

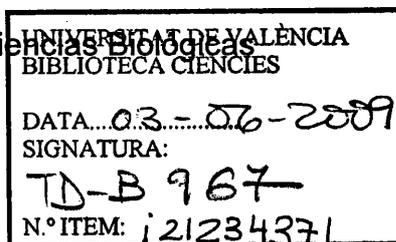


Estudios filogenéticos moleculares de la familia Aphididae y los Fordini ibéricos

Memoria de tesis doctoral presentada por:

Benjamín Ortiz Rivas

para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas



Director:

Dr. David Martínez Torres

DMT

UMI Number: U607712

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607712

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

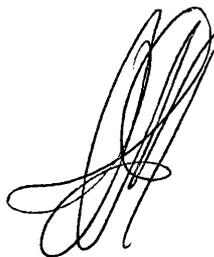
VNIVERSITAT
VALENCIA (Q ≈) **Facultat de Ciències Biològiques**
Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva

D. David Martínez Torres, Profesor Titular del Departament de Genètica y miembro del Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva de la Universitat de València

certifica que:

D. Benjamín Ortiz Rivas, Licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado "Estudios filogenéticos moleculares de la familia Aphididae y los Fordini ibéricos", el cual presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado a fecha de 25 de Marzo de 2009



Dr. David Martínez Torres

**A mis padres y mi hermano
A Loreto y Jorge**

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han acompañado, dentro y fuera del laboratorio, durante el periodo que ha durado la elaboración de mi tesis doctoral.

En primer lugar gracias a David por aceptar dirigir esta tesis y por enseñarme casi todo lo que sé sobre pulgones y sobre el trabajo en el laboratorio. Gracias especialmente por conseguir llevar adelante una relación director-doctorando de manera tan distendida y cordial. Quiero extender este agradecimiento a todos los profesores e investigadores que forman el grupo de Genética Evolutiva, en especial por confiar en mí y concederme la beca que me permitió comenzar este trabajo. Manoli, Beatriz, Marisa, Silvia y Alma me prestaron también una ayuda incalculable para aprender todo lo necesario sobre el trabajo en el laboratorio.

Esta tesis no habría sido posible sin la inestimable colaboración de los Drs. José Manuel Michelena y Pilar González, quienes han identificado prácticamente todas las especies de pulgones que he usado en el primer capítulo. Muchas gracias por vuestra desinteresada ayuda y por recibirme siempre con tanta amabilidad. Asimismo, quiero dar las gracias a Nicolás Pérez, de la Universidad de León, por la colaboración que hemos mantenido y que ha dado lugar al segundo capítulo, así como por varias de las fotografías de agallas que aparecen en el mismo. Mi agradecimiento también al Dr. Joaquín Baixeras por realizar algunas excelentes fotografías que nos han permitido ver un poco más de cerca a los pulgones de la tribu Fordini, y en especial por la fotografía que aparece en la portada. Este estudio ha sido posible igualmente gracias al Servei de Seqüenciació de la Universitat de València, donde se llevó a cabo la lectura de las secuencias utilizadas.

Una de las mayores ventajas de realizar una tesis es, sin duda, la posibilidad de viajar a otros lugares con la excusa de asistir a congresos. Muchas gracias a Manoli, José, Salva e Inma por el inolvidable viaje por Europa, y a Beatriz, Teresa, Nelo, Alfonso y Vicente P. por el no menos inolvidable viaje por Australia.

También quiero extender mi agradecimiento a todos mis compañeros de laboratorio por los buenos momentos compartidos. Gracias a Teresa (las fotos de *A. pisum* son suyas), a Marisa y Gabi, a Laura, a Vicente S., Mireia, Iñaki,

Álex, Sergi, Edu, Nuria, Pepa, Carol, Paco C., Olga, Paula, Alicia, María José, Vicky, Rafa P., Ana D., Peris, Eugeni y Araceli.

No puedo olvidarme aquí de todos mis amigos, que estáis siempre en mi memoria aunque no nos podamos ver a menudo. Gracias especialmente a Gabriel y Sonia por haber estado con nosotros durante los últimos años.

La persona a quién más debo de este periodo es a Loreto, que ha puesto tanto esfuerzo en esta tesis como yo. Gracias por quererme, gracias por estar siempre a mi lado y gracias por soportarme. Y sobre todo gracias por esa pequeña joya que has traído al mundo. También gracias por todo a Loreto Llopis, por acogerme casi como a un hijo.

Por último, esta tesis está dedicada a mis padres, una pequeña recompensa a todo el esfuerzo que habéis hecho siempre por mi educación y por mi felicidad.

ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Los pulgones	3
1.1. La complejidad y la variabilidad de los ciclos biológicos de los pulgones	9
1.2. Asociaciones endosimbióticas	15
2. Taxonomía y filogenia de pulgones	19
2.1. Posición sistemática y caracteres distintivos	19
2.2. Revisión de las clasificaciones e hipótesis filogenéticas morfológicas previas	21
2.3. Paleontología e historia evolutiva	28
CAPÍTULO 1: FILOGENIA MOLECULAR DE LA FAMILIA APHIDIDAE	35
1. Introducción	37
2. Objetivos	45
3. Material y métodos	46
3.1. Especies analizadas	46
3.2. Secuencias utilizadas	46
a) Genes nucleares	46
b) Genes mitocondriales	51
3.3. Obtención de las secuencias	52
a) Extracción de DNA y RNA	52
b) Amplificación de los fragmentos génicos	53
c) Clonación	59
d) Secuenciación y análisis de cromatogramas	60
e) Obtención de secuencias a partir de bases de datos	61
3.4. Alineamiento de las secuencias	62
3.5. Caracterización de las secuencias	62
a) Composición nucleotídica y homogeneidad de las secuencias	62
b) Análisis de saturación de posiciones nucleotídicas	63
3.6. Test de tasas relativas	63
3.7. Reconstrucción filogenética molecular	64
a) Análisis independientes	64

b) Análisis combinado	66
3.8. Comparación de hipótesis filogenéticas alternativas	70
4. Resultados	72
4.1. Caracterización de las secuencias	72
a) Comprobación de la ortología de las secuencias del gen de la opsin sensible a longitud de onda larga	72
b) Caracterización de la variabilidad genética, composición nucleotídica y homogeneidad de las secuencias	74
c) Análisis de saturación de posiciones nucleotídicas	79
4.2. Test de tasas relativas	83
4.3. Reconstrucción filogenética molecular	88
a) Análisis independientes	88
b) Análisis combinado	115
4.4. Comparación de hipótesis filogenéticas alternativas	133
4.5. Propuesta filogenética	136
5. Discusión	138
5.1. Relaciones filogenéticas en la familia Aphididae	138
a) Relaciones filogenéticas en los niveles taxonómicos de tribu y subfamilia	140
b) Relaciones filogenéticas profundas en la familia Aphididae	146
c) Apoyo morfológico a la existencia de los tres grandes linajes	153
5.2. Implicaciones en el conocimiento sobre el origen y la evolución de los ciclos biológicos de los pulgones	156
5.3. Implicaciones en el conocimiento sobre la coevolución entre los pulgones y su endosimbionte primario <i>Buchnera</i>	165
CAPÍTULO 2: FILOGENIA MOLECULAR Y TAXONOMÍA DE LAS ESPECIES IBÉRICAS DE PULGONES DE LA TRIBU FORDINI	171
1. Introducción	173
2. Objetivos	185
3. Material y métodos	186
3.1. Muestras y especies analizadas	186
3.2. Secuencias utilizadas	187
3.3. Obtención de las secuencias	191
a) Extracción de DNA	191

b) Amplificación de los fragmentos génicos	191
c) Clonación, secuenciación y análisis de cromatogramas	193
3.4. Alineamiento de las secuencias	193
3.5. Caracterización de las secuencias	194
3.6. Test de tasas relativas	195
3.7. Reconstrucción filogenética molecular	195
a) Filogenia molecular de las especies ibéricas de la tribu Fordini	195
b) Filogenia molecular y taxonomía de las especies ibéricas de los géneros <i>Forda</i> y <i>Paracletus</i>	196
4. Resultados	197
4.1. Caracterización de las secuencias	197
4.2. Test de tasas relativas	201
4.3. Reconstrucción filogenética molecular	202
a) Filogenia molecular de las especies ibéricas de la tribu Fordini	202
b) Filogenia molecular y taxonomía de las especies ibéricas de los géneros <i>Forda</i> y <i>Paracletus</i>	205
4.4. Estimaciones de divergencias genéticas intra e interespecíficas	212
5. Discusión	214
5.1. Filogenia molecular de las especies ibéricas de la tribu Fordini	214
5.2. Filogenia molecular y taxonomía de las especies ibéricas de los géneros <i>Forda</i> y <i>Paracletus</i>	219
DISCUSIÓN GENERAL	229
CONCLUSIONES	241
BIBLIOGRAFÍA	247
ANEXOS (CD adjunto)	261

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Los pulgones

Los pulgones son un grupo de insectos hemimetábolos que se alimentan del floema de las plantas, con más de 4400 especies descritas que se distribuyen fundamentalmente en las regiones templadas del planeta (Blackman y Eastop, 1994; Nieto Nafria y Mier Durante, 1998). Muchas especies de este grupo constituyen importantes plagas de cultivos agrícolas, hecho que ha fomentado en gran parte su estudio. No obstante, los pulgones presentan una serie de características biológicas de gran interés para el estudio científico básico. Una de ellas es la elevada complejidad de sus ciclos biológicos, caracterizados por la partenogénesis cíclica, en los que existe una alternancia entre una fase de reproducción sexual y una fase de reproducción partenogenética (Dixon, 1985; Moran, 1992). Otra característica de especial relevancia es la elevada variabilidad fenotípica existente entre las distintas formas de sus ciclos, lo que convierte a estos insectos en excelentes organismos modelo para el estudio de los polifenismos (Kawada, 1987). Más recientemente, las diversas simbiosis entre pulgones y bacterias, particularmente la simbiosis obligada que mantienen con la endobacteria *Buchnera*, han sido objeto de un intenso estudio (Shigenobu *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2002; Latorre *et al.*, 2005; Moran *et al.*, 2005a). En los últimos años, se ha fomentado además la obtención de recursos genómicos para la investigación sobre este tipo de insectos, culminando en la reciente secuenciación del genoma del pulgón *Acyrtosiphon pisum* (figura I.1).

Los pulgones o áfidos se encuentran clasificados dentro del orden Hemiptera, orden de insectos que se caracterizan por su aparato bucal picador-chupador que les permite alimentarse de la savia de las plantas (Remaudière y



Figura I.1. Hembras partenogenéticas de dos cepas de distinto color de la especie *Acyrtosiphon pisum*, junto a sus respectivas ninfas.

Remaudière, 1997; Nieto Nafría y Mier Durante, 1998). El estatus taxonómico y la clasificación de los pulgones han sido muy controvertidos desde el inicio de su estudio. Actualmente parece existir un cierto consenso entre los especialistas en taxonomía de este grupo para enmarcarlos dentro de la superfamilia Aphidoidea. Esta superfamilia tiene probablemente su origen en el periodo Triásico (Heie, 2004), y se compone en la actualidad de dos linajes, uno formado por las familias Phylloxeridae y Adelgidae y otro por la familia Aphididae (Remaudière y Remaudière, 1997; Nieto Nafría y Mier Durante, 1998; Blackman y Eastop, 2006). El término pulgón parece sufrir de cierta ambigüedad tanto en castellano como en su traducción inglesa ("aphid"), ya que puede ser utilizado para referirse al conjunto de la superfamilia Aphidoidea o sólo a la familia Aphididae. Esta ambigüedad se refleja por ejemplo en el hecho de que en ocasiones se utiliza el término inglés "true aphids" (pulgones verdaderos) para hacer referencia a las especies de la familia Aphididae. La separación entre ambos linajes, sin embargo, parece evidente, ya que ha permanecido de manera estable en las clasificaciones del grupo a lo largo de la historia. Una de las diferencias fundamentales entre ambos linajes es que las hembras partenogénicas de las especies de la familia Aphididae son siempre vivíparas, mientras que las de las familias Adelgidae y Phylloxeridae son ovíparas. A lo largo de esta tesis se utilizarán los términos pulgón y áfido en referencia a las especies de insectos pertenecientes a la familia Aphididae.

Como insectos hemimetábolos, los pulgones no presentan metamorfosis completa, sino que su desarrollo se compone de varios estadios ninfales previos al imago, generalmente 4. Su cuerpo es normalmente globoso u ovoidal, en ocasiones alargado o aplanado, de tamaño que varía generalmente entre 1'5 y 3 mm (ver figura 1.2). Los individuos adultos pueden ser alados o ápteros, en función de la fase del ciclo que representen o de algunos estímulos externos como la sobrepoblación o la mala calidad de la planta hospedadora. Los pulgones ofrecen un aspecto blando por su baja esclerotización, particularmente la del abdomen, aunque los individuos alados tienen la cabeza y el tórax fuertemente esclerotizados. Su coloración es muy variable, desde blanco hasta negro pasando por diferentes tonos de amarillos, cremas, verdes y pardos. Los pulgones presentan siempre ojos compuestos, los cuales están

reducidos en algunas formas de algunas especies al triomatidio, un grupo de tres omatidios situados en una protuberancia posterior ventral del ojo. En los individuos alados, además, pueden observarse los tres ocelos característicos de insectos. Las antenas están formadas por una porción proximal, denominada base, y otra distal, denominada flagelo. La base está compuesta

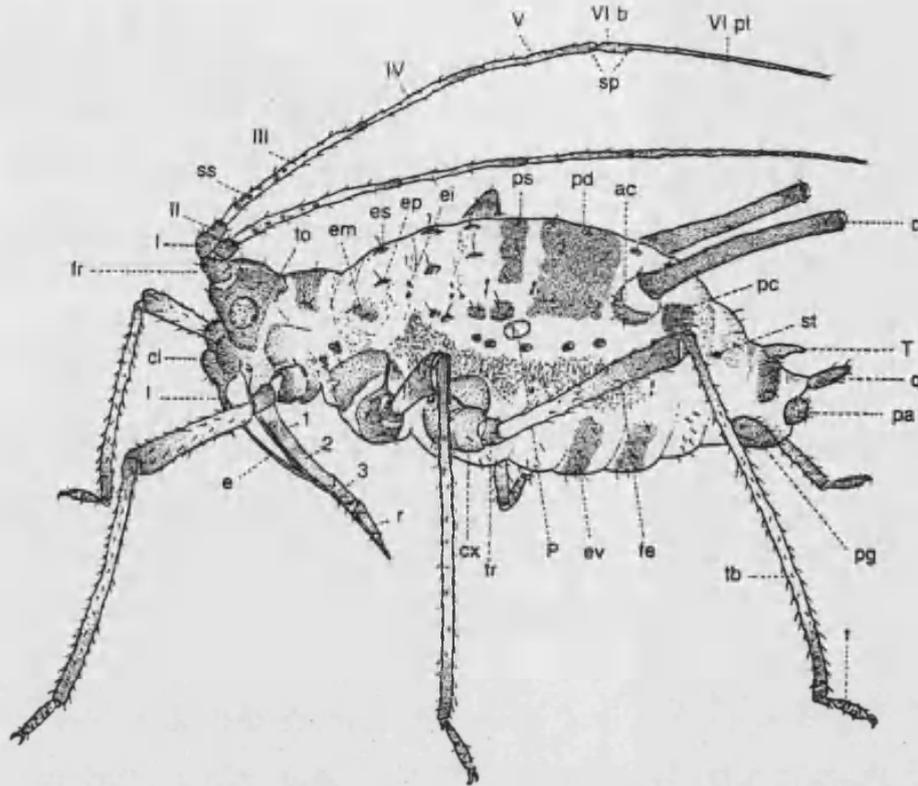


Figura 1.2. Esquema de la morfología externa de un pulgón áptero. **Cabeza:** fr, frente; cl, clipeo; l, labro; e, estiletes; to, triomatidio; 1, 2, 3, r, artejos del rostro; I, II, III, IV, V, VI, artejos de la antena; b, pt, base y filamento terminal del último segmento antenal, respectivamente; sp, ss, sensorios primarios y secundarios, respectivamente. **Tórax:** es, ep, em, ei, escleritos espinales, pleurales, marginales e intersegmentarios, respectivamente; artejos de las patas: cx, coxa; tr, trocánter; fe, fémur; tb, tibia; t, tarso. **Abdomen:** ps, ac, pc, ev, escleritos espinopleural, precornicular, postcornicular y ventral, respectivamente; pd, placa distal; P, papila; T, tubérculo; st, estigmas; c, cornículos; pg, placa genital; pa, placa anal; q, cola. Dibujo original: Enrique Ortega Lorenzo (Vol. 11 Serie Fauna Ibérica, MNCN, CSIC; Nieto-Nafria *et al.*, 1998).

por dos artejos o antenómeros, y el número total varía entre tres y seis. El último artejo antenal muestra una morfología característica, dividida en base y filamento terminal, que sirve de carácter diagnóstico para el reconocimiento de las especies de insectos pertenecientes a este grupo. El abdomen de los pulgones es generalmente la sección corporal más grande. En su parte posterior dorsal se encuentran los cornículos, órganos que producen una

Introducción general

secreción fluida rica en ceras y que contiene células hemolinfáticas y feromonas de alarma (Blackman, 1987; Miyazaki, 1987; Kawada, 1987; Nieto Nafría y Mier Durante, 1998; Castresana, 1998).

Una de las características por la cual los pulgones han sido más estudiados es la capacidad de algunas especies de producir daños sobre los cultivos agrícolas. Estos daños se derivan, en parte, de su alimentación a partir del floema que succionan de las plantas. La capacidad de reproducirse partenogenéticamente y su corto tiempo de generación confieren a los pulgones una elevada tasa intrínseca de crecimiento (Hales *et al.*, 1997). Ésta, además, se ve potenciada por el solapamiento de generaciones que ocurre en la fase partenogenética (Dixon, 1998). En esta fase, una hembra de pulgón porta en su abdomen los embriones en desarrollo de sus hijas y, a la vez, dentro de éstas, los embriones en desarrollo de sus nietas. Estas características permiten a las poblaciones de pulgones crecer rápidamente, pudiendo producir grandes daños cuando se alimentan de plantas cultivadas. Sin embargo, raramente los pulgones se alimentan de una planta hasta el extremo de producir daños irreparables en ella o matarla. Los mayores daños sobre los cultivos se deben a la inoculación por parte de los pulgones de virus vegetales, que pueden producir graves enfermedades sobre las plantas infectadas. Por ejemplo, la enfermedad viral que produce mayores daños económicos sobre los cítricos en el mundo es producida por el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), un closterovirus transmitido por el pulgón *Aphis gossypii* (Sentandreu *et al.*, 2006). Existe una tercera vía de producción de daños sobre las plantas hospedadoras relacionada con los áfidos. La melaza, una secreción azucarada producida por los pulgones, se deposita en ocasiones en grandes cantidades sobre los vegetales y es posteriormente usada por hongos como fuente de alimento. El crecimiento de estos hongos puede también causar daños importantes sobre las plantas.

El modo de alimentación de los pulgones tiene una influencia determinante en la mayor parte de sus características biológicas. El floema de las plantas es para los insectos una fuente de nutrientes con una composición desequilibrada de aminoácidos, baja en lípidos y vitaminas y demasiado rica en azúcares (Bracho *et al.*, 1995). El exceso de azúcares en la dieta de los áfidos es

eliminado por el ano, gracias a la actuación de la cámara filtrante de la que está provisto su aparato digestivo. La secreción azucarada se denomina melaza, y se produce en cantidad variable. Algunos pulgones son grandes productores de esta sustancia, como *Pterochloroides persicae* o las especies del género *Eulachnus*, y sus hospedadores aparecen en determinadas épocas del año repletos de esta sustancia viscosa (Nieto Nafría y Mier Durante, 1998). Lejos de echarse a perder, este dulce manjar de la naturaleza es aprovechado por varios organismos como fuente de alimento. Hongos, avispa, moscas y abejas pueden alimentarse de ella (Nieto Nafría y Mier Durante, 1998). También los humanos sacamos provecho de esta sustancia de forma menos directa. En algunos lugares de Europa, como la Selva Negra de Alemania, se obtiene miel a partir de abejas que usan la melaza como fuente de azúcares (Normark, 2000). Pero posiblemente el uso más destacado de esta sustancia es el que relaciona a los pulgones con las hormigas. Muchas especies de áfidos han establecido una relación simbiótica mutualista con hormigas denominada mirmecofilia. Varias especies de estos himenópteros son capaces de utilizar la melaza como fuente de alimento, tomándola directamente del ano del pulgón. Éstos, a su vez, obtienen también beneficios de esta relación en términos de protección frente a depredadores o parásitos (Nieto Nafría y Mier Durante, 1998). La mirmecofilia puede ser un suceso casual, en cuyo caso se denomina facultativa, o presentarse siempre en una determinada especie de áfido, en cuyo caso se denomina obligada. La "cría" de pulgones para la obtención de melaza por parte de las hormigas fue utilizada por Darwin como ejemplo de instinto en *El origen de las especies* (Darwin, 1859). Son muchas las especies de pulgones mirmecófilas, y generalmente no existe una elevada especificidad por una determinada especie de hormiga (Shudd, 1987).



Figura I.3. Agallas de *Baizongia pistaciae* sobre *Pistacia terebinthus*.

Algunas especies de pulgones inducen en sus plantas hospedadoras la formación de agallas (figura I.3). La

morfología de éstas depende principalmente de la acción de los áfidos, hasta el punto de que son consideradas una prolongación de su fenotipo (Stern, 1995). Sus características son normalmente tan específicas que la agalla suele usarse como carácter diagnóstico para la identificación de una especie de pulgón, aunque en algunos casos especies próximas pueden producir agallas indistinguibles (Pérez Hidalgo *et al.*, 2007). Existen alrededor de 700 tipos de agallas de pulgones, las cuales suelen formarse en la parte aérea de la planta. En las agallas, los pulgones se hallan en un microclima favorable, protegidos de la acción de algunos elementos como la lluvia o el viento. Algunos autores, no obstante, han concluido que su supuesta función protectora es secundaria, porque no reduce el parasitismo ni la depredación. Las agallas actúan, además, como sumideros de los nutrientes de la planta para la alimentación de los áfidos que viven en su interior (Forrest, 1987).

El 97% de las especies de plantas vasculares pueden servir de alimento a alguna especie de áfido. Sobre ellas, muchas especies se encuentran formando grupos denominados colonias (figura 1.4). Generalmente se alimentan de las partes verdes, pero prácticamente cualquier parte de la anatomía de las plantas puede servir de lugar de alimentación de alguna especie de pulgón (Nieto Nafria y Mier Durante, 1998). Existe un fuerte componente taxonómico en la especificidad de hospedador; muchas tribus o subfamilias de pulgones se alimentan de una única familia de plantas, a menudo de 1 o 2 géneros (von Dohlen, 2004). La mayoría de pulgones muestra un elevado grado de especificidad por su hospedador, aunque existen algunas especies polífagas u oligófagas. Las características de los pulgones han evolucionado hacia la adaptación a la vida sobre las plantas, tanto en su morfología como en su fisiología y sus ciclos biológicos (Dixon, 1987c). Según



Figura 1.4. Colonia de *Hyalopterus pruni* sobre el envés de una hoja de almendro (*Prunus dulcis*)

Dixon, la alimentación a partir del floema condujo a la evolución paralela entre pulgones y plantas, pero con una frecuente adquisición de nuevos hospedadores (Dixon, 1987c). Existen, no obstante, pocos estudios sobre este aspecto (Hales *et al.*, 1997). Por ejemplo, un estudio filogenético molecular realizado sobre un gran número de especies del género *Cinara* (subfamilia Lachninae), asociadas a diferentes especies de pinos, no reveló una clara evolución paralela entre ambos taxones, sino la existencia de un elevado número de cambios de especie de pino hospedadora. Sin embargo, las especies de pulgones analizadas en este estudio mostraron una restricción mucho mayor a la parte específica de la planta sobre la cual se alimentan (Favret y Voegtlin, 2004). Se asume que la dirección general de los cambios de hospedador durante la evolución de los pulgones ha sido desde gimnospermas a angiospermas, primero árboles dicotiledóneos y después arbustos. Posteriormente, desde arbustos a monocotiledóneas herbáceas y leñosas y dicotiledóneas herbáceas, y secundariamente a monocotiledóneas herbáceas, musgos, equisetos y helechos (Shaposhnikov, 1987a; Hales *et al.*, 1997). El rango máximo de distribución de una especie de pulgón viene determinado, obviamente, por el correspondiente a la especie o especies vegetales que usa como hospedador. La distribución conjunta de la familia Aphididae es cosmopolita, faltando únicamente en las regiones de la Antártida y el Ártico. Su máxima diversidad se halla en las regiones templadas del planeta, y principalmente en el hemisferio norte (Heie, 1994; Blackman y Eastop, 1994; Nieto Nafria y Mier Durante, 1998).

