-142.
- Sugiura N (1978) Further analysts of the data by Akaike' s information criterion and the finite corrections. *Communications in Statistics - Theory and Methods* **7**:1.
- Sukumaran J, Holder MT (2010) DendroPy: a Python library for phylogenetic computing. *Bioinformatics* **26**:1569-1571.
- Swain TD, Taylor DJ (2003) Structural rRNA characters support monophyly of raptorial limbs and paraphyly of limb specialization in water fleas. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **270**:887-896.
- Swofford DL (2002) *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*, Versión 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Symondson WOC (2002) Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology* **11**:627-641.
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C, Valentini A, Vermet T, Corthier G, Brochmann C, Willerslev E (2007) Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research* **35**:e14.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**:1105-1109.
- Takizawa H (1976) Larvae of the Genus *Gonioctena* CHEVROLAT (Coleoptera, Chrysomelidae): Descriptions of Japanese Species and the Implications of Larval Characters for the Phylogeny. *Japanese Journal of Entomology* **44**:444-468.
- Takizawa H (1989) Notes on larvae of the subfamily Chrysomelinae (Coleoptera, Chrysomelidae), part 1. *Kanagawa-Chûhô* **90**:243-256.

- Tambussi CP, Noriega JI, Gazdzicki A, Tatur A, Reguero A, Vizcaino SF (1994) Ratide bird from the Paleogene La Meseta Formation, Seymour Island, Antarctica. *Polish Polar Research* **15**:15-20.
- Tank DC, Beardsley PM, Kelchner SA, Olmstead RG (2006) Review of the systematics of Scrophulariaceae s.l. and their current disposition. *Australian Systematic Botany* **19**:289-307.
- Tarling DH (1980) *Continental drift and biological evolution*. Burlington (VT): Carolina Biology Readers.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* **18**:70-74.
- Tavaré S (1986) Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* **17**:57-86.
- Tempère G (1969) Un critère méconnu des systématiciens phanérogamistes, l'instinct des insectes phytophages. *Botaniste* **50**:473-482.
- Tessier N, Noel S, Lapointe FJ (2004) A new method to discriminate the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) from the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*) using species-specific primers in multiplex PCR. *Canadian Journal of Zoology* **82**:1832-1835.
- Thomas D, Seago A, Robacker D (2007) Reflections on golden scarabs. *American Entomologist* **53**:224.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**:4673-4680.
- Thompson JN (1988) Evolutionary ecology of the relationships between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **47**:3-14.
- Thompson RM, Townsend CR (1999) The effect of seasonal variation on the community structure and food-web attributes of two streams: implications for food-web science. *Oikos* **87**:75-88.
- Tilney-Bassett RAE (1978) The inheritance and genetic behaviour of platids. *En: The platids: their chemistry, structure, growth, and inheritance*. Kirk JTO, Tilney-Bassett RAE (eds.) págs. 405-425. Elsevier, Amsterdam.
- Tippery NP, Les DH (2008) Phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region in Menyanthaceae using predicted secondary structure. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**:526-537.
- Trewick SA, Paterson AM, Campbell HJ (2007) Hello New Zealand. *Journal of Biogeography* **34**:1-6.
- Tribe GD, Cillie JJ (1997) Biology of the Australian tortoise beetle, *Trachymela tincticollis* Blackburn (Chrysomelidae: Chrysomelinae: Paropsini) a defoliator of *Eucalyptus* in South Africa. *African Entomology* **5**:109-123.
- Tribe GD (2000) Ecology, distribution and natural enemies of the *Eucalyptus*-defoliating tortoise beetle *Trachymela tincticollis* (Blackburn) (Chrysomelidae: Chrysomelini: Paropsina) in southwestern Australia, with reference to its biological control in South Africa. *African Entomology* **8**:23-45.