1.1. La complejidad y la variabilidad de los ciclos biológicos de los pulgones

Uno de los aspectos más destacados y estudiados de la biología de los áfidos es la complejidad de sus ciclos biológicos, caracterizados por la partenogénesis cíclica. Este término hace referencia a la alternancia que ocurre, en el ciclo típico de los pulgones, entre una única generación de reproducción sexual y un número variable de generaciones de reproducción partenogenética. El ciclo completo, en el que se dan ambas fases, es

denominado holocíclico. Además, éste se complica en algunas especies con la aparición de una alternancia obligada entre dos hospedadores vegetales filogenéticamente alejados. Los ciclos en los que ocurre esta alternancia son denominados dioicos, en contraposición a los ciclos monoicos, los cuales se desarrollan sobre una única especie vegetal o unas pocas especies relacionadas, pero sin que exista una obligación en la alternancia entre ellas. El ciclo holocíclico dioico (figura 1.5), se presenta por ejemplo en las especies *Aphis fabae* (subfamilia Aphidinae) o *Thecabius affinis* (subfamilia

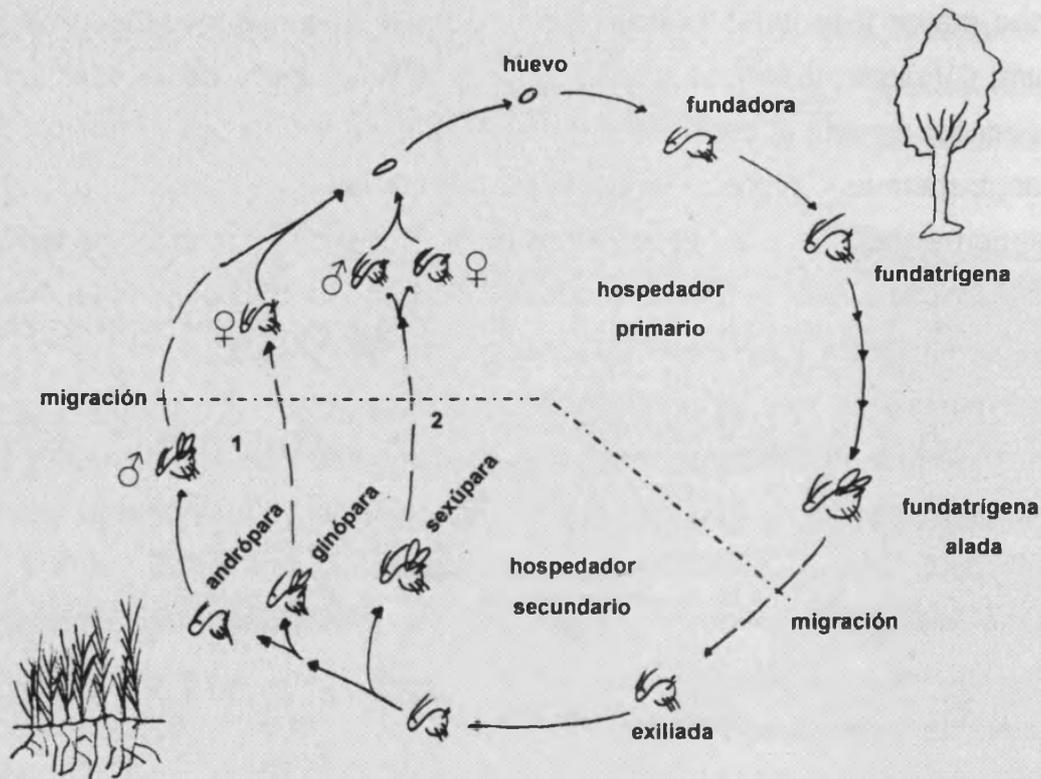


Figura 1.5. Esquema de un ciclo holocíclico dioico, mostrando los dos tipos generales de retorno al hospedador primario (ver texto). 1: retorno tipo afidino. 2: retorno tipo eriosomatino

Eriosomatinae) (Blackman y Eastop, 1994). En éste, el huevo de resistencia al invierno eclosiona al comienzo de la primavera en el hospedador denominado primario, típicamente una planta leñosa. De este huevo nace una hembra áptera, llamada fundadora, que da lugar a varias generaciones de hembras partenogénicas vivíparas, denominadas fundatrigenas. La última de estas generaciones es alada y tiene por función emigrar al hospedador secundario, el cual es generalmente herbáceo. Sobre este hospedador se sucede un número variable de generaciones partenogénicas, denominadas virginógenas,

exiliadas o éxules, hasta finales del verano o principios del otoño, momento en el que se produce la aparición de la fase sexual y el retorno al hospedador primario. Esta fase consta de una única generación de machos y hembras sexuales, las cuales son además las únicas hembras ovíparas del ciclo. La inducción de la fase sexual se produce fundamentalmente por el acortamiento del fotoperiodo que ocurre en esta época del año, influyendo también la disminución de la temperatura. El retorno al hospedador primario puede ser llevado a cabo de dos maneras diferentes. En el tipo eriosomatino unas hembras partenogenéticas denominadas sexúparas realizan el vuelo de migración al hospedador primario, en el que dan lugar a los machos y las hembras sexuadas. Este tipo ocurre en las especies holocíclicas o alternantes de las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae y Hormaphidinae. En las especies dioicas de la subfamilia Aphidinae, sin embargo, el retorno (tipo afidino) se lleva a cabo de forma independiente por los machos y unas hembras partenogenéticas denominadas ginóparas, las cuales paren en el hospedador primario a las hembras sexuadas. En cualquiera de los dos casos, los machos y las hembras sexuadas se reproducen en el hospedador primario y dan lugar a los huevos, que se mantienen en diapausa hasta la eclosión en la siguiente primavera (Moran, 1992; Blackman y Eastop, 1994; Hales *et al.*, 1997; Nieto Nafría y Mier Durante, 1998).

Existe una gran variabilidad asociada a los ciclos biológicos en estos insectos. Aunque el ciclo ancestral de varias subfamilias de pulgones es dioico, en la actualidad el 90% de las especies desarrollan un ciclo monoico (Dixon, 1987a; Dixon, 1987c; Hales *et al.*, 1997). No obstante, la variación más destacable es probablemente el ciclo denominado anholocíclico, que supone la pérdida de la fase sexual del ciclo típico y, por tanto, la existencia de una reproducción partenogenética vivípara continua. Este fenómeno se produce en algunos linajes de muchas especies de pulgones, por ejemplo *Rhopalosiphum padi* o *Schizaphis graminum* (subfamilia Aphidinae) (Martínez-Torres *et al.*, 1997; Delmotte *et al.*, 2001), en las que coexisten los linajes holocíclicos y los anholocíclicos. Los linajes asexuales aparecen dentro de especies de la mayoría de subfamilias de pulgones (Wilson *et al.*, 2003). Además, la anholociclia también se presenta en especies completas, como *Tuberolachnus*

Introducción general

salignus (subfamilia Lachninae) (Wilson *et al.*, 2003), *Aphis nerii* (subfamilia Aphidinae) (Nieto Nafría *et al.*, 2005) o algunas especies de la tribu Panaphidini (subfamilia Calaphidinae) (Nieto Nafría y Mier Durante, 1998). Es más, la tribu Tramini, perteneciente a la subfamilia Lachninae, ha sido considerada como probablemente totalmente partenogenética, al no haberse hallado individuos sexuados para ninguna de sus especies (Wilson *et al.*, 2003). Esta tribu representa uno de los taxones más elevados con reproducción exclusivamente partenogenética dentro del reino animal, junto con algunos grupos de cladóceros, caracoles, ácaros y, particularmente, la clase Bdelloidea del filo Rotifera (Wilson *et al.*, 2003). La existencia de esta tribu de pulgones demuestra la posibilidad de la permanencia a largo plazo de la reproducción exclusivamente partenogenética, y de la divergencia y la especiación sin reproducción sexual en este tipo de insectos (Moran, 1992). Algunos linajes anholocíclicos mantienen la capacidad de producir machos aún no pudiendo producir hembras sexuadas. Este tipo de ciclo anholocíclico se denomina androcíclico, y tiene gran importancia en la dinámica poblacional de algunas especies, ya que puede conllevar el intercambio génico entre distintos linajes. El flujo de individuos desde un linaje androcíclico hacia un linaje holocíclico puede conllevar la introducción en el último del alelo o alelos que determinan la anholociclia (Simon *et al.*, 1996; Martínez-Torres *et al.*, 1997).

Otra variación destacable del ciclo típico es la que presentan los miembros de la tribu Fordini (subfamilia Eriosomatinae). Las especies holocíclicas de esta tribu completan su ciclo en dos años en lugar de en uno (ver Capítulo 2 para más detalles). Los ciclos bianuales son raros en la familia Aphididae, siendo casi exclusivos de la tribu Fordini, aunque aparecen también en las especies del género *Hamamelistes* (subfamilia Hormaphidinae) (von Dohlen *et al.*, 2002). Existen también en especies de la familia Phylloxeridae y parecen ser generales en Adelgidae (Hales *et al.*, 1997; Castresana, 1998; Havill y Footitt, 2007).

Aunque los ciclos dioicos se presentan en las tres familias de la superfamilia Aphidoidea, Heie sugirió, basándose en evidencias fósiles, que el ciclo ancestral de los pulgones en sentido estricto (familia Aphididae) era monoico (Heie, 1981; von Dohlen y Moran, 2000). El ciclo típico de varias

subfamilias de pulgones es dioico, como ocurre en las subfamilias Anoeciinae, Aphidinae, Eriosomatinae y Hormaphidinae. Otras, sin embargo, se caracterizan por presentar un ciclo monoico, como Calaphidinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae, Lachninae, Mindarinae, Pterocommatinae y Thelaxinae. Cada uno de estos ciclos típicos no se presenta tampoco de manera obligatoria en todas las especies de pulgones pertenecientes a cada subfamilia. Por ejemplo, aunque se supone que el ciclo ancestral de la subfamilia Aphidinae fue un ciclo dioico, la mayoría de sus especies desarrollan en la actualidad ciclos monoicos.

La estructura de las especies de pulgones puede ser muy compleja. Existen muchas especies consistentes en varias razas o subespecies, linajes holocíclicos y anholocíclicos, poblaciones temporales y permanentes (Shaposhnikov, 1987b). Algunos linajes pueden mantenerse con reproducción partenogénica continua debido a que viven en lugares con climas benignos, donde simplemente no se dan los estímulos necesarios para la aparición de las formas sexuales. Esto ocurre, por ejemplo, con la especie *Eulachnus rileyi* en climas cálidos como en el sur de España (Nieto Nafría y Mier Durante, 1998). En la mayoría de casos, sin embargo, la partenogénesis continua es obligada debido a la existencia de alteraciones genéticas que producen la incapacidad de responder a los estímulos mediante la aparición de la fase sexual. La base genética y fisiológica de esta respuesta es, hoy por hoy, muy poco conocida, y es actualmente objeto de estudio mediante diversas aproximaciones (Ramos *et al.*, 2003; Le Trionnaire *et al.*, 2007; Cortés *et al.*, 2008). Se conoce desde hace tiempo que el principal factor desencadenante de la fase sexual es el acortamiento de los días que acontece a final de verano y principios del otoño, existiendo también una importante influencia de la disminución de las temperaturas (Marcovitch, 1924; Lees, 1973; Kawada, 1987). Las condiciones de fotoperiodo y temperatura que provocan la aparición de la fase sexual varían entre especies, así como entre distintos linajes dentro de una misma especie (Kawada, 1987). A su vez, un mismo linaje puede responder de manera distinta a diferentes condiciones de fotoperiodo, produciendo distintas proporciones de machos y hembras, o produciendo sólo machos, o simplemente no responder. Algunos linajes considerados *a priori* anholocíclicos pueden llegar a producir

formas sexuales bajo ciertas condiciones de fotoperiodo y temperatura. En general, el patrón de variación de los ciclos de vida puede explicarse como el resultado de la interacción entre los genotipos y el clima (Hales *et al.*, 1997). No obstante, existen especies capaces de producir formas sexuales con independencia de los factores externos, y otras, como las que habitan en raíces, que parecen conocer la estación del año en la que se encuentran a través del cambio nutricional de su hospedador y no mediante el fotoperiodo (Kawada, 1987).

La partenogénesis de los pulgones es apomíctica, lo cual garantiza que los descendientes de una hembra partenogenética son genéticamente idénticos a ella, y forman por tanto un clon (Hales *et al.*, 1997). En un ciclo típico, todas las formas o morfos que aparecen desde la fundadora hasta los individuos sexuados son genéticamente idénticas, ambas inclusive (a excepción de la pérdida de un cromosoma X en los machos). Este fenómeno convierte a los pulgones en excelentes organismos modelo para el estudio del polifenismo, que no es sino la aparición de fenotipos diferentes a partir de un mismo genotipo. Los ciclos biológicos de los pulgones presentan en general un gran número de formas, con una elevada diferenciación fenotípica. En ellas, aparecen polifenismos como el alar (individuos alados e individuos ápteros), reproductivo (viviparismo y oviparismo) o sexual (hembras partenogenéticas vivíparas, hembras sexuales ovíparas y machos). La mayor reducción del ciclo en cuanto a número de formas distintas se presenta en la subfamilia Mindarinae, cuyos ciclos se componen únicamente de tres generaciones: fundadora, sexúpara y formas sexuadas (Nieto Nafría y Mier Durante, 1998). En algunas especies alternantes pueden definirse hasta 8 o 9 formas. La forma fundadora de los pulgones está particularmente especializada en su hospedador, hasta el punto de que se ha argumentado que su elevada adaptación obliga a muchas especies de pulgones a mantener el hospedador primario como parte de su ciclo, impidiendo la evolución hacia un ciclo monoico de alimentación exclusiva sobre el hospedador secundario, lo que podría considerarse más beneficioso en términos nutricionales (Moran, 1988; Moran, 1990).

La formación de agallas está fuertemente ligada a la alternancia de hospedador: aparece en la familia Adelgidae y en las subfamilias Eriosomatinae, Hormaphidinae y Aphidinae de la familia Aphididae, todas ellas típicamente alternantes (Forrest, 1987). La excepción a esta regla es la subfamilia Tamaliinae, cuyas especies presentan ciclos monoicos e inducen también la formación de agallas (Miller III y Crespi, 2003; Blackman y Eastop, 2006). Las agallas se inducen generalmente en el hospedador primario del ciclo de la especie. En el caso de las especies gallígenas de la subfamilia Aphidinae, las deformaciones inducidas son básicamente enrollamientos de las hojas, y suelen denominarse pseudoagallas. Sin embargo, las especies gallígenas de las subfamilias Hormaphidinae y Eriosomatinae inducen agallas de mayor complejidad, que implican una sustancial deformación de los tejidos afectados y la desviación de los recursos del floema hacia la zona afectada (Forrest, 1987).

1.2. Asociaciones endosimbióticas

Los pulgones presentan una elevada variedad de asociaciones endosimbióticas con microorganismos, fenómeno que se halla muy extendido entre los insectos, y particularmente entre los hemípteros (Moran *et al.*, 1994). Dentro de la superfamilia Aphidoidea, no hay evidencias de la existencia de endosimbiontes en la familia Phylloxeridae pero sí en Adelgidae y Aphididae (Houk, 1987). En la familia Aphididae se han descrito simbiosis con diversos microorganismos, las cuales tienen efectos sobre el crecimiento y la supervivencia de estos insectos (Moran *et al.*, 2005b). La más destacable de entre ellas es la endosimbiosis con la bacteria *Buchnera aphidicola*. Esta bacteria se denomina comúnmente el endosimbionte primario de los pulgones ya que, a diferencia de otras bacterias simbiotas de áfidos, la relación entre *Buchnera* y los pulgones es obligada y permanente en el tiempo y en el ciclo biológico. El análisis filogenético de las secuencias correspondientes al gen del rRNA 16S reveló que *Buchnera* pertenece a la subdivisión γ 3 de la clase Proteobacteria, teniendo a *Escherichia coli* y las enterobacterias relacionadas como grupos filogenéticamente más cercanos. Por otro lado, las relaciones

filogenéticas obtenidas a partir de las secuencias de *Buchnera*, correspondientes a especies de pulgones de cuatro subfamilias, resultaron ser congruentes con las relaciones entre sus respectivos hospedadores en la filogenia de la familia Aphididae propuesta por Heie (1987). Este hecho condujo a la hipótesis de la existencia de una única infección por parte de esta bacteria en el ancestro de los pulgones actuales y la posterior coevolución y coespeciación de ambos taxones (Munson *et al.*, 1991a; Moran *et al.*, 1993; Moran y Baumann, 1994).

Además de *Buchnera*, existen otras bacterias que establecen simbiosis con los pulgones y que en conjunto son denominadas endosimbiontes secundarios. Se trata de bacterias de filiación filogenética variada, menos estudiadas que *Buchnera*, cuya simbiosis puede ser obligada o facultativa y que se transmiten horizontal y/o verticalmente. Habitan en varias localizaciones dentro de los pulgones y pueden cohabitar e interactuar unas con otras y con *Buchnera*. Se hallan extendidas en la familia Aphididae, pudiendo estar presentes en alrededor de la mitad de especies de este grupo. Algunas bacterias pertenecientes también a la subdivisión $\gamma 3$ de la clase Proteobacteria se han hallado en varias especies de pulgones pertenecientes a diversas tribus. Estas bacterias se han denominado como simbiosites tipo R (cercano al género *Serratia*), tipo T (similar al endosimbionte secundario de *Bemisia tabaci*), tipos U y V (filogenéticamente cercanos al tipo T), tipo Ars (similar a endosimbiontes presentes en varios hemípteros) y tipo So-So (filogenéticamente emparentado con el endosimbionte secundarios de la mosca tse-tsé). La diversidad de endosimbiontes secundarios se ha estudiado más a fondo en la especie de pulgón *Acyrtosiphon pisum* (subfamilia Aphidinae). En ésta se han hallado varios de los tipos de simbiosites mencionados, así como otros pertenecientes a los géneros *Rickettsia* (α -Proteobacteria) y *Spiroplasma* (grupo Mollicutes). La simbiosis de pulgones con microorganismos ha llegado a establecerse incluso con levaduras, fenómeno que ocurre en las especies de la tribu Cerataphidini (subfamilia Hormaphidinae), las cuales no presentan asociación simbiótica con *Buchnera* (Chen y Purcell, 1997; Fukatsu *et al.*, 2000; Sandstrom *et al.*, 2001; Moya *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2002; Tsuchida *et al.*, 2002; Russell *et al.*, 2003; Lamelas *et al.*, 2008).

La complejidad de la simbiosis entre *Buchnera* y sus hospedadores los pulgones es realmente elevada. Esta bacteria se halla, dentro de estos insectos, en un órgano especial denominado micetoma o bacterioma, que se sitúa debajo del tracto digestivo en el abdomen de los adultos y rodeando el intestino en los embriones en desarrollo. Este órgano está compuesto por células denominadas micetocitos (o bacteriocitos), células hipertrofiadas y presumiblemente poliploides, que tienen por función albergar la bacteria. Dentro de estas células, las bacterias se encuentran agrupadas en el interior de vacuolas (Houk, 1987). *Buchnera* está presente durante toda la vida del pulgón, y es transmitida por vía materna, mediante la infección del embrión en el abdomen de la madre (Munson *et al.*, 1991a; Munson *et al.*, 1991b). En el momento de la infección, la población de *Buchnera* sufre una drástica reducción en número, lo cual conlleva la existencia de un cuello de botella con importantes consecuencias para su genética poblacional y su evolución. Parece ya claro que la función de *Buchnera* en la simbiosis es la de aportar ciertos nutrientes, fundamentalmente aminoácidos esenciales, que escasean o no existen en la dieta alimenticia de los pulgones. Por su parte, *Buchnera* parece recibir de esta simbiosis la posibilidad de vivir en un ambiente de condiciones físico-químicas estables y con un continuo aporte de nutrientes (Houk, 1987; Moya *et al.*, 2002).

Los fósiles de pulgones indican que la asociación entre estos insectos y *Buchnera* tiene al menos 80 millones de años, mientras que los resultados filogenéticos obtenidos a partir de las secuencias del gen que codifica el rRNA 16S sugieren que esta simbiosis comenzó hace entre 160 y 280 millones de años (Munson *et al.*, 1991a; Moran *et al.*, 1993; Moran y Baumann, 1994). Según Heie, esta estima es demasiado antigua, y corresponde probablemente al momento del origen del ancestro común de Aphidoidea (von Dohlen y Moran, 2000). A lo largo de la coevolución entre los pulgones y su endosimbionte primario, *Buchnera* ha sufrido un proceso de elevada reducción genómica. La estabilidad del ambiente en el que vive y el continuo aporte de nutrientes por parte del pulgón han sido probablemente las causas de la pérdida de genes no imprescindibles para su vida intracelular. La reducción genómica ha llegado al punto de convertir a *Buchnera* en una de las bacterias con menor tamaño

genómico, de alrededor de 450-670 kb. La mayor reducción se ha producido en las bacterias presentes en las especies de las subfamilias Chaitophorinae, Thelaxinae y, principalmente, Lachninae. La investigación sobre los tamaños genómicos de estas bacterias ha incentivado en los últimos años el debate acerca de cuál es el tamaño y la composición genética del genoma mínimo necesario para la vida (Gil *et al.*, 2002).

La secuenciación del genoma de *Buchnera* en las especies de pulgones *Acyrtosiphon pisum* (Aphidinae) (Shigenobu *et al.*, 2000), *Baizongia pistaciae* (Eriosomatinae) (van Ham *et al.*, 2003), *Cinara cedri* (Lachninae) (Perez-Brocal *et al.*, 2006) y *Schizaphis graminum* (Aphidinae) (Tamas *et al.*, 2002) ha revelado, además del drástico proceso de reducción genómica, una extremada conservación del orden génico entre las cuatro cepas, para aquellos genes que aún comparten. Este hecho ha conducido a calificar a *Buchnera* como un fósil de orden génico (van Ham *et al.*, 2003; Perez-Brocal *et al.*, 2006). Sin embargo, la elevada estabilidad cromosómica contrasta con la plasticidad hallada para la localización y el orden de los genes que codifican los enzimas limitantes de la ruta de biosíntesis de los aminoácidos leucina y triptófano (Latorre *et al.*, 2005). En el caso del primero, se han hallado, en diversos estudios, al menos 4 plásmidos diferentes y 4 localizaciones cromosómicas distintas para el grupo de genes *leuA*, *leuB*, *leuC* y *leuD* (Bracho *et al.*, 1995; Sabater-Muñoz *et al.*, 2004; Latorre *et al.*, 2005). Estos genes se hallan situados en plásmidos y en diferente orden en las especies estudiadas de las subfamilias Aphidinae, Lachninae, Pterocommatinae y Thelaxinae. Sin embargo, se han encontrado formando parte del cromosoma, y además en distintas localizaciones, en las subfamilias Chaitophorinae y Eriosomatinae (Latorre *et al.*, 2005). La amplificación de plásmidos que contienen genes para la biosíntesis de aminoácidos esenciales fue en su momento considerada una indicación del papel de *Buchnera* en la simbiosis como suministradora de estos nutrientes (van Ham *et al.*, 1997; van Ham *et al.*, 1999; Sabater-Muñoz *et al.*, 2004; Latorre *et al.*, 2005).

2. Taxonomía y filogenia de pulgones

2.1. Posición sistemática y caracteres distintivos

Diferentes autores han propuesto clasificaciones discrepantes en cuanto al nombre y la composición del orden de insectos en el que se incluyen los pulgones. Linneo estableció en 1758 los órdenes Hemiptera y Homoptera, incluyéndose los áfidos en este último (Linneo, 1758). Estos dos taxones aparecen también en otras clasificaciones más modernas (Poisson y Pesson, 1951; Metcalf, 1951; Heie, 1987). Sin embargo, otros autores han optado por fusionar ambos grupos en un solo orden, denominado Hemiptera, manteniendo algunos de ellos una subdivisión inferior en Heteroptera y Homoptera (Gillot, 1980). En 1995 dos estudios basados en datos moleculares abordaron las relaciones filogenéticas y la clasificación de estos grupos, llegando a conclusiones similares. Los resultados de estos estudios mostraron, particularmente, que Homoptera no es un grupo monofilético (figura I.6) (von Dohlen y Moran, 1995; Campbell *et al.*, 1995). Por un lado, el suborden Coleorrhyncha, perteneciente al taxón Homoptera, está filogenéticamente más emparentado al taxón Heteroptera que al resto de miembros de Homoptera. Además, el suborden Sternorrhyncha, al cual pertenecen los pulgones, se situó

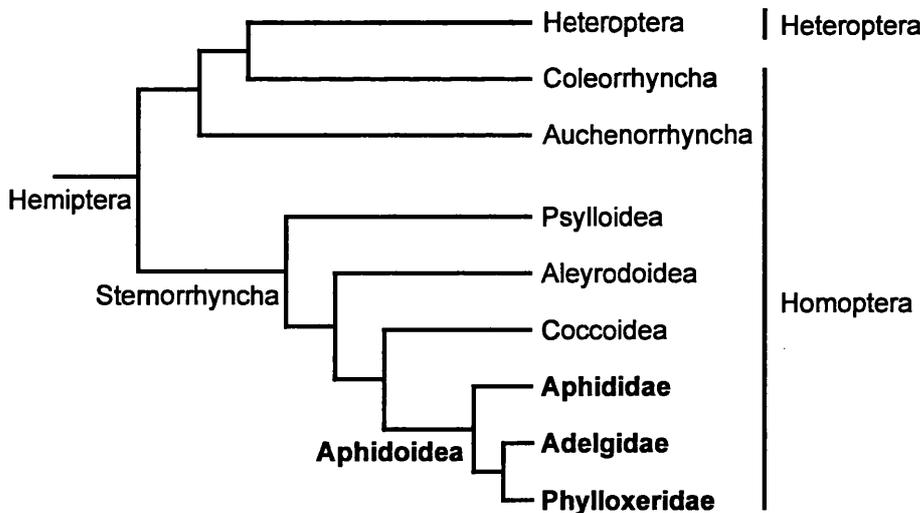


Figura I.6. Relaciones filogenéticas entre los miembros del orden Hemiptera, con mayor detalle del suborden Sternorrhyncha y la superfamilia Aphidoidea, taxones a los que pertenecen los pulgones. Elaboración propia a partir de los resultados filogenéticos moleculares obtenidos por Campbell *et al.* (1995) y von Dohlen y Moran (1995).

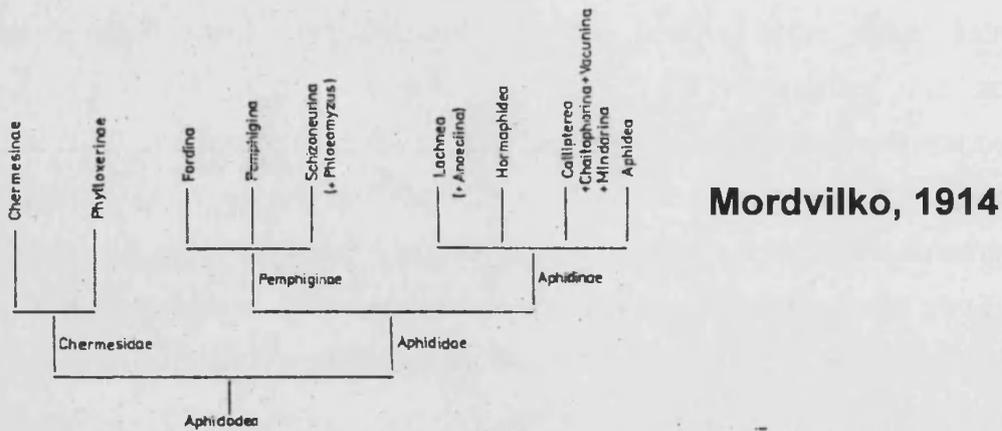
en la posición basal del conjunto formado por Homoptera y Heteroptera. Es preferible, por ello, usar el término orden Hemiptera para agrupar a todos estos insectos. Los miembros del orden Hemiptera se caracterizan por su aparato bucal picador-chupador, con un pequeño labro, el labio modificado y cuatro estiletes que crean dos canales, uno de inyección de saliva y otro de succión de alimento, que les permite la alimentación a partir de la savia vegetal (Nieto Nafría y Mier Durante, 1998).