- Tribe GD, Cillie JJ (2000) Biological control of the *Eucalyptus*-defoliating Australian tortoise beetle *Trachymela tincticollis* (Blackburn) (Chrysomelidae: Chrysomelini: Paropsina) in South Africa by the egg parasitoid *Enoggera reticulata* Naumann (Hymenoptera: Pteromalidae: Asaphinae). *African Entomology* **8**:15-22.
- Trizzino M, Audisio P, Antonini G, De Biase A, Mancini E (2009) Comparative analysis of sequences and secondary structures of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) in pollen beetles of the subfamily Meligethinae (Coleoptera, Nitidulidae): Potential use of slippage-derived sequences in molecular systematics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **51**:215-226.

- Udovicic F, Ladiges PY (2000) Informativeness of nuclear and chloroplast DNA regions and the phylogeny of the eucalypts and related genera (Myrtaceae). *Kew Bulletin* **55**:633-645.
- Ueno H, Fujiyama N, Irie K, Sato Y, Katakura H (1997) Genetic basis for established and novel host plant use in a herbivorous ladybird beetle, *Epilachna vigintioctomaculata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **91**:245-250.
- Ulloa M, Abdurakhmonov I, Perez-M. C, Percy R, Stewart J (2013) Genetic diversity and population structure of cotton (*Gossypium spp.*) of the New World assessed by SSR markers. *Botany* **91**:251-259.
- Valentini A, Miquel C, Nawaz MA, Bellemain EVA, Coissac E, Pompanon F, Gyelly L, Cruaud C, Nascetti G, Wincker P, Swenson JE, Taberlet P (2009) New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trnL* approach. *Molecular Ecology Resources* **9**:51-60.
- van Nues RW, Venema J, Rientjes JMJ, Dirks-Mulder A, Raué HA (1995) Processing of eukaryotic pre-rRNA: the role of the transcribed spacers. *Biochemistry and Cell Biology* **73**:789-801.
- Vassal J (1972) Apport des recherches ontogeniques et seminologiques a l'etude morphologique, taxonomique et phylogénique du genre *Acacia*. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse* **108**:105-247.
- Vassal J (1981) Acacieae. *En*: Polhill RM, Raven PH (eds.) *Advances in Legume Systematics*, part 1, págs. 169-171. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Veldman GM, Klootwijk J, van Heerikhuizen H, Planta RJ (1981) The nucleotide sequence of the intergenic region between the 5.8S and 26S rRNA genes of the yeast ribosomal RNA operon. Possible implications for the interaction between 5.8S and 26S rRNA and the processing of the primary transcript. *Nucleic Acids Research* **9**:4847-4862.
- Via S (1984) The quantitative genetics of polyphagy in an insect herbivore. II. Genetic correlations in larval performance within and among host plants. *Evolution* **38**:896-905.
- Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD (2001) Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *The EMBO Journal* **20**:2587-2595.
- Villesen P (2007) FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes* **7**:965-968. <<http://www.birc.au.dk/fabox>>.
- Vogler AP, DeSalle R (1993) Phylogeographic patterns in coastal North American tiger beetles, *Cicindela dorsalis*, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* **47**:1192-1202.
- Vogler AP, DeSalle R (1994) Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *Molecular Biology and Evolution* **11**:393-405.
- Vulinec K (1997) Iridescent dung beetles: a different angle. *Florida Entomologist* **80**:132-141.
- Wade MJ (1994) The biology of the imported willow leaf beetle, *Plagiodera versicolora* (Laicharting). *En*: Jolivet PH, Cox ML, Petitpierre E (eds.). *Novel aspects of the biology of Chrysomelidae*, págs. 541-547. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Wagstaff SJ, Olmstead RG (1997) Phylogeny of Labiatae and Verbenaceae inferred from *rbcl* sequences. *Systematic Botany* **22**:165-179.
- Wahlberg N (2001) The phylogenetics and biochemistry of host-plant specialization in Melitaeine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolution* **55**:522-537.