Como se ha mencionado anteriormente, los pulgones se hallan clasificados dentro del suborden Sternorrhyncha. Los miembros de este suborden se caracterizan por presentar alas anteriores uniformemente membranosas y más grandes que las posteriores, por la ausencia de esclerotización gular que los hace opistognatos, y porque el flagelo antenal no presenta más de cuatro artejos. La subdivisión de este grupo ha sido estable, en cuatro superfamilias: Aphidoidea, Aleyrodoidea, Coccoidea y Psylloidea (Nieto Nafría y Mier Durante, 1998). La superfamilia Aphidoidea, que agrupa a los pulgones, está filogenéticamente más emparentada al grupo de los cóccidos o cochinillas, la superfamilia Coccoidea (figura 1.6) (von Dohlen y Moran, 1995; Campbell *et al.*, 1995). Morfológicamente, las especies pertenecientes a la superfamilia Aphidoidea se caracterizan por mostrar formas adultas ápteras y aladas, éstas últimas siempre con dos pares de alas, las cuales no presentan celdillas alares cerradas y tienen una sola vena longitudinal. Presentan además tarsos de dos artejos, rostro que nace aparentemente entre o detrás de las coxas anteriores, ovipositor reducido o ausente y ausencia de clavus. Para la distinción de los miembros de Aphidoidea sirven también como caracteres diagnóstico la presencia de triomatidio en el ojo compuesto y la estructura típica de la antena, con el último antenómero dividido en base y filamento terminal (Heie, 1980; Heie, 1987; Nieto Nafría y Mier Durante, 1998). Es característico de esta superfamilia, asimismo, la presencia de partenogénesis cíclica en sus ciclos biológicos (Nieto Nafría y Mier Durante, 1998). Como se ha mencionado anteriormente, las especies de la fauna actual de Aphidoidea se encuadran, según las clasificaciones más recientes, en tres familias: Adelgidae, Phylloxeridae y Aphididae, siendo las dos primeras taxones hermanos (Remaudière y Stroyan, 1984; Remaudière y Quednau, 1988; Blackman y

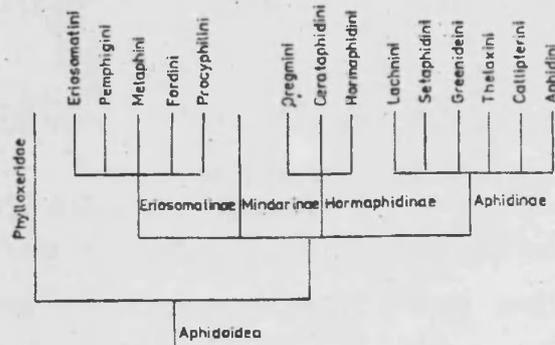
Eastop, 1994; Quednau y Remaudière, 1994; Blackman y Eastop, 2000; Blackman y Eastop, 2006). Una de las características distintivas más importantes entre estos grupos es que, desarrollando todos ellos ciclos biológicos con partenogénesis cíclica, las hembras partenogenéticas de Aphididae son siempre vivíparas mientras que las de Phylloxeridae y Adelgidae son ovíparas. Existen otras características morfológicas que permiten distinguir a los miembros de la familia Aphididae, que engloba a los pulgones en sentido estricto. Entre ellas destacan la presencia de cornículos, la anatomía particular de las alas anteriores y un abdomen más voluminoso que el conjunto de tórax y cabeza (Nieto Nafría y Mier Durante, 1998).

2.2. Revisión de las clasificaciones e hipótesis filogenéticas morfológicas previas

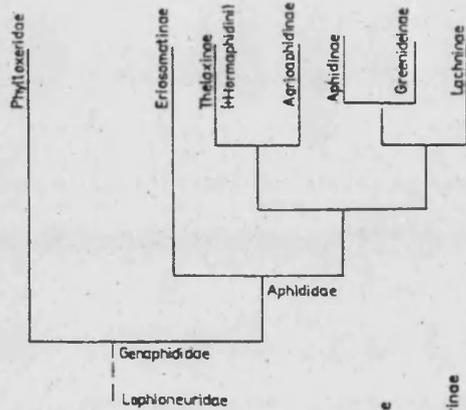
La clasificación de los pulgones ha sido muy controvertida desde sus inicios. Esta controversia ha dado lugar a un número muy elevado de clasificaciones, hasta el punto de que uno de los más conocidos taxónomos de este grupo, Heie, llegó a escribir que "existen tantas clasificaciones como taxónomos de pulgones" (Heie, 1980). La figura 1.7 muestra los esquemas de algunas de las clasificaciones realizadas, que fueron revisadas en profundidad por Ilharco y van Harten (1987) y Wojciechowski (1992). Uno de los problemas principales de la sistemática de los pulgones es la falta de caracteres morfológicos con una variabilidad apropiada en los niveles taxonómicos mayores. En comparación con otros miembros del suborden Sternorrhyncha, la morfología de los pulgones está bastante simplificada. La simplificación morfológica ha implicado probablemente la eliminación de muchos caracteres útiles para la reconstrucción filogenética morfológica. Por otro lado, se han dado probablemente casos de reducciones morfológicas convergentes (Heie, 1987; von Dohlen y Moran, 1995; von Dohlen y Moran, 2000). Por último, para muchos caracteres es difícil decidir qué estado es plesiomórfico y cuál apomórfico (Heie, 1980).



Baker, 1920



Takahashi, 1931



Mordvilko, 1948

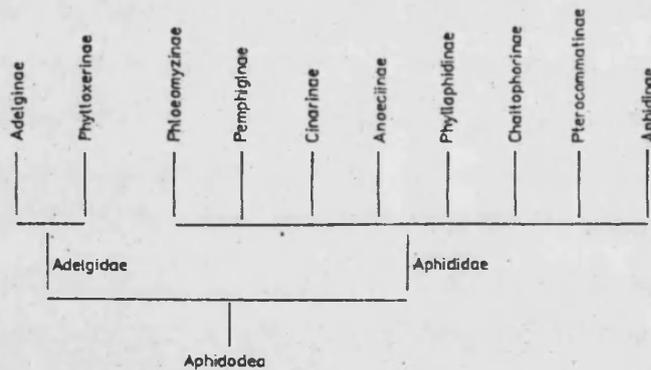
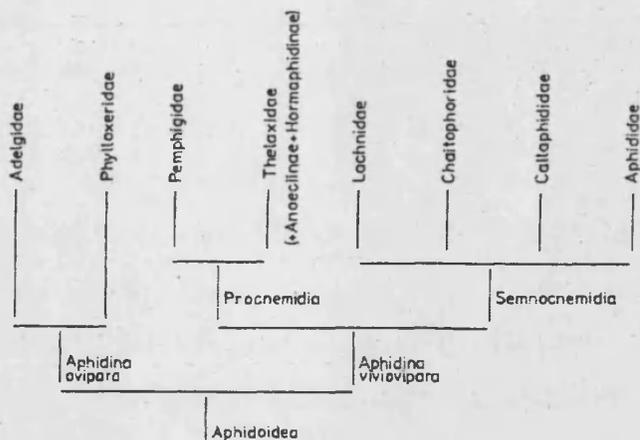
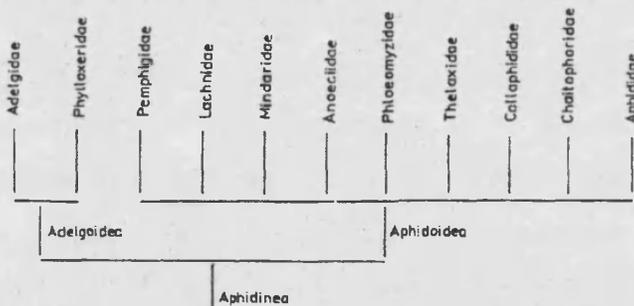


Figura I.7. Esquemización de algunas de las clasificaciones morfológicas de pulgones. Para cada caso, se indica el autor y la fecha de la clasificación. Imágenes reproducidas de Wojciechowski, 1992.

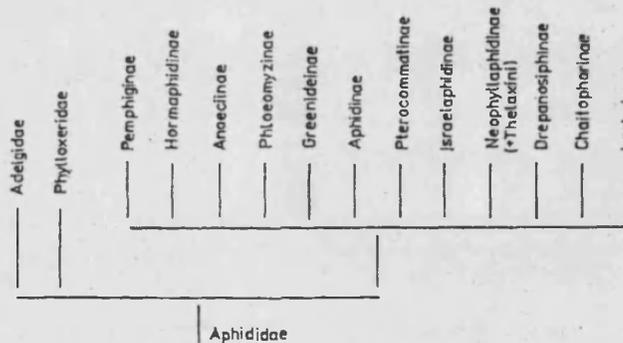
Börner, 1952



Shaposhnikov, 1964



Eastop, 1977



Heie, 1980

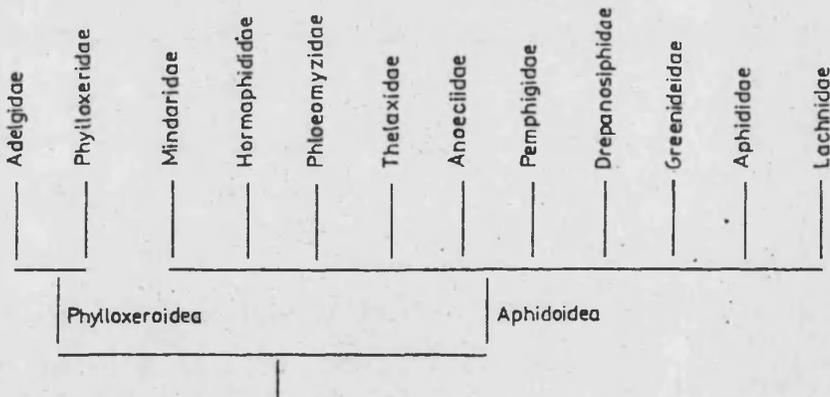


Figura I.7. Continuación.

La controversia de la clasificación del taxón que engloba a los pulgones ha estribado tanto en el número de grupos en los que debe subdividirse como en el rango taxonómico que debe aplicársele (Ilharco y van Harten, 1987). Los pulgones vivíparos o pulgones verdaderos se han agrupado en algunas clasificaciones en la familia Aphididae (ver figura I.6) (Takahashi, 1931; Mordvilko, 1948), dividiendo ésta en varias subfamilias. Otros autores han dado a este grupo el rango de superfamilia Aphidoidea (no incluyendo las familias Phylloxeridae ni Adelgidae) (Shaposhnikov, 1964; Heie, 1980), otorgando el nivel de familia a los grupos internos. Por otro lado, el número de subdivisiones de este taxón ha sido muy variable. Por ejemplo, Mordvilko (1914) y Baker (1920) incluyeron sólo 2 y 4 subfamilias, respectivamente. Sin embargo, Shaposhnikov (1964) realizó 9 subdivisiones, mientras que Eastop (1977) aumentó el número a 12. En los últimos años, una de las clasificaciones más seguidas ha sido la propuesta por Heie (1980) (figura I.7), basada en la revisión de clasificaciones anteriores. Heie consideró el grupo de los pulgones vivíparos con el rango de superfamilia Aphidoidea, y lo dividió en 10 familias, proponiendo además relaciones filogenéticas entre ellas. Su clasificación y su filogenia han sido ampliamente seguidas por los especialistas de este grupo de insectos.

En este trabajo de tesis doctoral se ha seguido la clasificación de pulgones que fue propuesta en tres trabajos sucesivos por Remaudière, Stroyan y Quednau (Remaudière y Stroyan, 1984; Remaudière y Quednau, 1988; Quednau y Remaudière, 1994). Esta clasificación aparece recogida en el catálogo mundial de pulgones *Catalogue des Aphididae du Monde* (Remaudière y Remaudière, 1997). Se han seguido, asimismo, algunas precisiones nomenclaturales realizadas por Nieto Nafria *et al.* (1997). En esta clasificación los pulgones vivíparos conforman la familia Aphididae, equivalente a la superfamilia Aphidoidea de Heie (1980) (tabla I.1). La familia está compuesta por 25 subfamilias, de las cuales 15 están representadas en la Península Ibérica y las Islas Baleares, con alrededor de 500 especies y subespecies descritas en estas zonas geográficas. Además del cambio en el nivel taxonómico asignado al grupo, esta clasificación difiere de la de Heie y otras anteriores en la división de algunos de los grupos internos, lo que resulta

en el elevado número de subfamilias que la componen. Por ejemplo, el grupo reunido por Heie (1980) en la familia Drepanosiphidae aparece aquí dividido en 14 taxones de rango subfamilia, en un intento de reflejar su heterogeneidad tanto morfológica como de hospedador vegetal (Heie, 1987). Asimismo, es destacable la división de la familia Aphididae de Heie (1980) en dos grupos, de rango subfamilia, en la clasificación de Remaudière, Stroyan y Quednau (1984; 1988; 1994): Aphidinae y Pterocommatinae.

Tabla I.1. Clasificaciones de Heie (1980) y Remaudière, Stroyan y Quednau (1984, 1988, 1994) organizadas para mostrar la correspondencia de los grupos entre ambas.

Heie	Remaudière, Stroyan y Quednau
Infraorden Aphidodea	Superfamilia Aphidoidea
Superfamilia Phylloxeroidea	
Familia Adelgidae	Familia Adelgidae*
Familia Phylloxeridae	Familia Phylloxeridae*
Superfamilia Aphidoidea	Familia Aphididae*
Familia Anoeciidae	Subfamilia Aiceoninae
Familia Aphididae	Subfamilia Anoeciinae*
Familia Drepanosiphidae	Subfamilia Aphidinae*
	Subfamilia Pterocommatinae*
	Calaphidinae* Chaitophorinae*
	Drepanosiphinae* Israelaphidinae
	Lizeriinae Macropodaphidinae
	Neophyllaphidinae Parachaitophorinae
	Phyllaphidinae Pterastheniinae
	Saltusaphidinae* Spicaphidinae
	Taiwanaphidinae Tamaliinae
Familia Pemphigidae	Subfamilia Eriosomatinae*
Familia Greenideidae	Subfamilia Greenideinae
Familia Hormaphididae	Subfamilia Hormaphidinae*
Familia Lachnidae	Subfamilia Lachninae*
Familia Mindaridae	Subfamilia Mindarinae*
Familia Phloeomyzidae	Subfamilia Phloeomyzinae*
Familia Thelaxidae	Subfamilia Thelaxinae*

* Familias y subfamilias presentes en la Península Ibérica.

Basándose en su propia clasificación, Heie propuso posteriormente una filogenia a partir de 34 caracteres morfológicos y uno de ciclo de vida (figura I.8) (Heie, 1987). La dificultad de establecer clasificaciones y relaciones filogenéticas en este grupo queda reflejada por ejemplo en el hecho de que, al proponer la filogenia, el propio Heie ofreció una lista de caracteres que serían

convergentes en el caso de ser cierta (Heie, 1987). Algunos años más tarde, Wojciechowski (1992) propuso un filogenia alternativa empleando prácticamente los mismos caracteres morfológicos, aunque con conclusiones diferentes respecto a las consideraciones de plesiomorfía o apomorfía de sus estados (figura 1.8). A pesar de las discrepancias existentes entre las relaciones filogenéticas propuestas por Heie y Wojciechowski, cabe destacar que ambos autores mantuvieron una estrecha relación entre las subfamilias Aphidinae y Lachninae, las cuales aparecen también muy próximas en algunas de las clasificaciones anteriores (figura 1.7). Otras clasificaciones, no obstante, han considerado la subfamilia Lachninae como basal al resto del grupo. La posición de esta subfamilia es controvertida y depende de si los estados de algunos caracteres morfológicos son considerados o no plesiomórficos. Algunos autores consideraron que Lachninae era muy primitiva dentro de Aphididae, aceptando que sus características morfológicas presentaban estados aparentemente plesiomórficos, mientras que otros, entre ellos Heie, postularon que se trata de una subfamilia bastante joven (Heie, 1980). Las clasificaciones de Börner (ver figura 1.7) (1952) y Börner y Heinze (1957) presentan similitudes con la filogenia propuesta por Wojciechowski. Estos autores dividieron los pulgones en dos grupos, denominados Semnocnemidia y Procnemidia. En el primero de ellos los autores incluyeron las especies de pulgones pertenecientes a las subfamilias Lachninae, Chaitophorinae, Calaphidinae y Aphidinae, y en el segundo Thelaxinae (que incluía Anoeciinae, Thelaxinae, Hormaphidinae y Mindarinae) y Eriosomatinae. La clasificación de Börner y Heinze fue en su momento seguida por muchos autores, aunque fue criticada por haber generado demasiadas divisiones respecto a clasificaciones anteriores y sin demasiado fundamento morfológico (Ilharco y van Harten, 1987).

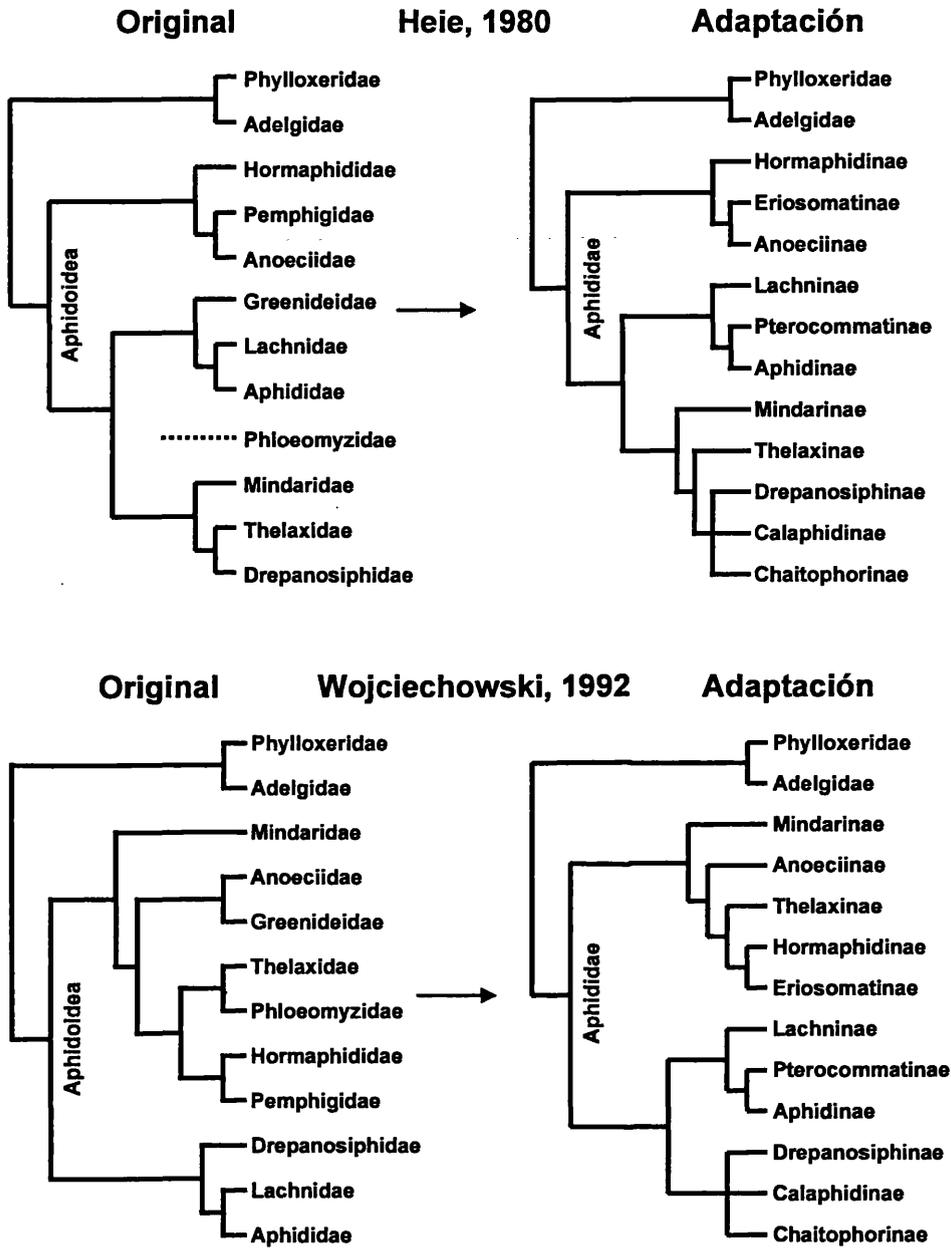


Figura 1.8. Hipótesis filogenéticas basadas en caracteres morfológicos. Se muestra la filogenia propuesta por cada autor a la izquierda y una adaptación de la misma a la derecha, siguiendo la clasificación y nomenclatura de Remaudière, Stroyan y Quednau (1984; 1988; 1994) e incluyendo sólo las subfamilias estudiadas en este trabajo.

2.3. Paleontología e historia evolutiva

La contribución paleontológica a la comprensión de la evolución de los pulgones es bastante escasa. Hasta 1994 se habían descrito unas 200 especies de fósiles, un número bajo teniendo en cuenta que su origen se sitúa en el Triásico, y que actualmente existen más de 4400 especies (Heie, 1987; Heie, 1994). Los pulgones fósiles mejor conservados provienen de ámbar del Mar Báltico, la región rusa de Tajmyr, Canadá, la República Dominicana y Líbano. Su venación alar, entre otras características, suele ofrecer pocas dudas sobre su adscripción a este grupo, aunque la determinación de la posición sistemática sí es compleja (Heie, 1987). El primer fósil de pulgón fue mencionado, pero no descrito, en 1829 por Curtis. La primera descripción corresponde al pulgón *Aphis valdiensis*, realizada por Brodie, en 1845, correspondiente al Jurásico Superior (Brodie, 1845; Heie, 1987; Heie, 2004). Inicialmente se pensaba que los pulgones fósiles eran muy similares a los actuales y se agrupaban en los géneros *Lachnus* (subfamilia Lachninae), por entonces considerado muy antiguo, y *Aphis* (subfamilia Aphidinae), género ya descrito por Linneo. Posteriormente la mayoría de estos fósiles fueron adscritos a otros géneros, y otros autores consideraron como más "primitivos" a las especies de algunas tribus de la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie (1980) o de la subfamilia Mindarinae (Heie, 1980).

Algunas familias extintas del suborden Sternorrhyncha conocidas del Pérmico, fundamentalmente Archescytinidae, están de alguna manera relacionadas con el ancestro de los pulgones, pero no se ha hallado ningún fósil de ese periodo que pueda ser clasificado en los grupos ancestros comunes de pulgones y cóccidos (Heie, 1987). Según Heie, la superfamilia Aphidoidea (infraorden Aphidodea en su clasificación) existe desde el Triásico, y la familia Aphididae (superfamilia Aphidoidea en su clasificación) al menos desde el Jurásico. La separación entre pulgones ovíparos y vivíparos ocurrió en ese periodo o antes. Con anterioridad, el linaje se había separado de la superfamilia extinta Canadaphidoidea *sensu* Heie (1987). El número de fósiles adscritos a la superfamilia Aphidoidea conocido del Triásico es muy bajo (sólo 1 en 1987), algo mayor en el Jurásico (3), y en el Cretácico se conocen ya las 3

familias actuales además del linaje hermano extinto (Heie, 1987). En el Cretácico Inferior todos los pulgones pertenecían a taxones extintos, algunos de los cuales no pueden colocarse en las familias actuales. La mayoría o todas las subfamilias actuales se originaron probablemente en el Cretácico Superior, y además en un periodo de tiempo relativamente corto, lo cual dificulta la obtención de un árbol filogenético que refleje los procesos de especiación ocurridos.

La afidofauna del Terciario se parece significativamente más a la actual que la del Cretácico. Algunos géneros aún existen, como *Mindarus* del Eoceno,

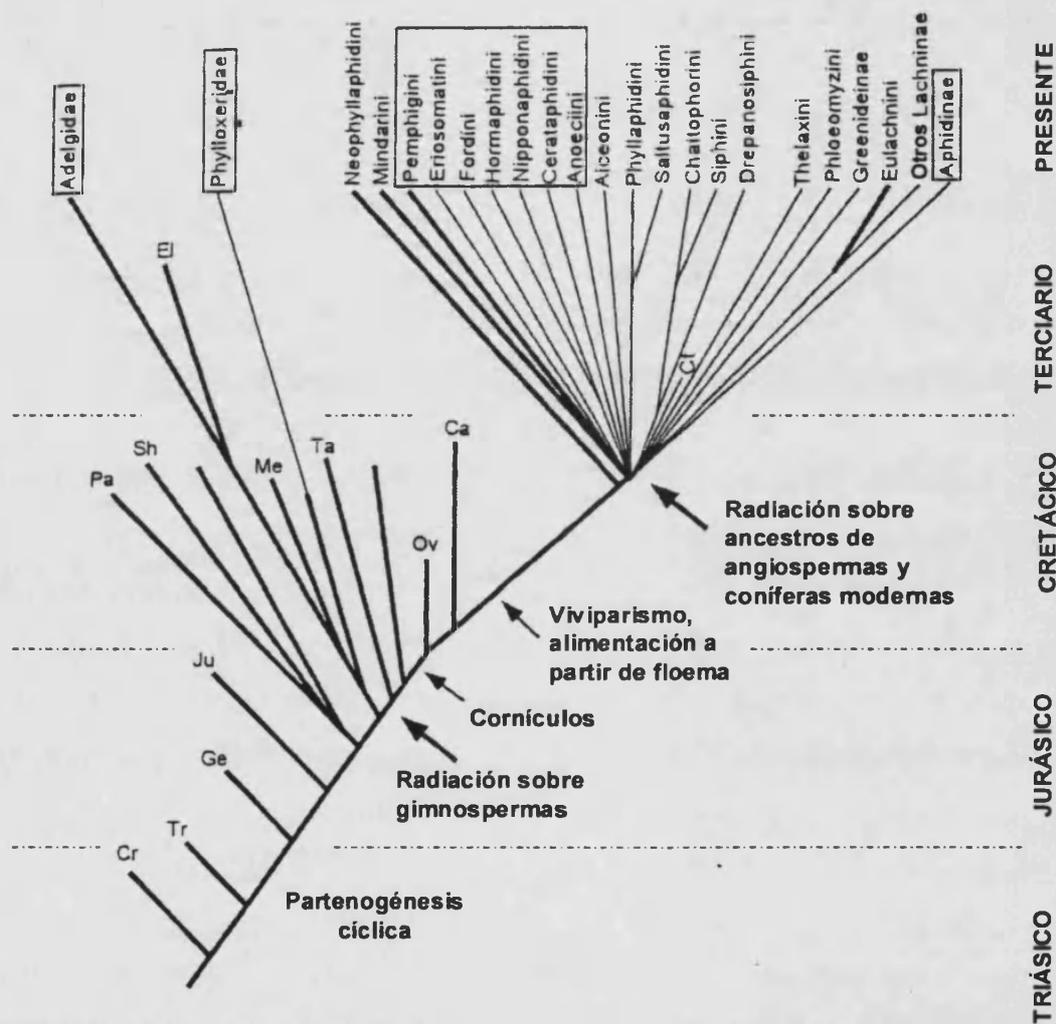


Figura 1.9. Hipótesis de la historia evolutiva de los pulgones, con indicación de la edad aproximada de aparición de algunos caracteres fundamentales de su biología. Taxones extintos: Ca, Canadaphidinae; Cr, Creaphididae; Ct, Cretamyzinae; El, Elektraphididae; Ge, Genaphididae; Ju, *Jurocallis*; Me, Mesozoicaphididae; Ov, Oviparosiphinae; Pa, Palaeoaphididae; Sh, Shaposhnikoviidae; Ta, Tajmyraphididae; Tr, *Triassoaphis*. Imagen modificada a partir de von Dohlen y Moran (2000).

Introducción general

Eriosoma, *Tetraneura*, *Longistigma* y *Adelges* del Terciario Superior, y algunos son muy similares a géneros actuales, como *Palaeothelaxes* a *Thelexes*. La mayoría del resto de fósiles pertenecen a subfamilias o tribus actuales de Aphididae (*sensu* Remaudière y Stroyan, 1984). La superfamilia Canadaphidoidea *sensu* Heie y otros linajes del Cretácico desaparecieron (Heie, 1987). Las únicas subfamilias de Aphididae conocidas que se hallan en ambos periodos, el Cretácico y el Terciario, son Mindarinae, Aphidinae y Drepanosiphidae *sensu* Heie. La mayoría del resto aparece en el Eoceno, pero Heie concluyó que debieron de haber aparecido antes, por ser filogenéticamente cercanos a alguna de las tres subfamilias mencionadas. Aunque el número de pulgones fósiles es escaso, lo hallado indica que en el Terciario las subfamilias más numerosas no eran Aphidinae y Lachninae, como en la actualidad, sino Eriosomatinae y Drepanosiphidae *sensu* Heie (1994). Otros grupos han disminuido su riqueza de especies, como el género *Mindarus*, mucho más diverso en el Terciario Inferior, y cuyas especies actuales pueden considerarse fósiles vivientes, con poca variación y muchos caracteres plesiomórficos (Heie, 1980; Heie, 1987). El conocimiento paleontológico de la parte más reciente del Terciario es aún más escaso; existen muy pocos fósiles pertenecientes a las épocas del Mioceno, Plioceno y Pleistoceno (figura I.9) (Heie, 1994).

El registro fósil indica tres grandes cambios en la composición de la fauna de pulgones. Los pocos pulgones del Jurásico son tan diferentes entre sí que probablemente eran parientes tan lejanos como los actuales Eriosomatinae y Drepanosiphidae *sensu* Heie (1987). Según este autor, esto indica que, tras la aparición del primer pulgón en el Triásico o el Pérmico Superior, debió de surgir una diversidad considerable durante el Mesozoico temprano, a través de especiación intensa o radiación adaptativa, y probablemente como respuesta a la diversificación de las plantas gimnospermas (Heie, 1987; von Dohlen y Moran, 2000). Probablemente la gran mayoría de pulgones en el Cretácico y al inicio del Terciario vivían en coníferas (von Dohlen y Moran, 2000). La gran diferencia entre la afidofauna del Cretácico y la del Terciario muestra, como se ha comentado, que varios taxones de elevado rango se extinguieron y fueron reemplazados por descendientes minoritarios de taxones del Mesozoico. La

mayoría, si no todas, las subfamilias actuales y del Terciario aparecieron en el Cretácico, pero no fueron una parte dominante de la fauna en aquel momento. Es razonable conectar este segundo cambio con la transición desde la era de las gimnospermas a la de las angiospermas, pero una gran parte de los pulgones del Terciario Inferior probablemente aún estaba asociada a gimnospermas, como sus parientes lo están hoy en día. El registro fósil de las plantas parece concordar con la hipótesis de que este segundo gran cambio estaría conectado a la transición de gimnospermas a angiospermas, ya que las primeras sufrieron una gran extinción en el límite entre el Cretácico y el Terciario, y las segundas parece que aparecieron durante el Cretácico (von Dohlen y Moran, 2000). Un tercer cambio ocurrió recientemente, cuando especies de Lachninae y especialmente Aphidinae se volvieron muy numerosas, cuando el cambio climático condujo a la dominancia de las angiospermas herbáceas (Heie, 1987; Moran *et al.*, 1999; von Dohlen y Moran, 2000). Según Shaposhnikov, los Drepanosiphidae *sensu* Heie cedieron durante el Terciario el cetro de la dominancia a los Aphidinae, subfamilia que ha conseguido el mayor progreso biológico, presentando un número abundante de especies e individuos (60% de todas las especies), una gran variedad de hospedadores y una amplia extensión ecológica y geográfica (Shaposhnikov, 1987a).

Para Dixon, dos características de los pulgones han sido relevantes en su evolución, y ambas aparecieron pronto en el grupo. Por un lado, su modo de reproducción mediante partenogénesis cíclica, aparecida hace 200 millones de años, en el Pérmico (Dixon, 1987b), antes de la división de las tres familias de Aphidoidea (Dixon, 1987a). La partenogénesis permitió a los pulgones adquirir la capacidad del solapamiento de generaciones, el polimorfismo clonal y el desarrollo de elevadas tasas de reproducción, que son importantes para colonizar hábitats nuevos o efímeros y sobreponerse a cambios dramáticos espacio-temporales en sus poblaciones (Dixon, 1987a). La reproducción vivípara de hembras partenogénicas apareció como más tarde en el Cretácico Superior (figura 1.9). Los primeros representantes de la familia Aphididae eran probablemente ovíparos, relacionados con el grupo extinto Oviparosiphidae (Heie, 1994). La otra característica importante ha sido su

fuelle de alimentación, que ha regido su distribución mundial (Dixon, 1987c). La alimentación ha sido importante porque cada especie de pulgón ha tenido que adaptarse a las particularidades de la savia de cada planta y sincronizar su desarrollo al de ésta. La dificultad de sincronizar el desarrollo y la especialización de formas para la explotación de una o más especies de hospedadores ha sido posiblemente un factor principal en la restricción del rango de hospedador de la mayoría de especies de pulgones (Dixon, 1987c). Los pulgones han tenido que adaptarse a un número tan elevado de restricciones que era improbable que fueran capaces de optimizar sus ciclos biológicos viviendo en varias especies de plantas y, por tanto, es esperable un alto grado de especificidad. Los ciclos biológicos de los pulgones han evolucionado, además, para adaptarse a los ciclos estacionales de sus hospedadores. Cuando las condiciones son más duras, generalmente en verano e invierno, los pulgones disminuyen su tasa de desarrollo y reproducción, entran en diapausa, o alternan a otra planta hospedadora (Shaposhnikov, 1987a). La adaptación a los ciclos estacionales de sus hospedadores, entre otros factores, resulta en la aparición de las formas especializadas (Shaposhnikov, 1987a).

Los ancestros de la familia Aphididae tenían un ciclo monoico sobre plantas leñosas. La alternancia de hospedador probablemente evolucionó durante el Mesozoico o, como máximo, en el Terciario Inferior. Según Shaposhnikov, el primer tipo de alternancia en aparecer fue el tipo eriosomatino (ver apartado 1.1), mientras que el afidino debió de evolucionar mucho después en el Terciario, a la vez que la aparición en masa de las plantas herbáceas. El cambio de hospedador también es un factor fundamental en la evolución de los pulgones, ya que da lugar a nuevos taxones. Por ejemplo, el grado de especialización de la fundadora influye en el resultado de la adquisición de un nuevo hospedador. Si es bajo, todas las formas pueden pasar al nuevo hospedador; si es elevado, aparece la alternancia entre el hospedador original y el nuevo (Shaposhnikov, 1987a).

Varios autores apoyan que los ancestros de los pulgones se alimentaban sobre plantas coníferas. Shaposhnikov afirma que cuanto más primitivo es un taxón de pulgones, más conectado está a plantas leñosas. El porcentaje de

ocupación de la diversidad de especies de coníferas es mucho mayor que el de dicotiledóneas, y éste que el de monocotiledóneas. Además, están más especializados en las coníferas que en las dicotiledóneas, hecho que conduce a este autor a concluir que los pulgones estaban inicialmente conectados a las primeras (Shaposhnikov, 1987a). Pese a que en la filogenia propuesta por Heie el grupo basal no está actualmente relacionado con coníferas, este autor también apoya la ancestralidad de la alimentación sobre estas plantas. Según este autor, la existencia de varias especies de Eriosomatinae en ámbar del Báltico con hospedadores primarios diversos pero siempre con coníferas como hospedadores secundarios apoya la hipótesis de la alimentación primitiva sobre éstas (Heie, 1987). Heie también opinó que el hecho de que la subfamilia Lachninae se alimente sobre este grupo de plantas condujo a algunos autores a considerarlo primitivo, aunque según este autor es un grupo relativamente reciente, hermano de Aphidinae.

CAPÍTULO 1

Filogenia molecular de la familia Aphididae

1. Introducción

El primer estudio que utilizó datos moleculares de secuencias de DNA de pulgones para el análisis filogenético en este grupo de insectos fue publicado en 1994 (Stern, 1994). La secuenciación del gen mitocondrial que codifica la subunidad I de la citocromo oxidasa, en especies pertenecientes a la subfamilia Hormaphidinae, permitió realizar avances en el conocimiento de la evolución de las castas de soldados, así como en la taxonomía y la ecología de varias especies (Stern, 1994; Stern y Foster, 1996; Stern *et al.*, 1997; Stern, 1998). La reconstrucción filogenética a partir de estas secuencias permitió también concluir que la morfología de las agallas de estas especies depende fundamentalmente de la influencia del pulgón y no de la planta. La morfología de las agallas de este grupo tiene una elevada correlación con la filogenia de los pulgones y no con la taxonomía de sus hospedadores. Los resultados de este trabajo mostraron además varios casos de especies de pulgones que han cambiado de hospedador pero siguen induciendo agallas similares a las de sus especies hermanas, y diferentes a las agallas de las especies que viven en su nuevo hospedador (Stern, 1995).

Posteriormente, se han empleado secuencias de DNA para la reconstrucción filogenética con el objetivo de estudiar diversos aspectos de la biología de los pulgones, como la radiación adaptativa del género *Uroleucon* (Moran *et al.*, 1999), el inquilinismo de agalla en el género *Tamalia* (Miller III y Crespi, 2003), la especiación alocrónica en especies del género *Pemphigus* (Abbot y Withgott, 2004), o la biogeografía de las especies de la tribu Hormaphidini (von Dohlen *et al.*, 2002), entre otros. Se han llevado a cabo, sin embargo, pocos estudios filogenéticos en niveles superiores al de tribu. Normark (2000) utilizó la secuencia del gen nuclear del factor de elongación de la traducción 1 α para realizar la inferencia filogenética en especies de la subfamilia Lachninae, con especial atención a la implicación de los resultados en la evolución de la alimentación de los pulgones. Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas sugirieron una posición basal en esta subfamilia para la tribu Eulachnini, aunque su apoyo estadístico no fue muy elevado. Las especies de esta tribu se alimentan principalmente sobre coníferas, por lo que

su posición basal apunta a la alimentación sobre este tipo de plantas para el ancestro de este grupo. El mismo marcador molecular fue utilizado por von Dohlen *et al.* (2006) para la reconstrucción filogenética y el estudio taxonómico en las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae. Las relaciones filogenéticas obtenidas fueron sorprendentes debido a que los representantes de la subfamilia Pterocommatinae agruparon con fuerte apoyo estadístico con una de las tribus de la subfamilia Aphidinae, la tribu Macrosiphini, quedando la tribu Aphidini en posición basal. Estas relaciones quedan en contradicción con la clasificación de Remaudière, Stroyan y Quednau (Remaudière y Stroyan, 1984; Remaudière y Quednau, 1988; Quednau y Remaudière, 1994), donde ambas subfamilias aparecen separadas (Aphidinae y Pterocommatinae). En otras clasificaciones, como la propuesta por Heie (1980), ambas subfamilias quedaban agrupadas en un único taxón (denominado familia Aphididae en la clasificación de este autor). No obstante, aún en estos casos, los taxónomos han asumido de forma general que las especies de la subfamilia Pterocommatinae eran basales en este grupo, debido a sus ciclos monoicos y a su asociación con plantas leñosas (von Dohlen *et al.*, 2006).

Durante la década de 1990 se emplearon también secuencias de DNA para la reconstrucción filogenética del género bacteriano *Buchnera*, endosimbionte primario de los pulgones. Munson *et al.* (1991a) obtuvieron las secuencias del gen que codifica el RNA ribosomal (rRNA) 16S de las bacterias de este género pertenecientes a especies de cuatro subfamilias de pulgones. El resultado del análisis filogenético de estas secuencias de *Buchnera* que se llevó a cabo en dicho trabajo, así como en algunos posteriores (Moran *et al.*, 1993; Moran *et al.*, 1994; Moran *et al.*, 1995), reveló una completa concordancia con la filogenia de los pulgones propuesta por Heie (figura 1.1) (1980). Este resultado condujo a los autores a proponer la existencia de una estricta coevolución y coespeciación entre ambos taxones, a partir de una única infección en el ancestro de los pulgones actuales. No obstante, el muestreo realizado en dicho estudio, en el que sólo se incluyeron representantes de las subfamilias Aphidinae, Chaitophorinae, Eriosomatinae y Mindarinae, fue muy escaso, impidiendo una comparación global de las filogenias de pulgones y endosimbiontes. Con posterioridad, otros autores han utilizado secuencias de

Buchnera para la reconstrucción filogenética de estos endosimbiontes, pero siempre con un muestreo de especies muy reducido y sesgado hacia especies de las subfamilias Aphidinae y Eriosomatinae, y, de manera destacable, sin representación de la subfamilia Lachninae (Rouhbakhsh *et al.*, 1996; van Ham *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 1998; Brynnel *et al.*, 1998; Baumann *et al.*, 1999; van Ham *et al.*, 1999; van Ham *et al.*, 2000). El bajo muestreo se ha debido, generalmente, a que la reconstrucción filogenética no era el objetivo principal de estos estudios, aunque las secuencias se emplearon también para obtener una filogenia. Los resultados, de nuevo, no discreparon con la propuesta morfológica para la filogenia de los pulgones de Heie, haciéndola válida de manera implícita y apoyando la hipótesis de la coespeciación.

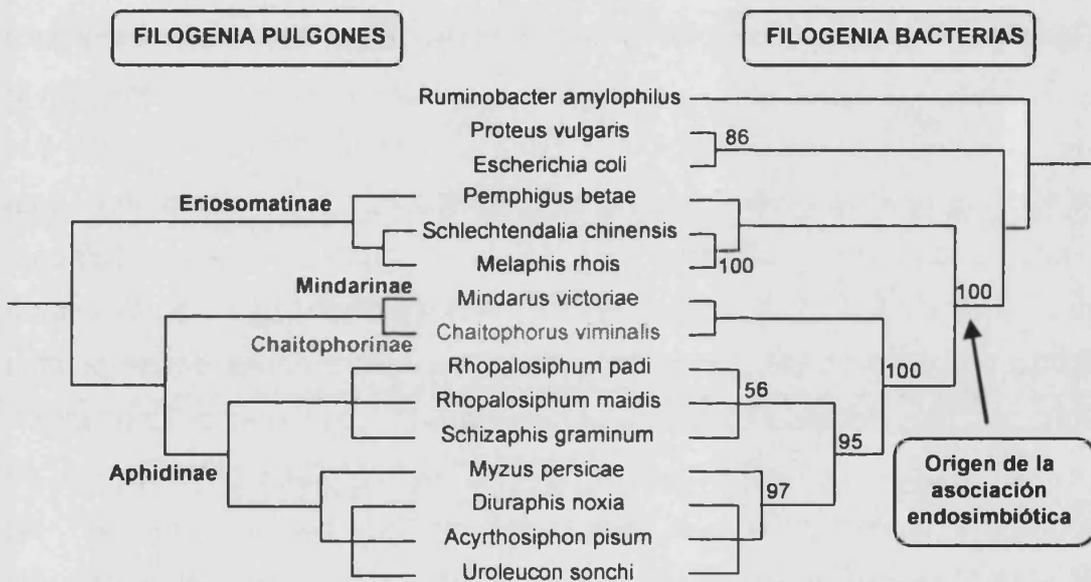


Figura 1.1. Filogenia de los pulgones utilizados por Moran *et al.* (1993) siguiendo las relaciones propuestas por Heie (1987), a la izquierda, y filogenia de sus respectivos endosimbiontes primarios a partir del gen del rRNA 16S, a la derecha. La figura muestra la concordancia entre ambas filogenias apoyando la coevolución de ambos organismos. Figura modificada a partir de Moran *et al.* (1993). Para la filogenia de los endosimbiontes, se muestran los valores de bootstrap mayores que 50% sobre los nodos correspondientes.

El primer trabajo que abordó el estudio de las relaciones filogenéticas globales en la familia Aphididae mediante la utilización de datos moleculares fue publicado por von Dohlen y Moran (2000). Estas autoras obtuvieron

secuencias parciales de los genes mitocondriales que codifican los rRNA 12S y 16S en un total de 34 especies de pulgones, representantes de 12 subfamilias. La conclusión más destacable de los resultados obtenidos tras la reconstrucción filogenética fue la elevada falta de estructura en los niveles más profundos de la filogenia, por encima del nivel taxonómico de tribu (figura 1.2). De las subfamilias de las que se analizaron varias tribus sólo Aphidinae y Lachninae se agruparon de manera monofilética y con valores elevados de bootstrap. Ni la subfamilia Eriosomatinae ni la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie (1980) (ver Introducción general, apartado 2.2) formaron grupos monofiléticos. Sin embargo, el apoyo a la monofilia de las tribus para las cuales se analizó más de una especie fue, en términos generales, elevado. Las relaciones entre las distintas tribus y subfamilias tampoco encontraron un apoyo estadístico notable a excepción de la relación entre las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae. Para explicar esta falta de estructura filogenética en los nodos profundos del árbol, von Dohlen y Moran plantearon la existencia de una rápida radiación adaptativa en el origen del grupo actual, que daría lugar a una aparición rápida de las subfamilias y tribus actuales. Esta radiación coincidiría con el cambio drástico en la composición de la afidofauna, mencionado por Heie, entre el Cretácico y el Terciario, que habría estado acoplado a una transición en la alimentación de los pulgones desde plantas gimnospermas a plantas angiospermas (Heie, 1987). La rapidez de la aparición de estos grupos sería la causa de la falta de un número adecuado de sustituciones nucleotídicas que permitieran, en la actualidad, resolver las relaciones filogenéticas entre ellos. A pesar de la falta de resolución, von Dohlen y Moran concluyeron que la topología obtenida a partir de las secuencias mitocondriales utilizadas sugería la existencia de 7 orígenes independientes de la alternancia de hospedador durante la evolución de la familia Aphididae, en los siguientes grupos: Aphidinae, Pemphigini, Fordini, Eriosomatini, Anoeciinae, Cerataphidini y Hormaphidini+Nipponaphidini.

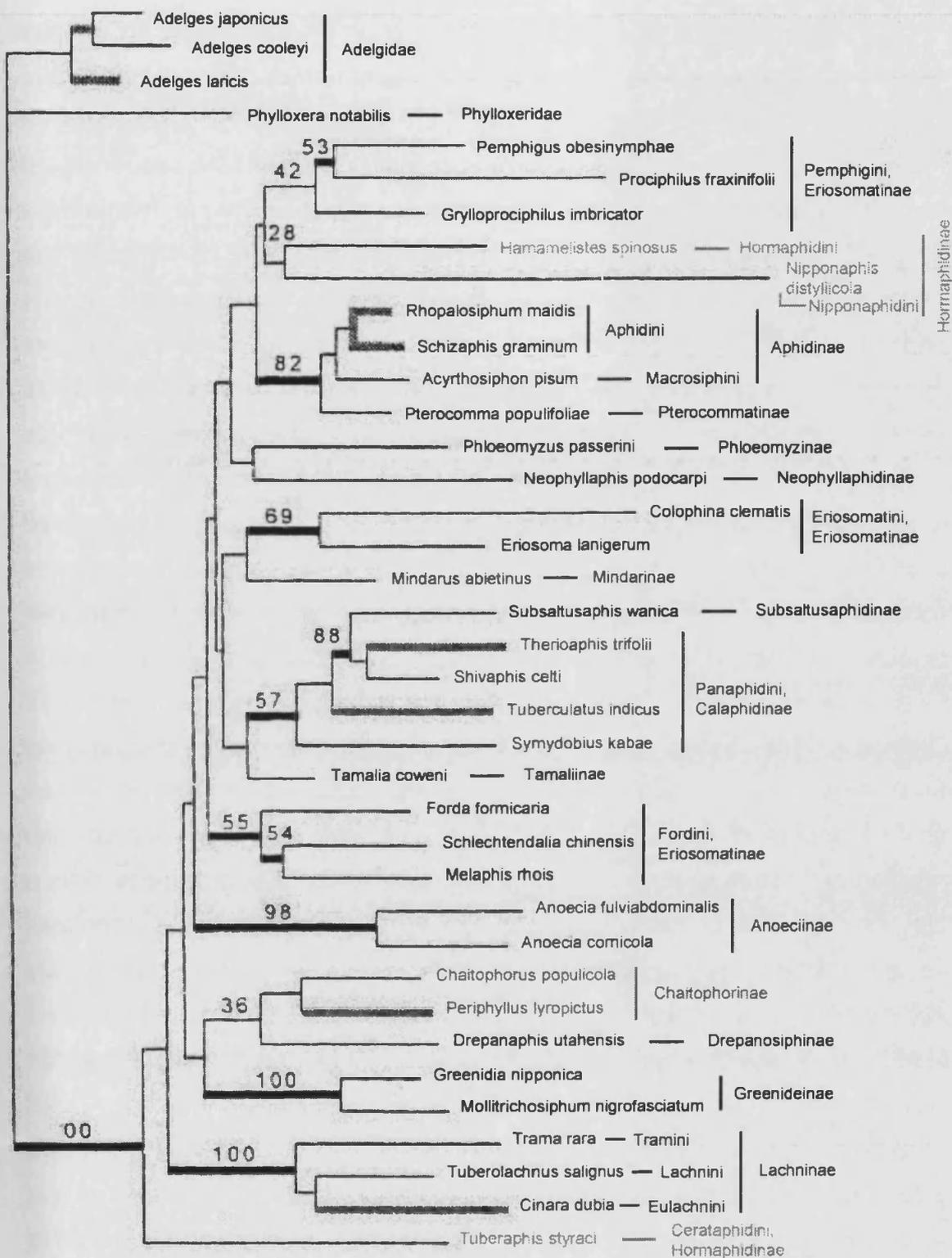


Figura 1.2. Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir de las secuencias de los genes de los rRNA mitocondriales 12S y 16S. Modificado a partir de von Dohlen y Moran, 2000. Se muestran sobre las ramas algunos de los valores de bootstrap obtenidos. Las especies pertenecientes a grupos que se han analizado en el presente estudio aparecen resaltadas con el código de color indicado en la tabla 1.

Martínez-Torres *et al.* (2001) obtuvieron resultados similares en algunos aspectos utilizando otra secuencia mitocondrial, la correspondiente al gen que codifica la subunidad 6 de la ATPasa-F. El estudio abordó en paralelo la reconstrucción de la filogenia de la familia Aphididae con esta secuencia así como la correspondiente a su endosimbionte primario, *Buchnera*, mediante la secuenciación de los genes que codifican la subunidad β de la ATPasa-F y el rRNA 16S. Las tres secuencias se obtuvieron para especies de pulgones pertenecientes a 8 subfamilias distintas, así como para los correspondientes endosimbiontes primarios. Las reconstrucciones obtenidas, tanto a partir de las secuencias de los pulgones como de las correspondientes a los endosimbiontes, mostraron de nuevo una elevada falta de resolución para los nodos más profundos del árbol filogenético. Aquellas tribus para las cuales se analizó más de una especie formaron en general grupos monofiléticos apoyados por valores elevados de bootstrap, pero por encima de este nivel taxonómico sólo se recuperó la monofilia de las subfamilias Aphidinae y Lachninae (figura 1.3). De nuevo, la subfamilia Eriosomatinae y la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie (1980) mostraron disposiciones no monofiléticas en las topologías. La falta de resolución en los nodos más profundos impedía una comparación exhaustiva de las reconstrucciones obtenidas con las relaciones propuestas en las topologías basadas en datos morfológicos. Pese a ello, los resultados contradecían algunas de las relaciones más aceptadas entre subfamilias de pulgones. En particular, la relación entre las subfamilias Aphidinae, Pterocommatinae y Lachninae, presente en las filogenias de Heie (1987) y Wojciechowski (1992) (ver figura 1.8), no aparecía en las reconstrucciones basadas en datos moleculares obtenidas por Martínez-Torres *et al.* (2001). De hecho, las posiciones filogenéticas de la subfamilia Lachninae y del clado formado por las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae eran muy alejadas. La subfamilia Lachninae mostró, además, una tendencia a ocupar la posición basal en las distintas reconstrucciones filogenéticas. Esta posición llegó a tener un apoyo de 91% de bootstrap en la reconstrucción obtenida a partir de las secuencias aminoacídicas inferidas de la subunidad β de la ATPASA-F de *Buchnera*. La relación entre estas tres subfamilias no había sido cuestionada hasta ese momento, sino que había sido comúnmente aceptada

en los estudios realizados con este tipo de insectos (ver por ejemplo Normark, 2000). Los resultados obtenidos por von Dohlen y Moran (2000) tampoco mostraron una estrecha relación entre estas tres subfamilias, aunque las autoras no discutieron este aspecto. En algunas de las reconstrucciones obtenidas en su estudio, la subfamilia Lachninae ocupaba una posición cercana a la base del árbol filogenético, agrupándose justo después de la especie *Tuberaphis styraci* (subfamilia Hormaphidinae), aunque esta posición no estaba apoyada por valores elevados de bootstrap (figura 1.2). Es destacable que, posteriormente, otros trabajos han mostrado reconstrucciones filogenéticas a partir de genes de *Buchnera* en las que la subfamilia Lachninae ha estado representada y ha ocupado en varias ocasiones también la posición basal (Moya *et al.*, 2002; Fares *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2002; Fares *et al.*, 2005), aunque esta circunstancia no fue tampoco discutida por los autores. Por otro lado, a pesar de la falta de resolución mostrada en las reconstrucciones del estudio de Martínez-Torres *et al.* (2001), no existían grandes discrepancias entre las relaciones filogenéticas obtenidas para los pulgones y para sus respectivos endosimbiontes. Por tanto, el trabajo apoyó, con un mejor muestreo respecto al estudio de Munson *et al.* (1991a), la hipótesis de la coevolución entre estos insectos y sus endosimbiontes primarios.

Es importante destacar que los dos únicos estudios realizados hasta la fecha sobre las relaciones filogenéticas globales en la familia Aphididae basados en secuencias de DNA utilizaron secuencias de genes mitocondriales. Este tipo de secuencias, de evolución generalmente rápida y con posibilidad de saturación para taxones alejados, pueden no ser ideales para la inferencia filogenética de nodos tan antiguos como los que relacionan las subfamilias de pulgones.