- Walker TD, Valentine JW (1984). Equilibrium models of evolutionary species diversity and the number of empty niches. *American Naturalist* (1984) 887-899.
- Wallander E, Albert VA (2000) Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* **87**:1827-1841.

- Wallinger C, Staudacher K, Schallhart N, Peter E, Dresch P, Juen A, Traugott M (2013) The effect of plant identity and the level of plant decay on molecular gut content analysis in a herbivorous soil insect. *Molecular ecology resources* **13**:75-83.
- Wallis GP, Trewick SA (2009) New Zealand phylogeography: evolution on a small continent. *Molecular Ecology* **18**:3548-3580.
- Walsh J B, Stephan W (2001) Multigene Families: Evolution. *En: Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Walton C, Butlin RK, Monk KA (1997) A phylogeny for grasshoppers of the genus *Chitaura* (Orthoptera: Acrididae) from Sulawesi, Indonesia, based on mitochondrial DNA sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society* **62**:365-382.
- Wang H, Moore MJ, Soltis PS, Bell CD, Brockington SF, Alexandre R, Davis CC, Latvis M, Manchester SR, Soltis DE (2009) Rosid radiation and the rapid rise of angiosperm-dominated forests. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **106**:3853-3858.
- Watrous LE, Wheeler QD (1981) The out-group comparison method of character analysis. *Systematic Zoology* **30**:1-11.
- Watson J (2006) *Molecular Biology of the Gene*. Ed. Medica Panamericana. 776 págs.
- Weise J (1901) Ein Beitrag zur Kenntniss von the genus *Paropsis* Oliv. *Archiv für Naturgeschichte* **67**:164-174.
- Weise J (1915) Übersicht der Chrysomelini. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* **1915**:434-436.
- Weise J (1923) Chrysomeliden und Coccinelliden aus Queensland. *Arkiv för Zoologi* **15**:1-150.
- White EM, Sims NM, Clarke AR (2008) Test of the enemy release hypothesis: the native magpie moth prefers a native fireweed (*Senecio pinnatifolius*) to its introduced congener (*S. madagascarensis*). *Austral Ecology* **33**:110-116.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *En: Innis N, Gelfand D, Sninsky J, White T (eds.) PCR protocols: a guide to methods and applications*, págs. 315-322. Academic Press. New York. USA.
- Whiting MF, Carpenter JC, Wheeler QD, Wheeler WC (1997) The Strepsiptera problem: Phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Systematic Biology* **46**:1-68.
- Wiegmann BM, Mitter C, Regier JC, Friedlander TP, Wagner DM, Nielsen ES (2000) Nuclear Genes Resolve Mesozoic-Aged Divergences in the Insect Order Lepidoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **15**:242-259.
- Wiemers M, Keller A, Wolf M (2009) ITS2 secondary structure improves phylogeny estimation in a radiation of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: *Polyommatus*). *BMC Evolutionary Biology* **9**:300.
- Wikars LO (1997) Effects of forest fire and the ecology of fire-adapted insects (Doctoral dissertation, Uppsala University).
- Wikström N, Savolainen S, Chase MW (2003) Angiosperm divergence times: congruence and incongruence between fossils and sequence divergence estimates. *En: Donoghue PCJ and Smith MP (eds.), Telling the evolutionary time: molecular clocks and the fossil record*, págs. 142-165. Taylor & Francis, London, UK.
- Wild AL, Maddison DR (2008) Evaluating nuclear protein-coding genes for phylogenetic utility in the Coleoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **48**:877-891.
- Wilgenbusch JC, Warren DL, Swofford DL (2004) AWTY: A system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetic inference. <http://ceb.csit.fsu.edu/awty>

- Williams G (2002) *A taxonomic and biogeographic review of the invertebrates of the central eastern rainforest reserves of Australia (CERRA) world heritage area and adjacent regions*. Technical Reports of the Australian Museum **16**.
- Williams JE, Woinarski JCZ (1997) *Eucalypt ecology: individuals to ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wilson EO (1992) *The diversity of Life*. Harvard University Press. Cambridge, MA.
- Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn C J (2001) Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. *American Journal of Botany* **88**:2013-2025.
- Wilson PG, O'Brien MM, Heslewood MM, Quinn C.J (2005) Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a *matK* phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* **251**:3-19.
- Wilson PG, O'Brien MM, Quinn CJ (2000) *Anetholea* (Myrtaceae), a new genus for *Backhousia anisata*: a cryptic member of the *Acmena* alliance. *Australian Systematic Botany* **13**:429-435.
- Winemiller KO (1990) Spatial and temporal variation in tropical fish trophic networks. *Ecological Monographs* **60**:331-367.
- Winemiller KO, Layman CA (2005) Food Web Science: Moving on the Path from Abstraction to Prediction. *En: Dynamic Food Webs: Multispecies Assemblages, Ecosystem Development and Environmental Change*. De Ruiter PC, Wolters V & Moore JC (eds.) Academic Press, San Diego.
- Winkler IS, Mitter CM (2008) The phylogenetic dimension of insect/plant assemblages: a review of recent evidence. *En: KJ Tilmon (ed.) Specialization, speciation, and radiation: the evolutionary biology of herbivorous insects*. University of California Press, Berkeley. 2008, pp:240–63.
- Withers, TM (2001) Colonization of eucalypts in New Zealand by Australian insects. *Austral Ecology* **26**:467-476.
- Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **74**:5088-5090.
- Wolf M, Friedrich J, Dandekar T, Müller T (2005) CBCAnalyze: inferring phylogenies based on compensatory base changes in RNA secondary structures. *In Silico Biology* **5**:0027.
- Wolfe KH, Li W-H, Sharp PM (1987) Rates of Nucleotide Substitution Vary Greatly among Plant Mitochondrial, Chloroplast, and Nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **84**:9054-9058.
- Woodburne MO, Case JA (1996) Dispersal, vicariance, and the late Cretaceous to early Tertiary land mammal biogeography from South America to Australia. *Journal of Mammalian Evolution* **3**:121-161.
- Wuyts J, Perrière G, Van de Peer Y (2004) The European ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Research* **32**:D101-D103.
- Xia X, Lemey P (2009) Assessing substitution saturation with DAMBE. *En: Lemey P (ed.) The Phylogenetic Handbook*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, págs. 611-626.
- Xia X, Xie Z (2001) DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Journal of Heredity* **92**:371-373.
- Xia X, Xie Z, Salemi M, Chen L, Wang Y (2003) An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**:1-7.
- Xu Y, Ma RC, Xie H, Liu JT, Cao MQ (2004) Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. *Genome* **47**:1091-104.
- Yang L, Wiegmann BM, Yeates DK, Irwin ME (2000) Higher-Level Phylogeny of the Therevidae (Diptera: Insecta) Based on 28S Ribosomal and Elongation Factor-1 $\alpha$  Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **15**:440-451.

- Yeates DK, Harvey MS, Austin AD (2003) New estimates for terrestrial arthropod species richness in Australia. *Records of the South Australian Museum, Monograph Series* **7**:231-41.
- Yu Y, Harris AJ, He XJ (2011) RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies) 2.0 beta. <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP>
- Zaidi RH, Jaal Z, Hawkes NJ, Hemingway J, Symondson WOC (1999) Can the detection of prey DNA amongst the gut contents of invertebrate predators provide a new technique for quantifying predation in the field? *Molecular Ecology* **8**:2081-2088.
- Zhang D-X, Hewitt GM (1997) Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology* **6**:143-150.
- Zhang Q, Liu Y, Sodmergen (2003) Examination of the cytoplasmic DNA in male reproductive cells to determine the potential for cytoplasmic inheritance in 295 angiosperm species. *Plant Cell Physiology* **44**:941-951.
- Zwickl D (2006) *Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion*. PhD thesis. University of Texas, Austin.