Filogenia molecular de Aphididae

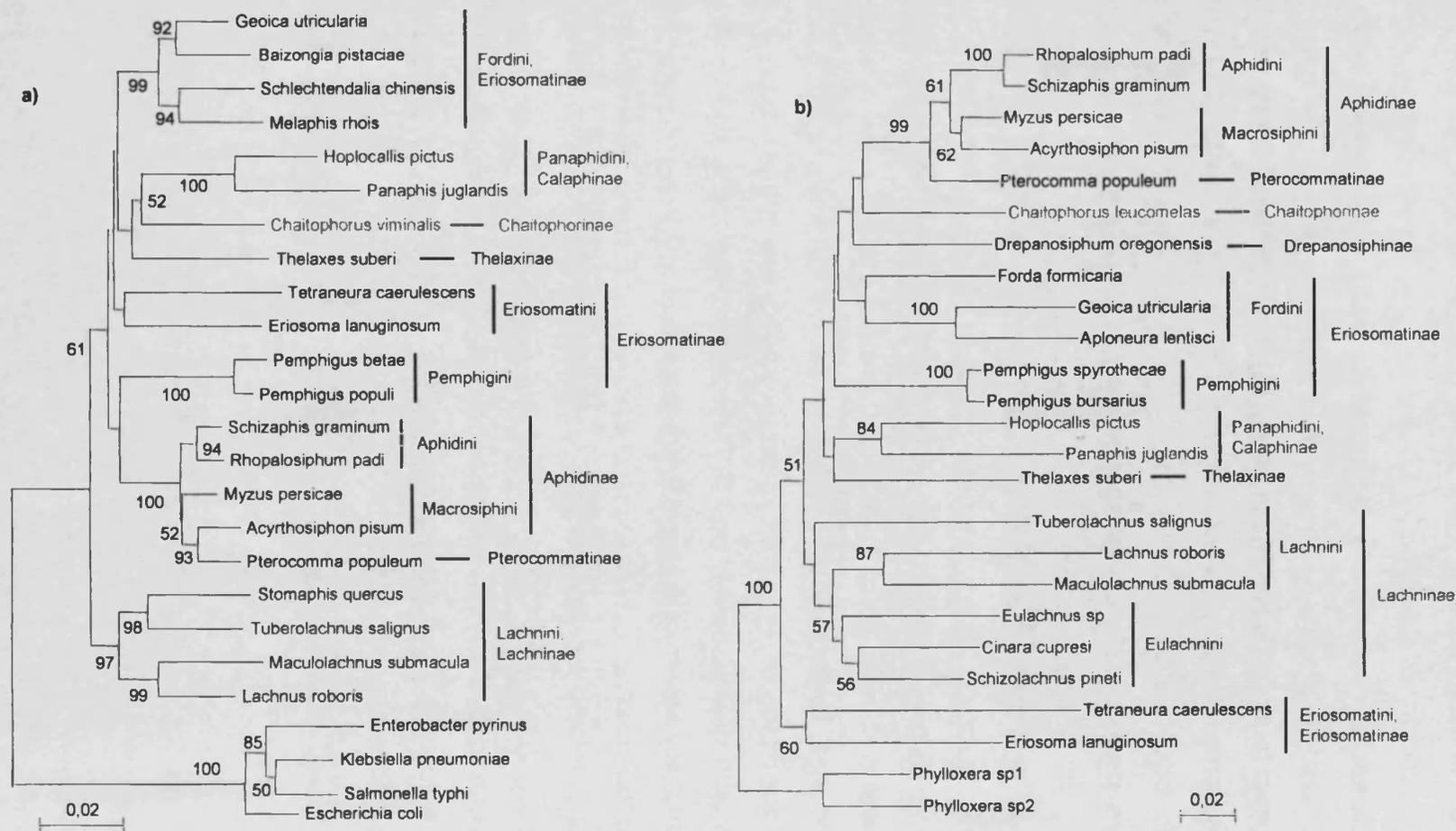


Figura 1.3. a) Árbol obtenido mediante neighbor-joining a partir de las distancias corregidas mediante Tamura-Nei del gen que codifica el rRNA 16S en *Buchnera*. **b)** Árbol obtenido mediante neighbor-joining a partir de los sitios no sinónimos del gen de la subunidad 6 de la ATPasa-F mitocondrial de pulgones. Figuras modificadas a partir de Martínez-Torres *et al.* (2001). Se muestran junto a las ramas los valores de bootstrap mayores que 50%.

2. Objetivos

En este capítulo se han empleado datos moleculares de secuencia para la consecución de los siguientes objetivos:

1. Obtener un árbol filogenético para la familia Aphididae mediante la obtención de de secuencias de DNA de especies representantes de 11 subfamilias de pulgones.
2. Comparar los resultados filogenéticos obtenidos con las hipótesis filogenéticas previas (basadas en datos morfológicos o moleculares) para la familia Aphididae.
3. Analizar las implicaciones de los resultados obtenidos en distintos aspectos de la biología de los pulgones, en particular: la evolución de sus ciclos biológicos, la evolución de su alimentación y la hipótesis de la coevolución entre los pulgones y sus endosimbiontes primarios.

3. Material y métodos

3.1. Especies analizadas

La tabla 1.1 muestra las especies de pulgones utilizadas en la reconstrucción filogenética molecular de la familia Aphididae. Las subfamilias estudiadas se eligieron fundamentalmente por la posibilidad de su recolección en España y más particularmente en la Comunidad Valenciana. Las subfamilias más numerosas de pulgones se hayan representadas en esta zona geográfica, así como algunas con menor diversidad. La mayoría de especies de pulgones fueron identificadas por el Dr. José Manuel Michelena Saval, de la Universidad de Valencia. Para facilitar la visualización de los árboles obtenidos en las reconstrucciones se ha escogido un código de colores, con un color diferente para cada subfamilia, el cual puede observarse en los nombres de las especies que aparecen en la tabla 1.1. Junto a cada especie analizada, se indica en la tabla las secuencias que se obtuvieron para la misma, bien mediante amplificación por PCR y secuenciación, bien a partir de bases de datos. Para cada una de estas secuencias se indica el código de acceso correspondiente en la base de datos del European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk).

3.2. Secuencias utilizadas

a) Genes nucleares

Las secuencias nucleares elegidas para realizar la inferencia de las relaciones filogenéticas entre las especies de la familia Aphididae fueron el gen que codifica la opsina sensible a longitud de onda larga (*lwrh*) y el gen que codifica el factor de elongación de la traducción 1 α (*ef1 α*). Ambas secuencias se han empleado anteriormente en estudios filogenéticos, demostrando su utilidad en este campo. La secuencia del gen *lwrh* ha sido utilizada para la reconstrucción filogenética entre especies de abejas de la subfamilia Apinae (Mardulyn y Cameron, 1999) y especies de mariposas del género *Heliconius* (Hsu *et al.*, 2001). La variabilidad genética observada para este gen en estos estudios sugiere que la secuencia puede tener una gran utilidad a varios niveles de profundidad filogenética.

Tabla 1.1. Especies de pulgones analizadas en este estudio clasificadas según Remaudière, Stroyan y Quednau (1984; 1988; 1994) y secuencias obtenidas junto con sus respectivos códigos de acceso en la base de datos del EMBL.

Subfamilia	Tribu	Especie	Genes			
			<i>lwrh</i>	<i>ef1α</i>	<i>atp6</i>	<i>coll</i>
Anoeciinae		<i>Anoecia sp.</i>	AJ539463	FM174706	AJ547789	-
Aphidinae	Aphidini	<i>Aphis fabae</i>	-	AY219724 ⁷	-	AM085434 ¹⁰
		<i>Aphis nerii</i>	-	FM174700	FM174676	AM085436 ¹⁰
		<i>Aphis spiraecola</i>	FM177115	-	-	AM085435 ¹⁰
		<i>Melanaphis luzuella</i>	-	-	-	AM085392 ¹⁰
		<i>Rhopalosiphum padi</i>	FM177114	FM174699	AJ298673 ⁴	U36749 ¹⁶
		<i>Schizaphis graminum</i>	-	AY219720 ⁷	-	AF059698 ²
		Macrosiphini	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	AJ489281	FM174698	AJ298675 ⁴
	<i>Hyperomyzus lactucae</i>		-	-	-	AM085391 ¹⁰
	<i>Macrosiphoniella ludoviciana</i>		-	-	-	AF059696 ²
	<i>Megoura viciae</i>		AF189714 ¹²	FM174696	FM174677	-
	<i>Myzus persicae</i>		AJ489282	FM174697	AJ298674 ⁴	AF143582 ¹⁸
	<i>Sitobion avenae</i>		-	DQ005155 ¹¹	-	U41116 ¹⁷
	<i>Uroleucon ambrosiae</i>		-	-	-	AF196376 ¹⁵

Filogenia molecular de Aphididae

Calaphidinae	Panaphidini	<i>Chromaphis juglandicola</i>	FM177105	FM174691	FM174678	-
		<i>Hoplocallis pictus</i>	AJ539466	FM174693	AJ298668 ⁴	-
		<i>Panaphis juglandis</i>	FM177106	FM174692	AJ298669 ⁴	-
		<i>Tinocallis takachihoensis</i>	AJ489286	FM174694	AJ547792	-
Chaitophorinae	Chaitophorini	<i>Chaitophorus leucomelas</i>	FM177104	FM174705	AJ298670 ⁴	AF444288 ⁸
		<i>Peryphillus bulgaricus</i>	AJ489285	FM174704	AJ547791	AF444290 ^{8,a}
Drepanosiphinae		<i>Drepanosiphum oregonensis</i>	AJ489284	FM174695	AJ298671 ⁴	-
Eriosomatinae	Eriosomatini	<i>Eriosoma lanuginosum</i>	AJ539464	FM174709	AJ298665 ⁴	-
		<i>Tetraneura caerulescens</i>	AJ489291	FM174689	AJ298666 ⁴	-
	Fordini	<i>Aploneura lentisci</i>	AJ489289	FM163601	AJ298663 ⁴	AY227092 ⁹
		<i>Baizongia pistaciae</i>	AJ489290	FM163599	AJ547790	AY227093 ⁹
		<i>Forda marginata</i>	FM177108	FM163596	AM996893	AY227098 ⁹
		<i>Geoica utricularia</i>	FM177110	FM163600	AJ298662 ⁴	AY227094 ^{8,b}
		<i>Melaphis rhois</i>	-	-	-	U36747 ⁵
		<i>Nurudea shiraii</i>	-	-	-	AF454627 ⁵
		<i>Paracletus cimiciformis</i>	FM177109	FM163597	AM996884	AY227102 ⁹
		<i>Schlechtendalia chinensis</i>	-	-	-	AF454628 ⁵
		<i>Slavum wertheimae</i>	-	-	-	AY227103 ⁹
		<i>Smynthuroides betae</i>	FM177111	FM163598	AM996898	AY227104 ⁹
	Pemphigini	<i>Pemphigus populi</i>	AJ489288	FM163603	AJ547793	L27337 ^{1,c}
		<i>Thecabius sp.</i>	FM177112	FM163602	AM996899	AY182307 ^{8,d}

Hormaphidinae	Cerataphidini	<i>Cerataphis</i> sp.	AJ539465	FM174690	FM174679	L27327 ^{14,e}	
		<i>Ceratoglyphina bambusae</i>	-	-	-	L27327 ¹⁴	
		<i>Ceratovacuna japonica</i>	-	-	-	L27328 ¹⁴	
		<i>Glyphinaphis bambusae</i>	-	-	-	L27331 ¹	
		<i>Pseudoregma alexanderi</i>	-	-	-	L27335 ¹⁴	
	Hormaphidini	<i>Hamamelistes betulinus</i>	-	AF454597 ⁵	-	AF328782 ⁵	
		<i>Hormaphis betulae</i>	-	AF454611 ⁵	-	AF454623 ⁵	
	Nipponaphidini	<i>Metanipponaphis rotunda</i>	-	-	-	AF454624 ⁵	
		<i>Neothoracaphis yanonis</i>	-	-	-	L27334 ¹⁴	
		<i>Nipponaphis distyllicola</i>	-	AF454614 ⁵	-	L27333 ⁵	
		<i>Sinonipponaphis monzeni</i>	-	AF454615 ⁵	-	-	
	Lachninae	Eulachnini	<i>Cinara cedri</i>		FM174683		
			<i>Cinara tujafilina</i>	AJ489294	FM174684	AJ298680 ^{4,f}	AF156196 ^{3,g}
			<i>Essigella fusca</i>	-	AF163866 ³	-	AF156190 ³
			<i>Eulachnus rileyi</i>	AJ489292	FM174708	AJ298681 ^{4,h}	AF156191 ³
<i>Schizolachnus pineti</i>			-	-	AJ298678 ⁴	-	

Lachninae	Lachnini	<i>Lachnus roboris</i>	AJ489293	FM174686	AJ298682 ⁴	AF156198 ^{3,j}	
		<i>Maculolachnus submacula</i>	FM177103	FM174688	AJ298677 ⁴	AF156200 ³	
		<i>Nippolachnus piri</i>	-	AF147811 ³	-	AF156204 ³	
		<i>Pterochloroides persicae</i>	FM177102	FM174687	FM174680	-	
		<i>Stomaphis quercus</i>	-	AF163883 ³	-	AF156216 ³	
		<i>Tuberculachnus salignus</i>	FM177113	FM174685	AJ298679 ⁴	-	
	Tramini	<i>Protrama flavescens</i>	-	AF147814 ³	-	AF156206 ³	
		<i>Trama rara</i>	-	AF147820 ³	-	AF156220 ³	
	Mindarinae		<i>Mindarus abietinus</i>	FM177107	FM174703	FM174681	-
	Pterocommatinae		<i>Pterocomma pilosum</i>	AJ489283	FM174701	AJ298672 ^{4,j}	DQ005183 ^{12,k}
Thelaxinae		<i>Thelaxes suberi</i>	AJ489287	FM174702	AJ298667 ⁴	-	
Familia Phylloxeridae (outgroup)		<i>Daktulosphaira vitifoliae</i>	AJ489295	FM174707	AJ298683 ¹³	DQ021446 ¹³	

Los números en superíndice junto a los códigos de acceso indican la referencia bibliográfica original de aquellas secuencias que no fueron obtenidas en este estudio: 1) Stern, 1994; 2) Moran *et al.*, 1999; 3) Normark, 2000; 4) Martínez-Torres *et al.*, 2001; 5) von Dohlen *et al.*, 2002; 6) Shingleton y Stern, 2003; 7) von Dohlen y Teulon, 2003; 8) Abbot y Withgott, 2004; 9) Inbar *et al.*, 2004; 10) Coeur d'acier *et al.*, 2006; 11) von Dohlen *et al.*, 2006; 12) Gao *et al.*, 2000; 13) Baumann y Baumann, 2005; 14) Stern *et al.*, 1997; 15) Funk *et al.*, 2000; 16) Rouhbakhsh *et al.*, 1996; 17) Sunnuncks y Hales, 1996; 18) Clements *et al.*, 2000. Para algunas secuencias de los genes *ef1a* y *coll* la especie utilizada fue diferente a la indicada (aunque perteneciente al mismo género): a) *P. obscurus*, b) *Geoica sp.*, c) *P. microsetosus*, d) *T. populi-monilis*, e) *C. bambusifoliae*, f) *C. cupresi*, g) *C. pinea*, h) *Eulachnus sp.*, i) *L. shiicola*, j) *P. populeum*, k) *P. populifoliae*.

La secuencia del gen *ef1a* presenta un extraordinario nivel de conservación, habiendo sido utilizada incluso para realizar la reconstrucción del árbol de la vida (Baldauf *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 1999). Esta característica hace de este gen un buen candidato para la resolución de los nodos más profundos de la filogenia de la familia Aphididae. Por otro lado, esta secuencia se ha utilizado, con anterioridad a este trabajo, en varios estudios para la reconstrucción filogenética en diversos grupos de pulgones, por lo que se halla disponible para un notable número de especies, representativas de varias subfamilias y tribus. Mientras que varias de las secuencias del gen *ef1a* se han obtenido a través de la base de datos del European Bioinformatics Institute (ver tabla 1.1), la totalidad de las secuencias del gen *lwrh* se obtuvieron expresamente para el presente trabajo.

b) Genes mitocondriales

Además de los genes nucleares mencionados, se emplearon en este estudio las secuencias de dos genes pertenecientes al genoma mitocondrial de pulgones. Las secuencias elegidas fueron los genes que codifican la subunidad 6 de la ATPasa-F (*atp6*) y la subunidad II de la citocromo oxidasa (*colI*). El primero de ellos fue anteriormente utilizado por Martínez-Torres *et al.* (2001) para la inferencia filogenética en la familia Aphididae, aportando, pese a una falta de resolución en los niveles profundos, algunos avances en el conocimiento de esta filogenia (ver apartado 1 de este capítulo). En el presente estudio se ha ampliado el número de especies de las cuales se ha obtenido la secuencias de este gen respecto al trabajo de Martínez-Torres *et al.* (2001).

A diferencia de los 3 genes anteriores, el empleo en esta tesis doctoral del gen *colI* supone únicamente la recopilación de la secuencia obtenida, en anteriores estudios, a partir de especies de pulgones pertenecientes a varias subfamilias y tribus, que representan en conjunto un muestreo considerable de los diferentes taxones que forman la familia Aphididae. Las secuencias se obtuvieron, de nuevo, a través de la base de datos del European Bioinformatics Institute.

3.3. Obtención de las secuencias

a) Extracción de DNA y RNA

Para la mayoría de extracciones de DNA se siguió el protocolo descrito por Martínez *et al.* (1992), que a su vez supone una modificación del empleado por Latorre *et al.* (1986). Las extracciones se realizaron generalmente sobre un único individuo, con el fin de acotar a dos el número máximo de secuencias distintas que se podían obtener a partir de cada especie. Sin embargo, en aquellas ocasiones en las que los individuos de la especie eran de muy pequeño tamaño, o cuando provenían de material almacenado durante mucho tiempo, se utilizaron varios individuos.

Los individuos utilizados en las extracciones provenían en su mayoría de material almacenado en etanol al 96%. El tiempo de almacenamiento fue variable, desde pocos días a varios años. En algunas ocasiones las extracciones se realizaron a partir de individuos recién capturados. Los individuos se depositaban primero en tubos Eppendorf de 1'5 ml con 160 µl de solución I (Tris 10 mM, NaCl 60 mM, sacarosa 5%, EDTA 10 mM, pH 7'8) y se homogeneizaban con una varilla de vidrio esterilizada mediante autoclave (20 min., 120°C). A continuación se añadían 200 µl de solución II (Tris 300 mM, SDS 1'25%, sacarosa 5%, EDTA 10 mM, pH 8'0) y se incubaba la mezcla durante 30 min. a 65°C en un bloque seco. Tras ello, se añadían 60 µl de acetato potásico 5 M y se incubaba durante 20 min. a -20°C. El siguiente paso consistía en una centrifugación de 15 min. en una centrífuga de mesa a 14000 rpm., que tenía por objetivo la separación de un sobrenadante con el DNA disuelto, que era recuperado, y un residuo sólido con restos celulares. A continuación, el DNA se precipitaba mediante la adición de 400 µl de isopropanol, una incubación a temperatura ambiente durante 5 min. y una centrifugación de otros 5 min. a 14000 rpm. El sobrenadante resultante de la centrifugación se eliminaba dejando un residuo sólido que se lavaba con 500 µl de etanol al 70% y una nueva centrifugación de 2 min. Tras ello, se eliminaba el etanol, se secaba al vacío y se disolvía el residuo sólido en 50 µl de tampón LTE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0'1 mM, pH 8) para su posterior uso. Algunas de

las extracciones de DNA se realizaron con el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con el objetivo de obtener información sobre los sitios de procesamiento de los intrones de los genes nucleares se realizaron extracciones de RNA total a partir de individuos de algunas especies. Los individuos empleados en las extracciones provenían de material fresco o almacenado a -80°C . La extracción de RNA se llevó a cabo con el kit Ultraspec II (Biotecx), siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del RNA total se obtuvieron los cDNAs correspondientes mediante retrotranscripción. Para cada reacción se añadieron $3\ \mu\text{l}$ del RNA total obtenido, $1\ \mu\text{l}$ de cebador oligoT (de una disolución $50\ \mu\text{M}$), $1\ \mu\text{l}$ de una disolución 10mM de cada dNTP y $8\ \mu\text{l}$ de agua miliQ. Esta mezcla se calentó primero a 65°C durante 5 min. Posteriormente, se utilizó el SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* High Fidelity (Invitrogen) para la reacción de retrotranscripción. Se añadió a la reacción $4\ \mu\text{l}$ de tampón First-Strand 5X, $1\ \mu\text{l}$ de DTT 0.1M , $1\ \mu\text{l}$ de inhibidor de RNAsas RNaseOUT (de una disolución $40\ \text{u}/\mu\text{l}$) y $1\ \mu\text{l}$ de una disolución $200\ \text{u}/\mu\text{l}$ de transcriptasa reversa. La mezcla se incubó a 50°C durante 45 min., tras lo cual se calentó durante 15 min. a 70°C para la inactivación de los enzimas. Posteriormente, se emplearon $3\ \mu\text{l}$ de esta reacción para reacciones de PCR utilizando cebadores específicos para los genes *lwrh* y *ef1 α* (ver apartado 3.3.b). Las secuencias de cDNA obtenidas se utilizaron en los primeros alineamientos de las secuencias de ambos genes para determinar los límites de los diferentes exones e intrones.

b) Amplificación de los fragmentos génicos

Gen de la opsina sensible a longitud de onda larga

Con anterioridad al comienzo de este trabajo, sólo se conocía la secuencia de cDNA del gen *lwrh* de una especie de pulgón, *Megoura viciae*, perteneciente a la subfamilia Aphidinae (Gao *et al.*, 2000). El diseño de los cebadores iniciales para la amplificación de la secuencia de este gen en otras especies de pulgones se realizó a partir del alineamiento de la secuencia de aminoácidos en especies de insectos pertenecientes a otros órdenes, junto a la correspondiente a *M. viciae*. Como resultado, se diseñaron los cebadores.

directos OPSF1, OPSF2 y OPSF3, y los reversos OPSR1 y OPSR2 (tabla 1.2). El uso de estos cebadores permitió la amplificación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la mayor parte del gen en las especies *Acyrtosiphon pisum*, *Baizongia pistaciae* y *Cinara tujafilina*, pertenecientes a tres subfamilias distintas de pulgones (Aphidinae, Eriosomatinae y Lachninae, respectivamente). El alineamiento de las secuencias aminoácidas inferidas para estas tres especies y la correspondiente a *M. viciae* permitió el diseño de nuevos cebadores específicos para la amplificación de este gen en la familia Aphididae. Los nuevos cebadores directos se denominaron OPSAFF1, OPSAFF2 y OPSAFF3, y los reversos OPSAFR1 y OPSAFR2 (ver tabla 1.2).

El gen *lwrh* no presenta un nivel de conservación muy elevado, y aún con la creación de estos cebadores específicos la amplificación del gen fracasó en varias ocasiones. Por ello, tras la amplificación de la secuencia en varias especies, y teniendo en cuenta algunos resultados filogenéticos preliminares, se procedió al diseño de cebadores específicos de grupos dentro de la familia Aphididae. En particular, para la amplificación de la secuencia en especies de la subfamilia Lachninae se diseñaron los cebadores OPSLF1, OPSLF2, OPSLR1 y OPSLR2, así como dos cebadores internos para la secuenciación directa de productos de PCR: OPSLF3 y OPSLR3. Para el grupo de las subfamilias Aphidinae, Calaphidinae, Chaitophorinae y Drepanosiphinae se crearon los cebadores OPSADF1, OPSADF2, OPSADR1 y OPSADR2, y los internos OPSADF3 y OPSADR3 para la secuenciación. Finalmente, para el grupo de las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae, Hormaphidinae, Mindarinae y Thelaxinae se diseñaron para PCR los cebadores OPSETF1, OPSETF2, OPSETR1 y OPSETR2, así como los internos para complementar en la secuenciación OPSETF3 y OPSETR3 (tabla 1.2).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µl en tubos Eppendorf de 0'2 ml y en un termociclador ABI PCR System 9700 (Applied Biosystems). Las reacciones se componían de 1-3 µl de la extracción de DNA, 5 µl de tampón de PCR 10X, 1 µl de una disolución con cada dNTP (Eppendorf) a 10 mM, 1-6 µl de cada cebador (de una disolución 10 µM), y 1'5 unidades de polimerasa *Taq* (Eppendorf). La variación en el volumen de DNA

dependía de la cantidad de éste presente en la extracción, estimada tras la electroforesis de 5 µl en un gel de agarosa al 0'8%. La variación en el volumen utilizado de las soluciones de cebadores dependía del número de indeterminaciones presentes en éstos. Para aquellos cebadores con un mayor número de indeterminaciones en la secuencia se emplearon hasta 6 µl de la disolución, mientras que sólo se usó 1 µl cuando el cebador carecía de indeterminaciones. En todos los casos, se utilizó el volumen necesario de agua milliQ para completar el volumen de 50 µl de la reacción.

El alto número de indeterminaciones presentes en varios de los cebadores hizo necesarias dos PCR consecutivas para la amplificación de la mayoría de secuencias obtenidas para el gen *lwrh*. Las condiciones de las reacciones primarias fueron las siguientes: un primer paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 94°C; 35-40 ciclos de 30 s a 94°C, 60 s a 48-55°C, 90 s a 68°C.; y un paso de extensión final de 7 min. a 68°C. La temperatura de hibridación varió en función del número de indeterminaciones de los cebadores usados y de la aparición de amplificadas inespecíficos. Para la PCR secundaria, anidada sobre la primera, las condiciones de reacción fueron idénticas salvo por el aumento, en general, de dos grados en la temperatura de hibridación respecto a la PCR primaria correspondiente.

Gen del factor de elongación 1α

El alto grado de conservación del gen *ef1α* permitió la amplificación de su secuencia en las especies de pulgones utilizadas mediante sólo dos parejas de cebadores (tabla 1.2). Los cebadores empleados en las PCR primarias fueron *efs175*, cebador previamente diseñado y utilizado para la amplificación del gen en especies de pulgones del género *Uroleucon* (Moran *et al.*, 1999), y *efr1*, cebador diseñado en el presente estudio a partir del alineamiento de las secuencias de este gen obtenidas en trabajos previos para especies de la subfamilia Hormaphidinae (von Dohlen *et al.*, 2002), Lachninae (Normark, 2000) y el género *Uroleucon* (Moran *et al.*, 1999).

Tabla 1.2. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes analizados en este estudio^a.

Nombre	Uso	Secuencia
Gen <i>lwrh</i>		
OPSF1	PCR1	5' GGTAYCARTTYCCNCCNATGAAYCC 3'
OPSF2	PCR2	5' TTYCCNCCNATGAAYCCNNTNTGG 3'
OPSR1	PCR1	5' ATNCCRTANACDATNGGRTT 3'
OPSR2	PCR2	5' CCRTANACDATNGGRTRTANACNGC 3'
OPSAFF1	PCR1	5' ATGAAYCCNMTNTGGTAYAARTGG 3'
OPSAFF2	PCR2/sec	5' CCNMTNTGGTAYAARTGGYTNGG 3'
OPSAFF3	sec	5' TGGTAYAARTGGYTNGGNGTNAC 3'
OPSAFF4	PCR2/sec	5' TCNGCNAAACCNATGACAAC 3'
OPSAFR1	PCR1	5' GGRTGNSWDATNCCRTANACDATNGG 3'
OPSAFR2	PCR2/sec	5' GCYTTNGCRAANACNGANCCCCA 3'
OPSLF1	PCR1	5' GSGTYACNATTTTCTYYTTGGG 3'
OPSLF2	PCR2/sec	5' GTACAAAAAYCTGAGAACACCTTC 3'
OPSLF3	sec	5' GCATATTATTTYATTGTGAAGGC 3'
OPSLR1	PCR1	5' GCRAANACNGANCCCCAGATTG 3'
OPSLR2	PCR2/sec	5' ARTAATTGAAATATTCCAGCCC 3'
OPSLR3	sec	5' TTGTCATGGTTTTGCAGATAATCCC 3'
OPSETF1	PCR1	5' GGYRTYACNATTTTTYTTCTTRGG 3'
OPSETF2	PCR2/sec	5' ATGTGYCCRCRATGGTNTGGA 3'
OPSETF3	sec	5' TATGTACCRGARGCRAAYATGAC 3'
OPSETR1	PCR1	5' GANCCCCADATYGTNAATAAYGG 3'
OPSETR2	PCR2/sec	5' GGWGTCCANGCCATRAACCA 3'
OPSETR3	sec	5' ATRAANACCATYGTCCATAT 3'
OPSADF1	PCR1	5' GGYGYWACYATTTTCTKCTTGGG 3'
OPSADF2	PCR2/sec	5' TGGTGATWTAYATATTTACCTGTAC 3'
OPSADF3	sec	5' CCAGAAGCAAATATGACNGCMTGTGG 3'
OPSADR1	PCR1	5' GANCCCCAGATNGTAWATAATGG 3'
OPSADR2	PCR2/sec	5' AATWGTCAATAAGCYACYTTAGC 3'
OPSADR3	sec	5' TTKGTTGTCATWGGTTTTGC 3'
Gen <i>ef1a</i>		
efs175 ¹	PCR1	5' GGAAATGGGAAAAGGCTCCTTYAAGTAYGCYTGGG 3'
efs1	PCR2	5' TGGACAAAYTKAAGGCTGAACG 3'
efs2	PCR2/sec	5' AAGGCTGAACGTGAACGTGGTATCAC 3'
efs3	sec	5' ATHGGAGGTATTGGAACAGT 3'
efs4	sec	5' ATCTCNGGATGGAAYGG 3'
efr1	PCR1	5' GTGTGGCAATSCAANACNGGAGT 3'
efr2	PCR2/sec	5' TTGGAAATTTGACCNGGGTGRRT 3'
efr3	sec	5' GRTASCCRTTGAAATTTGACC 3'
efr4	sec	5' ATTTGACCNGGGTGRRTCAATAC 3'
efr5	sec	5' ATCATGTTYTTRATGAAATCTCT 3'
efr6	sec	5' ACTGTTCCAATACCTCC 3'
Fragmento mitocondrial		
CO2AF ²	PCR1	5' AATCAYAGWTTTATRCCWATTCA 3'
tRNALysAF2 ²	PCR2/sec	5' GACTGAAAAGCAAAGTAATGATCTCT 3'
CO3WWRD ²	PCR1,2/sec	5' ATCWCGAATWACATCWCGTCATCA 3'

^aSe indica el uso concreto de cada cebador: PCR1, PCR primaria; PCR2, PCR secundaria; sec, empleado en la secuenciación. Algunos de los cebadores se obtuvieron a partir de estudios anteriores: 1) Moran *et al.*, 1999; 2) Martínez-Torres *et al.*, 2001.

Dado el alto grado de conservación del gen y, por consiguiente, la alta especificidad de los cebadores, un gran número de secuencias de *ef1α* de especies de pulgones pudieron amplificarse mediante una única PCR. Para aquellos casos en los que esto no ocurrió, se utilizaron los cebadores anidados *efs1* y *efr2* en PCR secundarias. Se diseñaron además varios cebadores para la secuenciación directa de los productos de PCR (ver tabla 1.2).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de manera similar a las reacciones descritas anteriormente para el gen *lwrh*. El volumen empleado de las disoluciones de los cebadores fue de 1-3 µl en función del número de indeterminaciones presentes en sus secuencias. La temperatura de hibridación varió entre 52 y 55°C dependiendo de los cebadores utilizados y del número de fragmentos que aparecían en las amplificaciones. En las ocasiones en las que fue necesario realizar una PCR secundaria, ésta se llevó a cabo por lo general con una temperatura de hibridación 2°C superior a su correspondiente PCR primaria.

Gen de la subunidad 6 de la ATPasa-F

El fragmento mitocondrial que contiene el gen *atp6* se amplificó con los mismos cebadores y condiciones empleados por Martínez-Torres *et al.* (2001). Para la mayoría de las especies de nueva amplificación (no incluidas en el trabajo mencionado) fue necesaria una única reacción de PCR utilizando los cebadores CO2AF y CO3WWRD, directo y reverso respectivamente (ver tabla 1.2). Para algunas especies fue necesaria una PCR secundaria, en la que sólo el cebador directo, tRNA^{Lys}AF2, era anidado respecto a la PCR primaria. La composición de las reacciones de PCR fue similar a la descrita anteriormente para la amplificación del gen *lwrh*, utilizando 1-2 µl de la disolución 10 µM de cada cebador. Las condiciones fueron idénticas a las descritas anteriormente salvo por la modificación en la temperatura de hibridación, que osciló entre 48 y 50°C. Además del gen *atp6*, el fragmento amplificado contenía el extremo 3' del gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa, el gen del tRNA^{Lys}, el gen de la subunidad 8 de la ATPasa-F y el extremo 5' del gen de la subunidad III de la citocromo oxidasa. Sin embargo, dado que para algunas de las especies sólo

se obtuvo o estaba disponible la secuencia correspondiente al gen *atp6*, el análisis filogenético se restringió a esta parte de la secuencia amplificada.

Purificación de los fragmentos amplificados

Para la separación y visualización de los fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR se cargaron 5 µl de éstas en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio (192 µg/ml). Para la determinación del tamaño de los fragmentos se utilizaron los marcadores de pesos moleculares II y VI (Roche). La electroforesis se llevó a cabo sometiendo los geles a un campo eléctrico de 80-100 V durante 30-45 min. La visualización se hizo efectiva mediante la detección de la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio al exponer el gel a luz ultravioleta en un transiluminador (Tecnología para Diagnósticos e Investigación).

El amplificado se purificó a partir de los 45 µl restantes de la reacción de PCR. En la mayoría de ocasiones la purificación se realizó mediante un protocolo clásico de precipitación consistente en la adición de 500 µl de etanol absoluto, 45 µl de acetato de amonio 5 M, 2 µl de cloruro sódico 5 M y 110 µl de agua miliQ. Tras la homogeneización, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. y a continuación se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min. Tras la eliminación del sobrenadante, el residuo sólido se lavó con 500 µl de etanol al 70% y una segunda centrifugación de 5 min. a 14000 rpm. El etanol se eliminó de nuevo y el residuo sólido se secó mediante centrifugación, con calor y al vacío, durante 10 min. en un sistema SpeedVac (Savant). Finalmente, se resuspendió el precipitado en 10 µl de tampón LTE.

Algunos de los fragmentos amplificados en las reacciones de PCR se purificaron mediante el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), siguiendo el manual de instrucciones. En algunas ocasiones, la existencia de otros amplificados simultáneos en las reacciones, presuntamente inespecíficos, obligó a la clonación de los fragmentos específicos o a su purificación a partir de bandas de agarosa. En éste último caso, la purificación se realizó mediante la electroforesis del volumen completo de la reacción, el corte de la banda del gel con el amplificado de interés, y el uso del kit indicado anteriormente,

utilizando las instrucciones y soluciones para la purificación de fragmentos de DNA a partir de agarosa.

c) Clonación

Un gran número de los fragmentos resultantes de las reacciones de PCR se obtuvieron libres de amplificadores inespecíficos y en cantidad suficiente para poder ser secuenciados directamente tras su purificación. Sin embargo, en un número considerable de ocasiones el fragmento de interés se amplificó muy débilmente y/o se presentaba acompañado de otros amplificadores. En estos casos, el amplificador de interés se aisló mediante purificación a partir de agarosa o todos los amplificadores se clonaron, seleccionándose posteriormente el fragmento de interés. El proceso de clonación se llevó a cabo también en aquellas ocasiones en las que se observó más de un polimorfismo de secuencia o algún polimorfismo de longitud en las secuenciaciones directas a partir de productos de PCR.

Para la clonación, el primer paso consistió en la utilización de 1-5 μ l de la purificación de los productos de PCR en una reacción de ligación, empleando el kit de ligación rápida pGEM-T Easy (Promega). Este kit contiene un vector plasmídico con extremos terminados en nucleótidos de timina libres. Esta característica facilita la ligación de fragmentos amplificadores mediante la polimerasa *Taq*, la cual añade de manera inespecífica nucleótidos de adenina en los extremos 3' de los fragmentos que polimeriza. Las reacciones de ligación contenían, junto a los 1-5 μ l del producto purificado: 1 μ l de vector pGEM-T (de una disolución 10 ng/ μ l), 5 μ l de tampón de ligación 2X, 1 μ l de ligasa T4 (3 unidades) y el volumen necesario de agua miliQ para obtener un volumen final de 10 μ l. Las reacciones se incubaron generalmente durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente (~24°C) y posteriormente durante toda la noche a 4-8°C.

Al día siguiente, se utilizó todo el volumen de la ligación para el protocolo de transformación. Se utilizó la cepa XL1 Blue de *Escherichia coli* (Stratagene), a partir de la cual se obtuvieron células competentes mediante un protocolo basado en el uso de CaCl₂ (Sambrook *et al.*, 1989). Se añadieron 100 μ l de

estas células a cada ligación y la mezcla se incubó posteriormente durante 30 min. en hielo. La transformación de las células se llevó a cabo mediante un choque térmico de 90 s. a 42°C, tras lo cual las células se incubaron 5 min. en hielo. Posteriormente se añadieron 700 µl de medio LB (NaCl 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, triptona 10 g/l) y se incubaron en agitación a 250 rpm y 37°C durante una hora. Posteriormente, se sembraron en general dos placas de medio LB-agar (medio LB con agar-agar 15 g/l) con 50 mg/l de ampicilina, X-gal al 4‰ e IPTG al 4‰. En una de las placas se sembraron 100 µl y en la otra 200 µl del cultivo de células transformadas. Las placas se mantuvieron durante toda la noche en una estufa a 37°C. Al día siguiente, se seleccionaron varias colonias blancas, supuestamente poseedoras de un plásmido con inserto. La comprobación definitiva de la presencia del fragmento de interés insertado en el plásmido de una determinada colonia se realizó mediante PCR de colonia. Se introdujo una pequeña cantidad de la colonia a comprobar en un pocillo de una placa de PCR para llevar a cabo una reacción con la siguiente composición: 42 µl de agua miliQ, 5 µl de tampón de PCR 10X, 1 µl de una disolución de dNTPs (10 mM cada nucleótido), 1 µl de una disolución con los cebadores T7 y SP6 (presentes en el vector pGEM-T) a una concentración 10 µM cada uno y 1'5 unidades de polimerasa *Taq* (Biotools). De cada colonia se sembraba una réplica en una placa de LB-agar para su posterior uso. A partir de ellas, las colonias con inserto que fueron seleccionadas para secuenciación se sembraron en 3 ml de medio LB con ampicilina. Se permitió el crecimiento durante toda la noche, en agitación y a 37°C, y se procedió posteriormente a la extracción de los plásmidos. La extracción se realizó mediante el High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche), según las instrucciones del fabricante.

d) Secuenciación y análisis de cromatogramas

Algunos de los fragmentos de PCR purificados se secuenciaron directamente. Para ello, se utilizaron 1-3 µl de la purificación para la reacción de secuenciación utilizando el Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante, y en un termociclador ABI PCR System 9700. En aquellos casos en los que la

clonación fue necesaria para la obtención de la secuencia, se utilizaron 3 µl de la elución resultante del kit de extracción de DNA plasmídico. Para cada secuencia definitiva que fue usada en el posterior análisis filogenético se secuenciaron al menos tres clones, con el objetivo de detectar las posibles mutaciones introducidas por la polimerasa *Taq* durante las reacciones de PCR. La lectura de las reacciones de secuenciación se llevó a cabo en el Servei de Seqüenciació del Servei Central de Suport a la Investigació i l'Experimentació de la Universitat de València. Los cromatogramas resultantes de la lectura se revisaron y ensamblaron con el paquete de programas Staden Package v1.6.0 (Staden *et al.*, 1998).

e) Obtención de secuencias a partir de bases de datos

Como se ha comentado anteriormente, algunas de las secuencias empleadas en los análisis filogenéticos de este capítulo se obtuvieron originalmente en trabajos anteriores. Estas secuencias se descargaron de la base de datos del European Bioinformatics Institute mediante el sistema "Sequence Retrieval System" de su página web www.ebi.ac.uk. Todas aquellas secuencias obtenidas en trabajos anteriores y que se han analizado en el presente estudio aparecen marcadas en la tabla 1.1 con un número en superíndice, el cual indica la referencia original correspondiente (ver pie de tabla 1.1). Para el análisis del gen *lwrh* sólo se utilizó una secuencia no obtenida en el presente estudio, correspondiente a la secuencia de cDNA de este gen en el pulgón *M. viciae* (subfamilia Aphidinae) (Gao *et al.*, 2000). En el caso del fragmento mitocondrial que contiene el gen *atp6*, algunas de las secuencias se obtuvieron originalmente para el trabajo previo de Martínez-Torres *et al.* (2001), mientras que otras se obtuvieron para el presente estudio. Las dos secuencias de DNA más utilizadas para estudios filogenéticos en pulgones son el gen nuclear *ef1α* y el gen mitocondrial *coll*. Algunas de las secuencias del gen *ef1α* analizadas en este capítulo se obtuvieron a partir de trabajos anteriores (ver tabla 1.1), pero la mayor parte se secuenciaron originalmente para el presente estudio. Por último, el análisis realizado a partir de las secuencias del gen *coll* supone únicamente la recopilación de

secuencias de trabajos anteriores, centrados todos en taxones internos de la familia Aphididae, que en conjunto representan un buen muestreo global de este grupo de insectos.

3.4. Alineamiento de las secuencias

Todos los alineamientos de las secuencias obtenidas, tanto para cada gen por separado como para los análisis combinados, se realizaron mediante el programa ClustalX v1.81 (Thompson *et al.*, 1997). Los primeros alineamientos realizados para cada caso se llevaron a cabo en el modo de "alineamiento múltiple" (Multiple alignment mode), y con los valores por defecto de penalización por apertura y extensión de gap (10 y 0'2, respectivamente). Posteriormente, la adición de secuencias obtenidas a partir de nuevas especies se realizó en el modo de "alineamiento por perfil" (Profile alignment mode), alineando las nuevas secuencias a los alineamientos previos. Para los genes nucleares, las posiciones de corte de los intrones se determinaron mediante la adición, a los alineamientos, de las secuencias de cDNA obtenidas con este propósito (ver apartado 3.3.a) y siguiendo las secuencias canónicas de inicio (GT) y final (AG) de estas regiones génicas. Los alineamientos resultantes pueden observarse en el Anexo I, incluido en el CD adjunto.

3.5. Caracterización de las secuencias

a) Composición nucleotídica y homogeneidad de las secuencias

Las secuencias obtenidas se analizaron con el objetivo de detectar posibles sesgos en la composición nucleotídica que pudieran provocar topologías aberrantes en las reconstrucciones filogenéticas. El programa MEGA v3.0 (Kumar *et al.*, 2004) se utilizó para obtener la composición nucleotídica de cada uno de los genes analizados. Los datos se obtuvieron únicamente para las regiones exónicas, tanto en conjunto como divididas por posiciones de codón. Mediante el programa TREE-PUZZLE v5.2 (Schmidt *et al.*, 2002) se realizó un test χ^2 para comprobar la homogeneidad de la composición de las secuencias entre las distintas especies, tanto para nucleótidos como para aminoácidos.

b) Análisis de saturación de posiciones nucleotídicas

La posible existencia de posiciones con saturación de sustituciones nucleotídicas en las secuencias se investigó mediante la representación, para cada gen, de las distancias no corregidas entre pares de especies frente a las distancias corregidas mediante la corrección Kimura-2-parámetros (Kimura, 1980). Las representaciones se realizaron para las regiones exónicas y para las tres posiciones de codón en conjunto. También se realizaron separando las terceras posiciones de codón y/o para transiciones y transversiones por separado. Asimismo, se representaron las distancias aminoacídicas no corregidas entre pares de especies frente a las distancias corregidas mediante la corrección de Poisson. Las matrices de distancias, en todos los casos, se obtuvieron mediante el programa MEGA (Kumar *et al.*, 2004). La representación se realizó introduciendo las matrices en el programa DIPLOMO (Weiller y Gibbs, 1995) y posteriormente en el programa Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation).

3.6. Test de tasas relativas

La posible existencia de especies o grupos de especies con tasas de sustitución significativamente aceleradas se estudió inicialmente mediante el programa RRTree (Robinson-Rechavi y Huchon, 2000). El programa realiza un análisis conjunto de todas las secuencias presentes en un alineamiento, permitiendo además la creación de grupos. Para cada gen, se creó un grupo con las secuencias de cada subfamilia y tribu (ver tabla 1.1). El análisis de tasas relativas se realizó también para el conjunto de datos combinados ntLEA (ver apartado 3.7). Se utilizó el programa tanto sobre las secuencias nucleotídicas, que se trataron en todos los casos como no codificantes, como sobre las secuencias aminoacídicas. Para aquellos genes en los que se reveló claramente la existencia de saturación en terceras posiciones de codón, también se utilizó el programa sobre únicamente las posiciones primera y segunda. El nivel de significatividad de los test fue modificado según las sugerencias del autor, dividiendo el nivel de significatividad inicial ($\alpha=0.05$) por el número de grupos creados en cada test.

A partir de los resultados obtenidos en este análisis global y de los resultados preliminares del análisis filogenético, se utilizó también el programa PHYLTEST (Kumar, 1995) para la detección de tasas aceleradas. Este programa permite la comparación de las tasas de sustitución nucleotídica entre pares de especies o pares de grupos de especies, eligiendo un grupo externo y sin incluir el resto de secuencias presentes en el alineamiento de entrada. La principal diferencia respecto al programa RRTree es la posibilidad de elegir un grupo externo más cercano al par de grupos comparados, sin que éste sea necesariamente el mismo (*Daktulosphaira vitifoliae* en este estudio) en todas las comparaciones. Para el programa PHYLTEST, las distancias se corrigieron mediante la corrección de Kimura-2-parámetros (Kimura, 1980).

3.7. Reconstrucción filogenética molecular

a) Análisis independientes

Las secuencias de cada uno de los genes analizados en el presente trabajo se utilizaron en dos tipos de análisis filogenético. Por un lado, cada uno de los genes se analizó por separado mediante máxima verosimilitud en el programa PAUP* v4.0b10 (Swofford, 2002). Por otro lado, se crearon varios conjuntos de datos mediante la concatenación de las secuencias con el objetivo de realizar un análisis combinado de los genes mediante varios métodos de reconstrucción filogenética (ver apartado 3.7.b).

La reconstrucción filogenética molecular mediante máxima verosimilitud, único método empleado en los análisis independientes de los genes, implica la búsqueda del árbol con un valor mayor de verosimilitud. La verosimilitud se calcula mediante una ecuación cuyo valor depende de la topología del árbol y de la longitud de sus ramas, así como de los parámetros presentes en el modelo de sustitución nucleotídica empleado en la reconstrucción (Lewis, 2001). Los análisis independientes de las secuencias se realizaron con diversas variaciones. Por un lado, para aquellos genes para los que se detectó la evidencia de saturación en las terceras posiciones de codón, el análisis se llevó a cabo tanto con la secuencia exónica completa como con únicamente las posiciones primera y segunda de codón. Por otro lado, en algunos análisis se

eliminaron algunas especies o grupos de especies, tras observar la posición que ocuparon en las primeras reconstrucciones, incongruentes con su posición taxonómica. Asimismo, se realizaron algunas reconstrucciones eliminando la especie utilizada como grupo externo, *Daktulosphaira vitifoliae*. Por último, se llevaron a cabo también análisis en los que las topologías fueron constreñidas a mantener ciertos grupos, basados en los resultados preliminares obtenidos en las reconstrucciones sin grupo externo.

Para cada análisis realizado, la elección del modelo de sustitución nucleotídica a emplear se llevó a cabo mediante el programa Modeltest v3.7 (Posada y Crandall, 1998) en conjunción con PAUP*. El programa se utilizó dos veces de forma iterativa para minimizar la posible influencia del árbol de entrada. Para la primera vez, el árbol de entrada fue el árbol reconstruido mediante el algoritmo neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) por el programa Modeltest a partir del alineamiento de las secuencias. Posteriormente, el modelo y los parámetros resultantes se emplearon para obtener un árbol mediante máxima verosimilitud con el programa PAUP*. Este árbol se utilizó como nuevo árbol de entrada para la iteración del programa Modeltest. El modelo y los parámetros resultantes de esta repetición se eligieron para la reconstrucción por máxima verosimilitud en PAUP*. Para la elección del modelo se utilizó el criterio de información de Akaike. Si el peso del modelo elegido mediante este criterio era superior a 0'95, se utilizaron los parámetros de este modelo. En caso contrario, los parámetros empleados fueron las medias ponderadas de todos los modelos, facilitadas también por el programa Modeltest (Posada y Buckley, 2004). En aquellos casos en los que se emplearon las medias ponderadas, se indica de todos modos en los árboles correspondientes cual fue el modelo de mejor ajuste.

Las búsquedas heurísticas por máxima verosimilitud se llevaron a cabo mediante el algoritmo TBR, con 100 repeticiones de adición de secuencias al azar. Las reorganizaciones de cada repetición se limitaron a 3000 para acotar el tiempo empleado en cada búsqueda. Para estimar la confianza estadística de los nodos se empleó el método de bootstrap (Felsenstein, 1985). En este método se genera un número determinado de pseudorréplicas del conjunto de datos, del mismo tamaño que el conjunto original y creado a partir de la

elección al azar de posiciones del mismo, con reemplazo. Las pseudorréplicas son posteriormente utilizadas para realizar nuevas reconstrucciones filogenéticas con el mismo método empleado para la reconstrucción a partir de los datos originales. El apoyo a cada nodo del árbol original consiste en la proporción de árboles obtenidos a partir de las pseudorréplicas en los que aparece dicho nodo, y generalmente se expresa en porcentaje. Para los análisis independientes realizados mediante máxima verosimilitud, se realizaron búsquedas heurísticas a partir de 300 pseudorréplicas de bootstrap, con el algoritmo TBR y una sola adición de secuencias al azar, limitando las reorganizaciones a 500.

Los análisis se realizaron también a partir de las correspondientes secuencias de aminoácidos, inferidas a partir de cada gen mediante el programa MEGA. Las búsquedas heurísticas por máxima verosimilitud se llevaron a cabo, en esta ocasión, mediante el programa PHYML (Guindon y Gascuel, 2003), aplicando 300 pseudorréplicas de bootstrap. El modelo de sustitución aminoacídica de mejor ajuste a cada una de las secuencias se determinó mediante el programa ProtTest v1.4 (Abascal *et al.*, 2005), en su versión para Windows.

b) Análisis combinado

Congruencia filogenética entre genes

Se utilizaron dos métodos estadísticos para estudiar la congruencia filogenética entre todos los posibles pares de genes analizados en este trabajo. El test de homogeneidad de la partición (también denominado PHT o ILD) (Farris *et al.*, 1995) se implementó en PAUP* con este objetivo, realizando una comparación global de todos los genes así como comparaciones por parejas. El segundo método estadístico consistió en la utilización del test SH (Shimodaira y Hasegawa, 1999). Para cada par de genes, se valoró mediante este test si los valores de verosimilitud de los árboles máximo verosímiles obtenidos a partir de cada uno de ellos eran significativamente distintos, utilizando como datos el alineamiento de uno de los genes, primero, y, posteriormente, el del otro gen.

Análisis combinado

Las secuencias nucleotídicas de los cuatro genes previamente analizados por separado se utilizaron también de manera combinada para el análisis filogenético molecular. Se crearon en concreto dos conjuntos de datos combinados, que serán en adelante denominados conjunto de datos ntLEA y conjunto de datos ntLEAC. En estos conjuntos, las secuencias de los distintos genes se concatenaron para aquellas especies para los que estaban disponibles. En algunos casos, se concatenaron las secuencias de distintos genes para especies diferentes pero pertenecientes a un mismo género (ver tabla 1.1). El conjunto de datos denominado ntLEA se creó a partir de los genes nucleares *lwrh* y *ef1α* y el gen mitocondrial *atp6*. Para estos tres genes se disponía de secuencias de un mayor número de especies (o géneros) en común: 34 especies en total, incluyendo la especie externa *D. vitifoliae*. Además, en este conjunto de datos se eliminaron aquellas posiciones de codón que, para estos genes, mostraron en los análisis previos estar claramente saturadas. Así, este conjunto de datos combinados ntLEA se creó mediante la concatenación de las posiciones de codón primera y segunda del gen *lwrh*, todas las posiciones del gen *ef1α* y las posiciones de codón primera y segunda del gen *atp6*. Para el conjunto de datos ntLEAC se siguió el criterio de concatenar todos los datos moleculares disponibles para las especies (o géneros). Así, el conjunto de datos ntLEAC se creó mediante la concatenación de todas las posiciones de codón y todos los genes (*lwrh*, *ef1α*, *atp6* y *coll*) para un grupo de 20 especies, incluyendo la especie externa.

Los conjuntos de datos combinados se analizaron mediante varios métodos de reconstrucción filogenética molecular. Por un lado, se utilizó máxima verosimilitud en PAUP*, de manera análoga a los análisis de cada gen por separado, con algoritmo TBR, 100 réplicas de adición de secuencias al azar, un límite de 3000 reorganizaciones por réplica, y 300 pseudorréplicas posteriores de bootstrap. Para cada análisis, el modelo de sustitución nucleotídica se seleccionó mediante el programa Modeltest tal y como se ha explicado en el apartado 3.7.a.

El algoritmo neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) se eligió para realizar las reconstrucciones filogenéticas basadas en distancias. Los métodos basados en

distancias implican el cálculo de un valor de distancia entre cada par de secuencias, a partir del número de diferencias nucleotídicas o aminoacídicas entre ellas (Lewis, 2001). Posteriormente, se utiliza un algoritmo para realizar la reconstrucción filogenética a partir de la matriz de distancias calculadas. Para las reconstrucciones realizadas en este estudio, se utilizó el algoritmo neighbor-joining, tal y como se implementa en PAUP*, a partir de las distancias calculadas en cada caso con el modelo de sustitución nucleotídica obtenido en el programa Modeltest. En esta ocasión, se llevaron a cabo 2000 pseudorréplicas de bootstrap para la evaluación de la confianza estadística de los nodos.

El programa PAUP* también se utilizó para la reconstrucción por máxima parsimonia. Este método consiste en la búsqueda del árbol que consiga explicar las diferencias entre las secuencias analizadas mediante el menor número de cambios nucleotídicos o aminoacídicos (Lewis, 2001). En este estudio se emplearon búsquedas heurísticas con el algoritmo TBR, con 5000 réplicas de adición al azar de secuencias y sin límite en el número de reorganizaciones por réplica. Tras la búsqueda, se llevaron a cabo 2000 pseudorréplicas de bootstrap, mediante TBR y una única adición de secuencias al azar.

Finalmente, ambos conjuntos de datos se analizaron mediante inferencia bayesiana con el programa MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Este método de reconstrucción está íntimamente ligado al método de máxima verosimilitud, ya que busca también maximizar el valor de una ecuación en la que intervienen la topología y las longitudes de las ramas así como los parámetros del modelo de sustitución nucleotídica. Sin embargo, en lugar de buscar entre los posible árboles aquél que maximiza la función en base a unos parámetros establecidos, la inferencia bayesiana supone una búsqueda paulatina en la que se van modificando tanto la topología y las longitudes de las ramas como todos los parámetros del modelo, en busca del conjunto de cambios que maximizan la ecuación (Lewis, 2001). Por otro lado, la inferencia bayesiana permite realizar simultáneamente un método de apoyo estadístico a los nodos diferente del bootstrap. Los nodos llevan asociados una probabilidad *a posteriori*, que indica la proporción de árboles generados durante la

búsqueda en los que aparece el nodo en cuestión. Generalmente se elimina una fracción inicial de los árboles por no presentar aún un valor elevado de verosimilitud. Para cada conjunto de datos combinados se realizaron dos aproximaciones diferentes en lo que concierne a las particiones creadas en el programa: una partición por cada gen o una partición por cada posición de codón de cada gen. Así, para el conjunto de datos ntLEA, los análisis se llevaron a cabo con 3 y 7 particiones, respectivamente, y para el conjunto de datos ntLEAC, con 4 y 12 particiones, respectivamente. En todos los casos se establecieron 2 ejecuciones paralelas del programa de 6 cadenas Markov cada una, con 10^6 generaciones iniciales, utilizando los valores por defecto del resto de parámetros. La convergencia entre las cadenas se evaluó mediante el programa Tracer v1.4 (Rambaut y Drummond, 2003). Si tras las primeras 10^6 generaciones la convergencia no había sido alcanzada, se continuó el análisis mediante la adición de 10^6 generaciones consecutivamente hasta la convergencia entre cadenas o hasta un máximo de 4×10^6 generaciones. En aquellas ocasiones en las que la convergencia tampoco había sido alcanzada en este momento, el análisis se reinició cambiando la temperatura de las cadenas a 0'1 y el parámetro λ del mecanismo de propuesta "Cambiar topología y longitudes de rama con LOCAL" a 0'4. Estas medidas se tomaron a partir de las sugerencias del manual del programa MrBayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) para condiciones en las que es difícil alcanzar la convergencia. En cualquiera de los casos, los árboles se guardaron cada 100 generaciones, y se calculó un árbol de consenso con las probabilidades *a posteriori* a partir de estos árboles, desechando una fracción inicial del 25%.

En los análisis combinados, al igual que en los separados, se realizaron las reconstrucciones en distintas condiciones, eliminando algunas especies o grupos de especies para los que se obtuvieron posiciones filogenéticas incongruentes con las clasificaciones taxonómicas. Se llevaron a cabo, asimismo, reconstrucciones sin la presencia de la especie usada como grupo externo y reconstrucciones constreñidas a mantener en la topología algunos grupos determinados, en función de algunas topologías obtenidas en los análisis independientes.

De manera análoga a lo realizado para las secuencias nucleotídicas, las secuencias de aminoácidos inferidas se utilizaron también para crear dos conjuntos de datos combinados. La concatenación de las secuencias de aminoácidos de los genes nucleares *lwrh* y *ef1a* y el gen mitocondrial *atp6* para 34 especies de pulgones (incluyendo la especie externa) se denominó conjunto de datos de aminoácidos aaLEA. El conjunto de datos creado mediante la adición del gen *coll* se denominó conjunto de datos aaLEAC, y contenía un total de 20 especies. Ambos conjuntos se analizaron mediante métodos de reconstrucción filogenética equivalentes a los empleados para los conjuntos de datos combinados de nucleótidos. El programa PHYML se utilizó para las reconstrucciones mediante máxima verosimilitud, seleccionando el modelo de sustitución aminoacídica resultante del programa ProtTest. El programa MEGA permitió el análisis mediante neighbor-joining con el modelo JTT, el cual ocupó siempre una posición elevada en la clasificación de mejores modelos facilitada por ProtTest. En ambos casos se llevaron a cabo 300 pseudorréplicas de bootstrap. El análisis por máxima parsimonia se realizó gracias al programa PAUP*, con algoritmo TBR, 100 repeticiones de adiciones al azar de secuencias y 2000 pseudorréplicas de bootstrap. Por último, los conjuntos combinados de aminoácidos se analizaron mediante inferencia bayesiana con el programa MrBayes, creando una partición para cada proteína incluida. El resto de condiciones fueron idénticas a las descritas para el análisis por inferencia bayesiana de los conjuntos de datos combinados de nucleótidos, salvo por el número empleado de generaciones. Un total de 5×10^5 generaciones fueron en todos los casos suficientes para la convergencia entre las dos cadenas paralelas, según se comprobó con el programa Tracer.

3.8. Comparación de hipótesis filogenéticas alternativas

Para la comparación estadística de topologías alternativas se utilizaron los test SH (Shimodaira y Hasegawa, 1999), tal y como se implementa en PAUP*, y ELW (Strimmer y Rambaut, 2002), mediante el programa TREE-PUZZLE. Las comparaciones se realizaron únicamente utilizando el conjunto de datos combinados ntLEA. Se creó, para ambos programas, un conjunto de 30

topologías alternativas. En la tabla 1.8, del apartado de resultados 4.4, puede observarse una breve descripción de cada uno de los árboles incluidos. La topología concreta de cada uno de ellos puede consultarse en el Anexo II, incluido en el CD adjunto. En este conjunto se incluyeron las topologías máximo verosímiles obtenidas en los análisis separados de cada uno de los genes y las correspondientes a los análisis de los conjuntos de datos combinados con los diferentes métodos de reconstrucción. Asimismo, se incluyeron las topologías propuestas a partir de datos morfológicos por Heie y Wojciechowski, y otras topologías en las que se incluyeron relaciones específicas entre subfamilias que aparecen en las filogenias morfológicas, como la relación entre Aphidinae y Lachninae o entre Thelaxinae y las subfamilias que formaban la familia Drepanosiphidae en la clasificación de Heie (Heie, 1980) (ver Introducción general, apartado 2.2). Para estos últimos casos se buscó, empleando el conjunto de datos ntLEA, la topología máximo verosímil que mantuviera las relaciones propuestas por Heie, Wojciechowski, o las relaciones particulares mencionadas. Las búsquedas se realizaron con el programa PAUP* con las mismas condiciones descritas en los apartados anteriores.

4. Resultados

4.1. Caracterización de las secuencias

a) Comprobación de la ortología de las secuencias del gen de la opsina sensible a longitud de onda larga

El gen que codifica la opsina de longitud de onda larga (*lwrh*) pertenece a una familia génica de, al menos, 6 genes en *Drosophila melanogaster*, cada uno de los cuales codifica una proteína adaptada a la función de recepción de la señal luminosa de distintas longitudes de onda. El número de genes pertenecientes a esta familia existente en los pulgones no se conoce aún. Con el fin de comprobar que todas las secuencias amplificadas en este trabajo correspondían al gen *lwrh*, y no a alguno del resto de genes parálogos de la familia, se construyó un árbol filogenético incluyendo las secuencias obtenidas de pulgones así como secuencias de distintos representantes de la familia génica y de diversas especies de insectos pertenecientes a otros órdenes. Dada la alta divergencia existente entre estos taxones, se realizó la reconstrucción filogenética a partir de las secuencias de aminoácidos, mediante el algoritmo neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) en el programa MEGA v3.1 (Kumar *et al.*, 2004), sobre las distancias con corrección Poisson y con 1000 pseudorréplicas de bootstrap. La figura 1.4 muestra el árbol resultante del análisis. En éste, la agrupación monofilética, con un apoyo estadístico elevado (valor de bootstrap de 93%), de todas las secuencias obtenidas para las especies de pulgones confirma la pertenencia de todas ellas al gen *lwrh* y, por tanto, su ortología. Además, las secuencias de pulgones se agruparon dentro del clado de las opsinas de longitud de onda larga junto con la secuencia amplificada de *Daktulosphaira vitifoliae* (familia Phylloxeridae) con un apoyo estadístico del 100%. Este resultado, así como la clara separación entre esta secuencia y las de los representantes de la familia Aphididae, apoya la validez de esta especie como grupo externo.

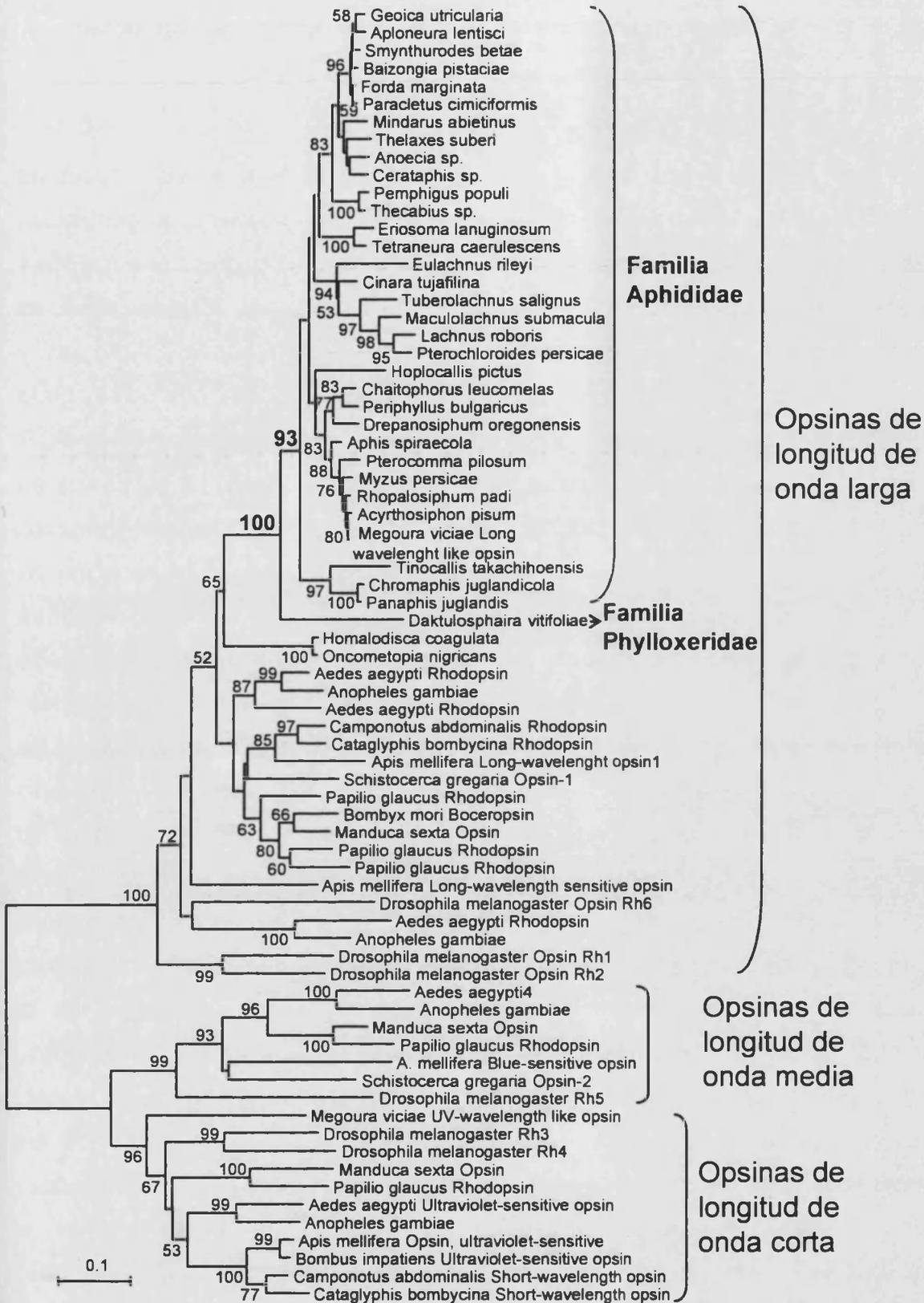


Figura 1.4. Árbol obtenido mediante neighbor-joining a partir de las secuencias aminoacídicas de distintos miembros de la familia génica de las opsinas y de especies de insectos de diversos órdenes, incluyendo las secuencias obtenidas en este trabajo. Distancias corregidas mediante la corrección de Poisson. Se muestran los valores de bootstrap mayores que 50% de un total de 1000 pseudorréplicas.

b) Caracterización de la variabilidad genética, composición nucleotídica y homogeneidad de las secuencias

Gen de la opsina sensible a longitud de onda larga

Una vez eliminadas las regiones correspondientes a los cebadores empleados en la amplificación mediante PCR, las secuencias genómicas utilizadas en el alineamiento del gen *lwrh* variaron en longitud entre los 1544 nucleótidos de *Eulachnus rileyi* y los 990 de *Thelaxes suberi*. Para las especies *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis spiraecola*, *Megoura viciae*, *Rhopalosiphum padi* y *Tuberolachnus salignus* sólo se obtuvo la secuencia de cDNA, con una longitud de 739 nucleótidos en todos los casos. El fragmento amplificado en la PCR incluía 2 exones parciales, 3 exones completos y 4 intrones. La secuencia es homóloga a la región que abarca las posiciones 312 a 1099 del transcrito DmelRh6-PB del gen homólogo en *Drosophila melanogaster*. La variación en longitud observada correspondió en su totalidad a las regiones correspondientes a los intrones. En particular, el cuarto intrón secuenciado resultó ser más largo en las especies pertenecientes a la subfamilia Lachninae, particularmente en *Cinara tujafilina* y, sobre todo, en *Eulachnus rileyi*. La especie *Cinara tujafilina* también presentó una longitud mayor en el segundo intrón, y la especie externa, *Daktulosphaira vitifoliae*, en el primero. El alineamiento de los intrones no pudo realizarse de manera fiable salvo para géneros muy cercanos, y, en estos casos, generalmente sólo para una pequeña parte de estas regiones génicas. Dado que el interés de este capítulo se centra principalmente en las relaciones entre los grandes grupos de la familia Aphididae, se decidió prescindir de las secuencias de los intrones, utilizando sólo el alineamiento de los exones para el análisis filogenético global. No se halló ninguna inserción o deleción (gap) para ninguna secuencia en estas regiones, teniendo el alineamiento definitivo un total de 739 nucleótidos. En la tabla 1.3 pueden consultarse los números de sitios variables e informativos hallados para esta secuencia entre las especies de pulgones, analizadas sin incluir la especie externa, tanto para el alineamiento de nucleótidos como para el correspondiente a las secuencias aminoacídicas inferidas.

El test χ^2 de homogeneidad de composición de las secuencias reveló diferencias significativas en la composición nucleotídica para la especie externa, *Daktulosphaira vitifoliae*, y las especies de pulgones *Tetraneura caerulescens*, *Tuberolachnus salignus* y todas las representantes de la tribu Fordini a excepción de *Smynthuroides betae*. Los test análogos realizados sobre sólo las posiciones primera y segunda de codón no mostraron diferencias significativas para ninguna especie. El mismo resultado se obtuvo cuando el test se llevó a cabo utilizando las secuencias de aminoácidos, que resultaron ser homogéneas en su composición. La composición de las secuencias para cada posición nucleotídica y para aminoácidos puede consultarse en el Anexo III, incluido en el CD adjunto. Tanto *D. vitifoliae* como *T. caerulescens* presentan un sesgo hacia A+T, mucho más drástico en las terceras posiciones de codón, aunque también notable en la primera posición. Para las especies de la tribu Fordini (salvo *S. betae*) el sesgo composicional es hacia una disminución en A+T, también más notorio en tercera posición de codón y ligeramente apreciable en primera posición. Todos los test se repitieron excluyendo la especie externa, con el objetivo de comprobar la influencia de su sesgo en composición. El resultado fue en todos los casos cualitativamente idéntico salvo porque *T. salignus* no tuvo diferencias significativas, aunque su p-valor fue cercano al nivel de significatividad (0'058).

La secuenciación del gen de la opsina desveló un detalle interesante en la secuencia del cuarto intrón. Para algunas de las especies utilizadas, el dinucleótido de inicio del intrón no sigue la secuencia canónica GT, la cual ha sido sustituida por el dinucleótido GC. Además, el cambio parece ser evolutivamente lábil, ya que su presencia o ausencia en las distintas especies no concuerda con los resultados filogenéticos obtenidos. Por ejemplo, ambos estados se hallan en las dos especies analizadas de la tribu Pemphigini y también en las dos de la tribu Eriosomatini. Este hecho sugiere que el cambio puede no ser neutro, sino estar bajo presión selectiva por tener alguna influencia en la eliminación del intrón durante la maduración del mRNA. La existencia de dinucleótidos diferentes a la regla GT-AG en intrones ha sido previamente documentada. Burset *et al.* (2000; 2001) construyeron una base de datos con las secuencias, canónicas y no canónicas, de inicio y fin de

intrones de genes de mamíferos, en la que el par GC-AG representa el 0'56%. La presencia del dinucleótido GC-AG puede estar relacionada con la existencia de un procesado alternativo de los intrones (Bursset *et al.*, 2000; Bursset *et al.*, 2001).

Gen del factor de elongación 1 α

Al igual que lo descrito para el gen *lwrh*, los intrones del gen del factor de elongación de la traducción 1 α (*ef1 α*) resultaron ser demasiado divergentes como para poder ser alineados de manera fiable. Para este gen, el fragmento amplificado incluía 2 exones parciales, 2 exones completos y 3 intrones, y es homólogo a la región que abarca las posiciones 326 a 1156 del transcrito Dme\NEF1a48D-RB del gen homólogo en *Drosophila melanogaster*. Las secuencias variaron en longitud entre 995 (*Anoecia sp.*) y 1095 nucleótidos (*Tetraneura caerulescens*). Para las especies *Eriosoma lanuginosum*, *Eulachnus rileyi* y *Pemphigus populi* sólo se obtuvo la secuencia de cDNA, con una longitud de 831 nucleótidos. La secuencia de la especie externa, *Daktulosphaira vitifoliae*, tuvo una longitud de 897 nucleótidos, debido a la ausencia del segundo y el tercero de los intrones hallados en las especies de la familia Aphididae. El alineamiento de los exones no presentó ningún gap, teniendo una longitud total de 831 nucleótidos. En la tabla 1.3 pueden observarse los datos referentes a los sitios variables e informativos hallados para este gen. El análisis de la variabilidad de las secuencias confirmó su extremado nivel de conservación. La distancia media entre pulgones para los exones de este gen (0'095) es poco mayor que la mitad de la hallada para el gen *lwrh* (0'168), siendo ambas secuencias nucleares. Casi el 86% de la variabilidad de la secuencia se halla en las terceras posiciones de codón, por lo que el análisis filogenético se realizó siempre sobre el conjunto de la secuencia. Por otro lado, no se llevó a cabo ningún análisis a partir de las secuencias inferidas de aminoácidos, dado que sólo se hallaron 11 posiciones parsimónicamente informativas en su alineamiento (ver tabla 1.3). La homogeneidad de la composición de las secuencias no fue completa por diferencias significativas en la composición de *D. vitifoliae* y *Baizongia pistaciae*, con sesgos hacia A+T y hacia G+C, respectivamente. El p-valor del

test para la especie *T. caerulescens* fue de 0'091, cercano al nivel de significatividad de 0'05, debido aparentemente a una tendencia hacia un mayor contenido en A+T (ver Anexo III). Ninguna especie mostró diferencias significativas en composición aminoacídica o cuando se excluyeron las terceras posiciones de codón. Los resultados fueron cualitativamente idénticos al realizar los test sin la presencia de la especie externa.

Gen de la subunidad 6 de la ATPasa-F

En el alineamiento del gen mitocondrial que codifica la subunidad 6 de la ATPasa-F (*atp6*) se halló la delección de un codón en la secuencia de *Cinara cupressi* y la inserción de otro codón en la correspondiente a *Tetraneura caerulescens*. Para la mayoría de pulgones, la secuencia de este gen tenía una longitud de 654 nucleótidos. Tras la eliminación de las zonas con gaps antes mencionadas, el alineamiento resultante tenía 651 nucleótidos. El gen presentó una variabilidad mayor que ambos genes nucleares (ver tabla 1.3). Tanto las secuencias nucleotídicas como las respectivas secuencias inferidas de aminoácidos mostraron homogeneidad en su composición en los test χ^2 realizados con el programa TREE-PUZZLE.

Gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa

Las secuencias recopiladas a partir de estudios anteriores para el gen mitocondrial de la subunidad II de la citocromo oxidasa (*colI*) contenían una región común sin gaps de 531 nucleótidos, que se alinearon y se utilizaron para el análisis filogenético. La secuencia mostró una variabilidad menor que el gen mitocondrial *atp6*, y comparable a la presente en la secuencia del gen nuclear *lwrh* (ver tabla 1.3). Los test χ^2 para la comprobación de la homogeneidad de la composición de las secuencias no revelaron diferencias significativas para este gen en ninguna especie, ni para nucleótidos ni para aminoácidos.

Tabla 1.3. Resumen de datos relativos a los genes analizados.

Alineamiento	Número de especies ¹	Longitud ²	Nucleótidos		Aminoácidos		Distancias medias ⁵	saturación en 3ª posición ⁶
			Posiciones variables ³	Posiciones informativas ⁴	Posiciones variables	Posiciones informativas		
<i>lwrh</i>	34	739	165 / 383	124 / 322	103	75	0.168	Sí
<i>ef1a</i>	46	831	39 / 273	24 / 229	25	11	0.095	No
<i>atp6</i>	36	651	196 / 399	137 / 325	131	108	0.191	Sí
<i>coll</i>	48	531	103 / 261	72 / 210	75	55	0.128	Sí
nt/aa-LEA	34	1757	620	473	257	193	-	-
nt/aa-LEAC	20	2749	1122	835	276	196	-	-

¹Número de especies analizadas para cada gen y para los conjuntos de datos combinados, incluyendo el outgroup. ²Número total de posiciones nucleotídicas usadas en los análisis filogenéticos, incluyendo todas las posiciones de codón de cada gen excepto en el conjunto de datos combinados, donde las terceras posiciones de codón de los genes *lwrh* y *atp6* no se incluyeron. ³Número de posiciones variables en posiciones primera y segunda de codón / número de posiciones variables total (excluyendo el outgroup en ambos casos). ⁴Número de posiciones parsimónicamente informativas en posiciones primera y segunda de codón / número total de posiciones parsimónicamente informativas (excluyendo el outgroup en ambos casos). Para los conjuntos de datos combinados, solo se muestran los números totales de posiciones variables e informativas. ⁵Distancias nucleotídicas medias sin corregir entre las especies de pulgones, excluyendo el outgroup, expresadas en número de sustituciones por posición nucleotídica. ⁶Evidencia de saturación de sustituciones nucleotídicas en terceras posiciones de codón (ver apartado 4.1.c).

c) Análisis de saturación de posiciones nucleotídicas

En las figuras 1.5 a 1.7 se muestran algunas de las representaciones de las curvas de saturación obtenidas para los cuatro genes empleados en esta tesis doctoral así como para los conjuntos de datos ntLEA y aaLEA. Para cada gen, se muestra una representación conjunta de las curvas de saturación para las posiciones de codón primera y segunda (en verde) y para la tercera posición de codón (en azul; figuras 1.5 y 1.6). Además, para los genes *ef1 α* (figura 1.5) y *atp6* (figura 1.6) se muestra una figura con las curvas de saturación para las distancias calculadas considerando sólo la tercera posición y separando transiciones y transversiones. La totalidad de las curvas de saturación realizadas puede consultarse en el Anexo IV del CD adjunto. La representación de las curvas a partir de los alineamientos de los genes mitocondriales usados para el análisis filogenético, en los que no existía más de una especie de un mismo género, reveló la existencia de un vacío en la porción inicial de la curva por la falta de distancias genéticas bajas. Este vacío dificultaba la apreciación de la existencia o no de saturación en las posiciones nucleotídicas. Por ello, para la representación de las curvas de saturación de los genes *atp6* y *coll* se añadieron varias secuencias, no incluidas en el análisis filogenético global, a los alineamientos. Concretamente, en el alineamiento del gen *atp6* se añadieron varias secuencias de las especies *Forda formicaria*, *Hyalopterus pruni*, *Paracletus cimiciformis* y *Rhopalosiphum padi*, así como una secuencia de cada una de las especies *Forda riccobonii*, *Paracletus donisthorpei* y *Pemphigus bursarius*. En el alineamiento del gen *coll* se añadieron secuencias de otras especies para los siguientes géneros, previamente representados: *Aphis*, *Brachycaudus*, *Chaitophorus*, *Hamamelistes*, *Hormaphis*, *Macrosiphum*, *Myzus*, *Pemphigus*, *Sitobion* y *Uroleucon*.

Ninguna de las curvas obtenidas para secuencias de aminoácidos para los distintos genes o para el conjunto de datos combinados aaLEA mostró la existencia de saturación, ni siquiera para los pares de especies más alejados. No obstante, sí se observó la existencia de saturación para varias de las secuencias nucleotídicas. En particular, las terceras posiciones de codón del gen *lwrh* reflejaron un alto grado de saturación (figura 1.5), hecho que condujo

a prescindir de estas posiciones en la mayor parte de los análisis, utilizando en ellos únicamente las posiciones primera y segunda, que no mostraron evidencias de saturación. También quedó patente un cierto grado de saturación, aunque menor que en el gen *lwrh*, en las terceras posiciones de codón del gen *ef1α*. La figura 1.5 muestra la separación en transiciones y transversiones de las distancias nucleotídicas de las terceras posiciones de codón de este gen. Estas representaciones revelan que la causa de saturación se halla de forma casi exclusiva sólo en las transiciones. Por ello, y dado que la información filogenética presente en las posiciones primera y segunda de esta secuencia es muy reducida, se decidió utilizar las tres posiciones de codón de este gen para los análisis filogenéticos posteriores.

En las gráficas obtenidas para el gen mitocondrial *atp6* las terceras posiciones de codón mostraron también un grado de saturación menor que las del gen *lwrh*, similares al hallado en el gen *ef1α* (figura 1.6). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en este gen nuclear, la separación en transiciones y transversiones de las distancias en tercera posición del gen *atp6* sí mostraron la existencia de saturación para ambos tipos de sustitución nucleotídica. Debido a esta circunstancia la tercera posición de codón de este gen fue eliminada de la mayoría de análisis filogenéticos, tal y como se realizó en el estudio previo de Martínez-Torres *et al.* (2001). Así, en el conjunto de datos combinados creado a partir de datos no saturados (ntLEA) se incluyeron las posiciones primera y segunda de los genes *lwrh* y *atp6*, y todas las posiciones de codón del gen *ef1α*. En el caso del gen *coll*, la evidencia de saturación en la tercera posición condujo a realizar los análisis filogenéticos independientes sobre esta secuencia con todas las posiciones de codón, primero, y la eliminación de la tercera posición, posteriormente. Pese a la evidencia de saturación en las terceras posiciones de algunos genes, el conjunto de datos moleculares totales (ntLEAC) se creó añadiendo todas las posiciones de codón de cada secuencia. El objetivo de la creación de este conjunto de datos fue la utilización de todos los datos moleculares disponibles para las 20 especies utilizadas, sin la eliminación de ninguna posición de las regiones exónicas.

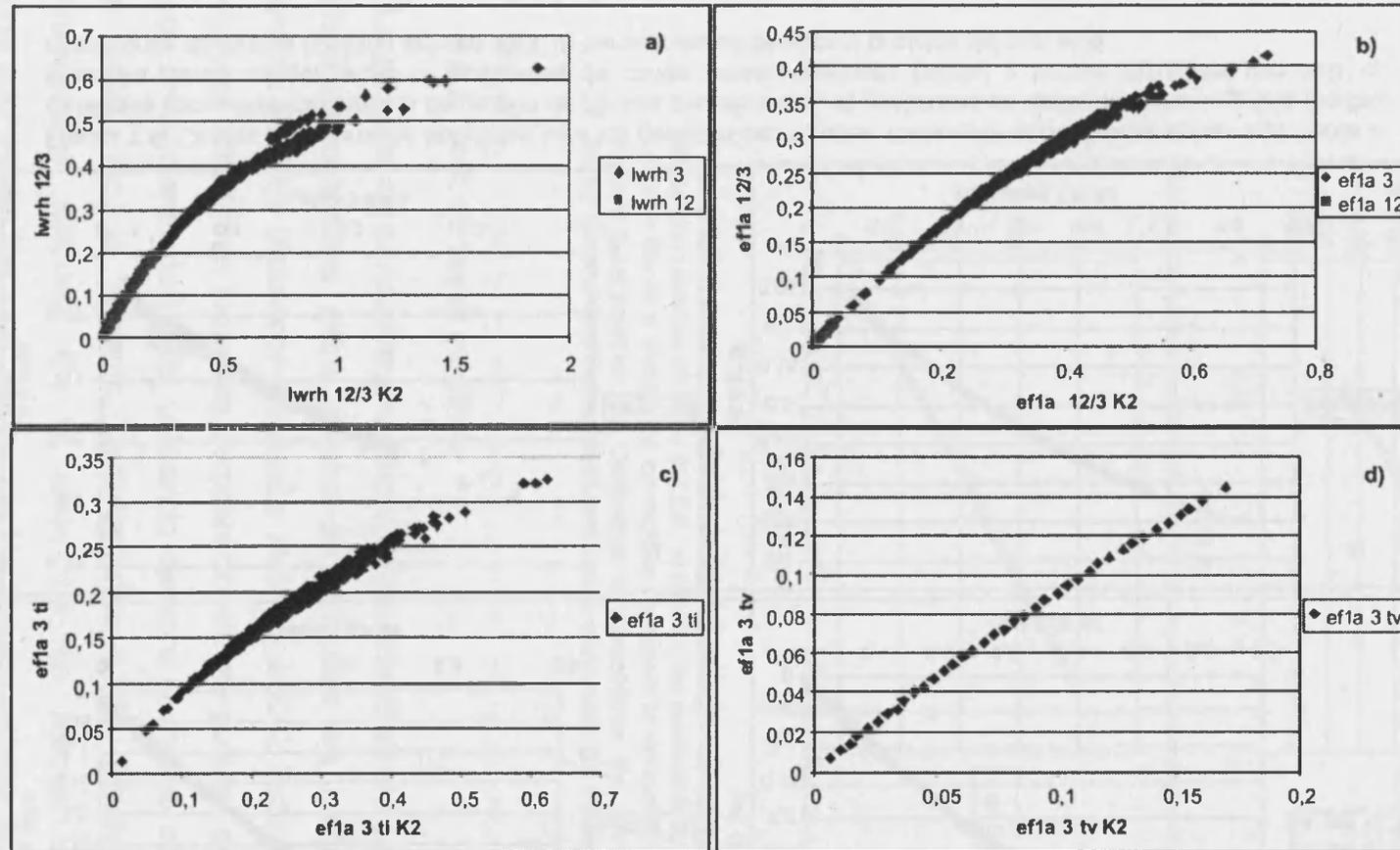


Figura 1.5. Curvas de saturación obtenidas para los genes nucleares. Distancias nucleotídicas sin corregir frente a distancias corregidas mediante la corrección de Kimura 2-parámetros. a) posiciones de codón primera+segunda (verde) y tercera (azul) del gen *lwrh*. b) posiciones de codón primera+segunda (verde) y tercera (azul) del gen *ef1a*. c) transiciones de tercera posición del gen *ef1a*. d) transversiones de tercera posición del gen *ef1a*.

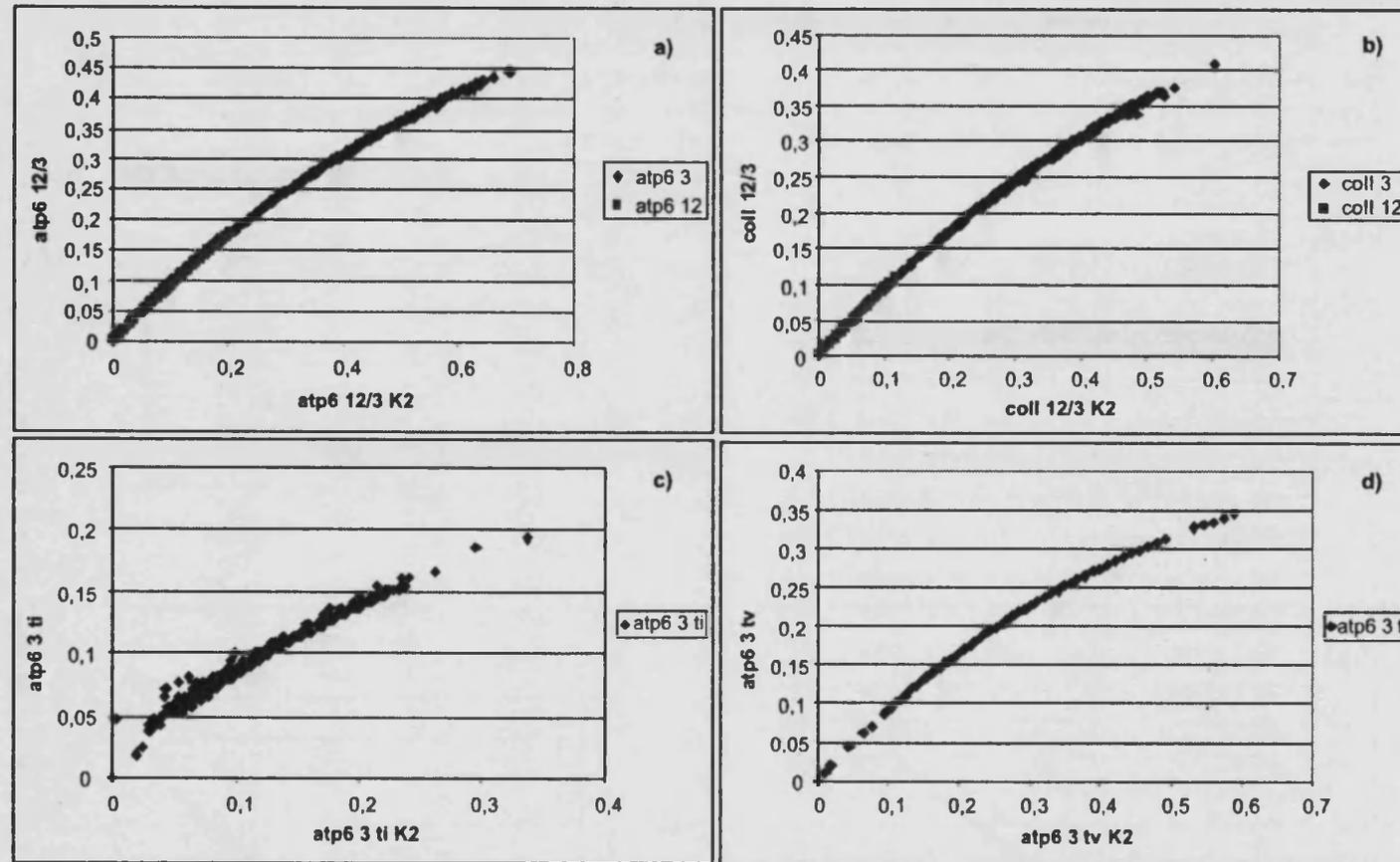


Figura 1.6. Curvas de saturación obtenidas para los genes mitocondriales. Distancias nucleotídicas sin corregir frente a distancias corregidas mediante la corrección de Kimura 2-parámetros. a) posiciones de codón primera+segunda (verde) y tercera (azul) del gen *atp6*. b) posiciones de codón primera+segunda (verde) y tercera (azul) del gen *coll*. c) transiciones de tercera posición del gen *atp6*. d) transversiones de tercera posición del gen *atp6*.

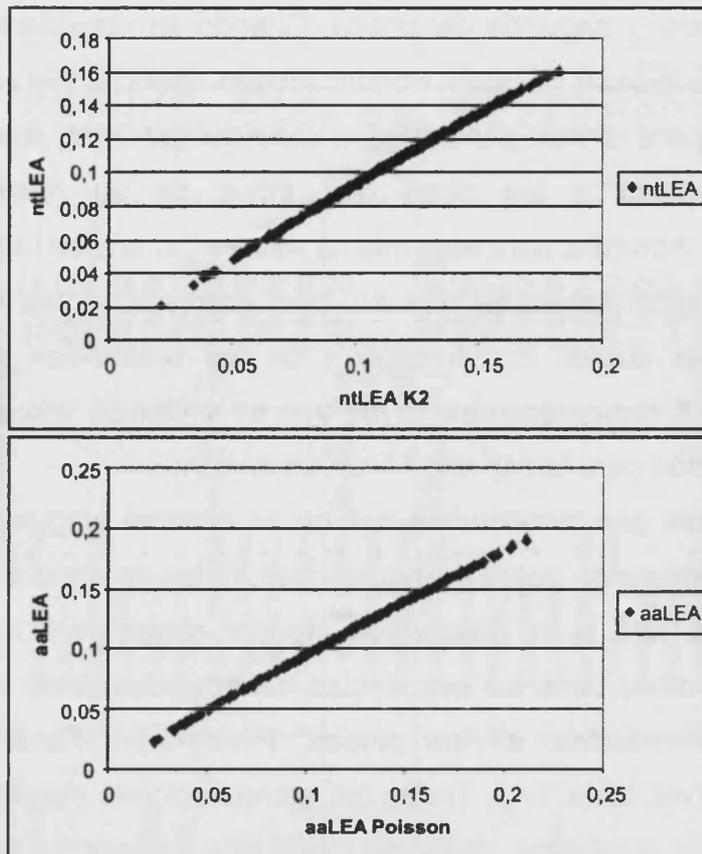


Figura 1.7. Curvas de saturación obtenidas para los conjuntos de datos combinados ntLEA y aaLEA. a) Distancias nucleotídicas sin corregir frente a distancias corregidas mediante la corrección de Kimura-2-parámetros. b) Distancias aminoacídicas sin corregir frente a distancias corregidas mediante la corrección de Poisson.

4.2. Test de tasas relativas

La primera aproximación al análisis de la existencia de tasas relativas de sustitución aceleradas entre grupos de pulgones se realizó mediante el programa RRTree (Robinson-Rechavi y Huchon, 2000). Este programa realiza de manera simultánea todas las comparaciones por parejas posibles entre los grupos previamente definidos, utilizando siempre el mismo outgroup, que, en este caso, fue la especie perteneciente a la familia Phylloxeridae, *Daktulosphaira vitifoliae*. En la tabla 1.4 se recogen todas aquellas comparaciones en las que alguno de los grupos establecidos mostró tener tasas significativamente aceleradas frente a otro. Para los genes nucleares, ninguna de las comparaciones resultó significativa cuando éstas se realizaron a partir de los datos de aminoácidos o cuando se tuvieron en cuenta sólo las

posiciones primera y segunda de codón. Cuando se consideraron todas las posiciones nucleotídicas, la tribu Fordini mostró tasas aceleradas en varias comparaciones para ambos genes. En el caso del gen *lwrh*, esta tribu mostró aceleración respecto a las otras dos tribus de su misma subfamilia (Eriosomatinae). Además, para esta misma secuencia, la tribu Lachnini también apareció como más acelerada que su tribu hermana, Eulachnini, y que la especie *Theaxes suberi*. En el análisis de las secuencias del gen *ef1α*, existieron hasta 8 comparaciones en las que se evidenció una aceleración en tasas de sustitución para la especie *Mindarus abietinus*.

En el caso del gen mitocondrial *coll* no se observó ninguna comparación significativa, ni utilizando datos de nucleótidos, ni los de aminoácidos. Para el gen mitocondrial *atp6* sí se observaron algunos casos de tasas aceleradas, utilizando como datos tanto las secuencias nucleotídicas como las secuencias inferidas de aminoácidos, en los grupos: Panaphidini, Fordini, Lachnini y *Cerataphis sp.* (ver tabla 1.4). Todas las comparaciones significativas en las que estos grupos mostraron tasas de sustitución aceleradas fueron siempre frente a los grupos de la subfamilia Chaitophorinae y la tribu Eulachnini. Esta circunstancia induce a pensar que la significatividad del resultado puede deberse en gran parte a una ralentización de las tasas de sustitución en estos dos últimos taxones para este gen.

Los test se realizaron también empleando como datos las secuencias de los conjuntos de datos combinados. Ninguna comparación fue significativa, tras aplicar la corrección sugerida por el autor del programa RRTree, cuando se utilizó el conjunto aaLEA. Cuando se empleó el conjunto ntLEA, sin embargo, de nuevo la tribu Fordini y la especie *M. abietinus* fueron las que mostraron, en varias comparaciones, unas tasas de sustitución relativamente aceleradas respecto a otros grupos (ver tabla 1.4). La tribu Fordini es el único de los grupos establecidos *a priori* que mostró tasas aceleradas significativas para todos los genes analizados y para el conjunto ntLEA.

Tabla 1.4. Resultados significativos en las comparaciones de tasas relativas con RRTree¹.

Grupo acelerado	Frente a	Diferencia distancia ²	p-valor	Grupo acelerado	Frente a	Diferencia distancia ²	p-valor
<i>lwrh</i> ($\alpha=0'0033$)				<i>atp6</i> ($\alpha=0'0033$)			
Fordini	Pemphigini	0'0730	0'0002	Panaphidini	Chaitophorinae	0'0404	0'0031
	Cerataphis	0'0647	0'0033		Eulachnini	0'0463	0'0021
	Thelaxes	0'0829	0'0002	Fordini	Chaitophorinae	0'0431	0'0013
	Macrosiphini	0'0689	0'0013		Eulachnini	0'0490	0'0005
	Aphidini	0'0638	0'0033	Cerataphis	Eulachnini	0'0635	0'0033
	Chaitophorinae	0'0606	0'0030	Lachnini	Eulachnini	0'0361	0'0032
	Eriosomatini	0'0673	0'0031	<i>atp6</i> posiciones 1 y 2 ($\alpha=0'0033$)			
Lachnini	Thelaxes	0'0632	0'0020	Fordini	Chaitophorinae	0'0472	0.0005
	Eulachnini	0'0430	0'0023	Lachnini	Chaitophorinae	0'0495	0.0007
<i>ef1α</i> ($\alpha=0'0028$)				Panaphidini	Chaitophorinae	0.0445	0.0023
Fordini	Cerataphis	0'0379	0'0012	<i>atp6</i> aminoácidos ($\alpha=0'0033$)			
	Lachnini	0'0368	0'0003	Fordini	Chaitophorinae	0'0881	0'0012
	Eulachnini	0'0345	0'0005	Lachnini	Chaitophorinae	0'0867	0'0026
	Tramini	0'0348	0'0025	conjunto de datos LEA ($\alpha=0'0033$)			
M. abietinus	Pemphigini	0'0384	0'0011	Fordini	Eulachnini	0'0224	0'0021
	Panaphidini	0'0423	0'0009		Pemphigini	0'0020	0'0025
	Cerataphis	0'0529	0'0001		Thelaxes	0'0237	0'0013
	Thelaxes	0'0445	0'0002	Mindarus	Eulachnini	0'0288	0'0008
	Lachnini	0'0519	0'0001		Cerataphis sp.	0'0284	0'0014
	Eulachnini	0'0496	0'0001		Chaitophorinae	0'0250	0'0021
	Eriosomatini	0'0447	0'0005		Pemphigini	0'0262	0'0009
	Tramini	0'0498	0'0004		Thelaxes	0'0300	0'0002
				Eriosomatini	0'0259	0'0024	

¹Se muestran sólo aquellos resultados en los que algún grupo ha mostrado una aceleración significativa respecto a otro, utilizando siempre como especie externa *Daktulosphaira vitifoliae*. Para cada gen o conjunto de datos, se muestra el valor de significatividad utilizado en el test tras aplicar la corrección propuesta por el autor. ²Diferencia en la distancia de ambos grupos respecto a la especie externa.

Tras el análisis general de tasas relativas que realiza el programa RRTree, se llevaron a cabo comparaciones particulares mediante el programa PHYLTEST, que permite seleccionar los dos grupos que se pretenden comparar así como el grupo externo para el test. Se realizaron así test entre grupos filogenéticamente cercanos en los análisis filogenéticos preliminares, utilizando como grupo externo clados que también se situaban en los análisis más cerca que *Daktulosphaira vitifoliae*. En la tabla 1.5 se recogen todas las comparaciones en las que uno de los grupos establecidos mostró una tasa relativa acelerada respecto a otro de manera significativa. De entre los resultados generales de todas las secuencias empleadas, cabe destacar la generalidad de la aceleración de la tribu Lachnini respecto a su tribu hermana Eulachnini, detectada para los genes *lwrh* y *atp6*, utilizando tanto nucleótidos como aminoácidos, así como para los conjuntos de datos ntLEA y aaLEA. En las mismas condiciones se reveló la aceleración de las especies de la subfamilia Calaphidinae respecto al resto de subfamilias que también pertenecían a la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie (Chaitophorinae y Drepanosiphinae). Asimismo, la tribu Fordini mostró, de nuevo, aceleración en varias ocasiones respecto a su tribu hermana Pemphigini, así como frente a un grupo de especies que en los resultados filogenéticos se situó cerca de estas dos tribus, el grupo formado por *Anoecia sp.*, *Cerataphis sp.* y *Thelaxes suberi* (en el que se incluyó también *Mindarus abietinus* para algunas de las comparaciones). Las comparaciones significativas de esta tribu aparecieron en los resultados de los genes *lwrh* y *ef1a* y el conjunto ntLEA. También es destacable la aceleración detectada para algunas de las secuencias de una de estas especies, *Cerataphis sp.*, frente al resto de integrantes de este grupo, en los genes *ef1a* y *atp6* y en el conjunto ntLEA. Por último, también es reseñable que, pese a mostrar aceleración en varias de las comparaciones, la tribu Fordini apareció significativamente menos acelerada que la tribu Eriosomatini, también integrante de la misma subfamilia Eriosomatinae, para las secuencias de aminoácidos inferidas del gen *atp6* y para las posiciones primera y segunda del mismo. Ninguna comparación fue significativa en el análisis del gen mitocondrial *coll*.

Tabla 1.5. Resultados significativos en las comparaciones de tasas relativas con PHYLTEST¹.

Grupo externo	Grupo acelerado	Frente a	Diferencia distancia ²	Grupo externo	Grupo acelerado	Frente a	Diferencia distancia ²
<i>lwrh</i>				<i>atp6</i>			
Daktulosphaira	Lachnini	Eulachnini	0'0430	Daktulosphaira	Lachnini	Eulachnini	0'0363
Aphidini	Fordini	Pemphigini	0'0439	Eulachnini	Cerataphis	Mindarus	0'0489
Aphidini	Fordini	A+C+T	0'0460	Pemphigini	Calaphidinae	Drepanosiphum	0'0311
Aphidini	Fordini	A+C+T+M	0'0465	<i>atp6</i> posiciones 1 y 2			
Eulachnini	Fordini	Mindarus	0'0500	Daktulosphaira	Lachnini	Eulachnini	0'0307
Eulachnini	Mindarus	Pemphigini	0'0328	Aphidini	Eriosomatini	Fordini	0'0346
Pemphigini	Calaphidinae	Chaitophorinae	0'0605	<i>atp6</i> aminoácidos			
Pemphigini	Calaphidinae	Drepanosiphum	0'0328	Daktulosphaira	Lachnini	Eulachnini	0'0571
Pemphigini	Drepanosiphum	Chaitophorinae	0'0277	Aphidini	Eriosomatini	Fordini	0'0625
<i>lwrh</i> posiciones 1 y 2				conjunto de datos LEA			
Daktulosphaira	Lachnini	Eulachnini	0'0238	Daktulosphaira	Lachnini	Eulachnini	0'0115
Pemphigini	Calaphidinae	Chaitophorinae	0'0405	Aphidini	Fordini	Pemphigini	0'0127
Pemphigini	Calaphidinae	Drepanosiphum	0'0336	Aphidini	Fordini	A+C+T+M	0'0119
<i>lwrh</i> aminoácidos				Pemphigini	Calaphidinae	Chaitophorinae	0'0146
Pemphigini	Calaphidinae	Chaitophorinae	0'0460	Pemphigini	Calaphidinae	Drepanosiphum	0'0157
Pemphigini	Calaphidinae	Drepanosiphum	0'0389	Pemphigini	Cerataphis	Thelaxes	0'0213
Pemphigini	Cerataphis	Thelaxes	0'0246	conjunto de datos de aminoácidos LEA			
<i>ef1α</i>				Daktulosphaira	Lachnini	Eulachnini	0'0234
Aphidini	Fordini	Pemphigini	0'0296	Aphidini	Eriosomatini	Fordini	0'0257
Eulachnini	Mindarus	Pemphigini	0'0190	Pemphigini	Calaphidinae	Chaitophorinae	0'0198
Pemphigini	Cerataphis	Thelaxes	0'0268	Pemphigini	Calaphidinae	Drepanosiphum	0'0183
<i>ef1α</i> aminoácidos				Pemphigini	Cerataphis	Thelaxes	0'0204
Pemphigini	Cerataphis	Thelaxes	0'0148				
Pemphigini	Cerataphis	Anoecia	0'0148				

¹Se presentan sólo aquellos resultados en los que algún grupo mostró una aceleración significativa respecto a otro. ²Diferencia en la distancia de ambos grupos respecto a la especie externa. A+C+T: grupo formado por las especies *Anoecia sp.*, *Cerataphis sp.* y *Thelaxes suberi*. A+C+T+M: grupo formado por las mismas especies anteriores y *Mindarus abietinus*.

4.3. Reconstrucción filogenética molecular

a) Análisis independientes

Los primeros estudios sobre la filogenia de la familia Aphididae basados en datos moleculares mostraron una destacable falta de estructura filogenética en los nodos más antiguos del árbol (von Dohlen y Moran, 2000; Martínez-Torres *et al.*, 2001). Esta característica se ha revelado también, en general, en los resultados de los análisis independientes obtenidos a partir de los cuatro genes analizados en este trabajo. Las especies utilizadas se han agrupado en sus respectivas tribus y, en algunas ocasiones, subfamilias, con elevados valores de apoyo estadístico. Sin embargo, las relaciones más profundas de las topologías obtenidas se han visto apoyadas, generalmente, por valores bajos de bootstrap. En los análisis independientes, los mejores apoyos para los nodos profundos han aparecido en las reconstrucciones realizadas a partir del gen de la opsina de longitud de onda larga.

Gen de la opsina sensible a longitud de onda larga

La figura 1.8 muestra el resultado obtenido en la reconstrucción filogenética mediante máxima verosimilitud a partir de las secuencias del gen *lwrt*. Prácticamente todas las tribus de pulgones para las que se incluyó más de una especie se agruparon de manera monofilética y, además, con apoyos estadísticos muy elevados en términos generales (Aphidini, 81%; Macrosiphini, <50%; Eulachnini, 62%; Lachnini, 95%; Eriosomatini, 100%; Fordini, 99% y Pemphigini, 88%). La única tribu con más de una especie que no apareció de forma monofilética fue la tribu Panaphidini, única tribu representada de la subfamilia Calaphidinae, que además ocupó la posición basal del árbol, aunque sin un apoyo de bootstrap elevado. De las cinco subfamilias para las que se analizó más de una especie de pulgón, tres aparecieron como monofiléticas, fuertemente apoyadas (Aphidinae, 80%; Chaitophorinae, 99% y Lachninae, 95%) y dos no monofiléticas (Calaphidinae y Eriosomatinae). La polifilia de la subfamilia Eriosomatinae se debió a la posición separada de la tribu Eriosomatini, mientras que las otras dos tribus de esta subfamilia, Fordini y Pemphigini, agruparon juntas con un apoyo elevado (75%). A pesar de los

elevados valores de bootstrap hallados, en general, para las agrupaciones de las tribus y algunas de las subfamilias, los nodos más profundos del árbol, aquéllos que conciernen a las relaciones entre subfamilias, encontraron poco apoyo estadístico. Sólo se observó un apoyo significativo para la relación entre las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae (96%) y para la relación entre Chaitophorinae y Drepanosiphinae (74%). Los representantes de la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie (Heie, 1980) analizados en esta tesis doctoral no agruparon de manera monofilética en la topología de la figura 1.8, ya que la subfamilia Calaphidinae quedó agrupada en una posición distante de Drepanosiphinae y Chaitophorinae. Además de las dos relaciones entre subfamilias mencionadas, el árbol obtenido a partir del fragmento completo del gen *lwrh* mostró un apoyo moderado (68%) para la relación entre los representantes de las subfamilias Anoeciinae y Hormaphidinae (*Anoecia sp.* y *Cerataphis sp.*, respectivamente), grupo al cual se añadió posteriormente *Thelaxes suberi* (Thelaxinae) con un valor de bootstrap de 52%.

La eliminación de las terceras posiciones de codón de este gen no derivó, pese a la clara saturación hallada en ellas, en grandes cambios respecto a lo descrito para la secuencia completa. El apoyo estadístico fue menor para la mayoría de nodos, y las especies de la subfamilia Calaphidinae ocuparon de nuevo la posición basal del árbol. No obstante, algunos de los árboles con mejores valores de verosimilitud (con valores ligeramente peores que el correspondiente al árbol máximo verosímil) mostraron una topología en la que la subfamilia Calaphidinae resultó monofilética y, además, se agrupó junto a las subfamilias Chaitophorinae y Drepanosiphinae, revelando la monofilia de todos los representantes de la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie (Heie, 1980). Por otro lado, en algunos de estos árboles la posición basal del árbol fue ocupada por las especies de la subfamilia Lachninae. Esto también ocurrió cuando se eliminaron del análisis, además de las terceras posiciones de codón, las cuatro especies de la subfamilia Calaphidinae, aunque el apoyo estadístico para la basalidad de la subfamilia Lachninae no fue elevado y sus dos tribus no agruparon de manera monofilética (figura 1.9).

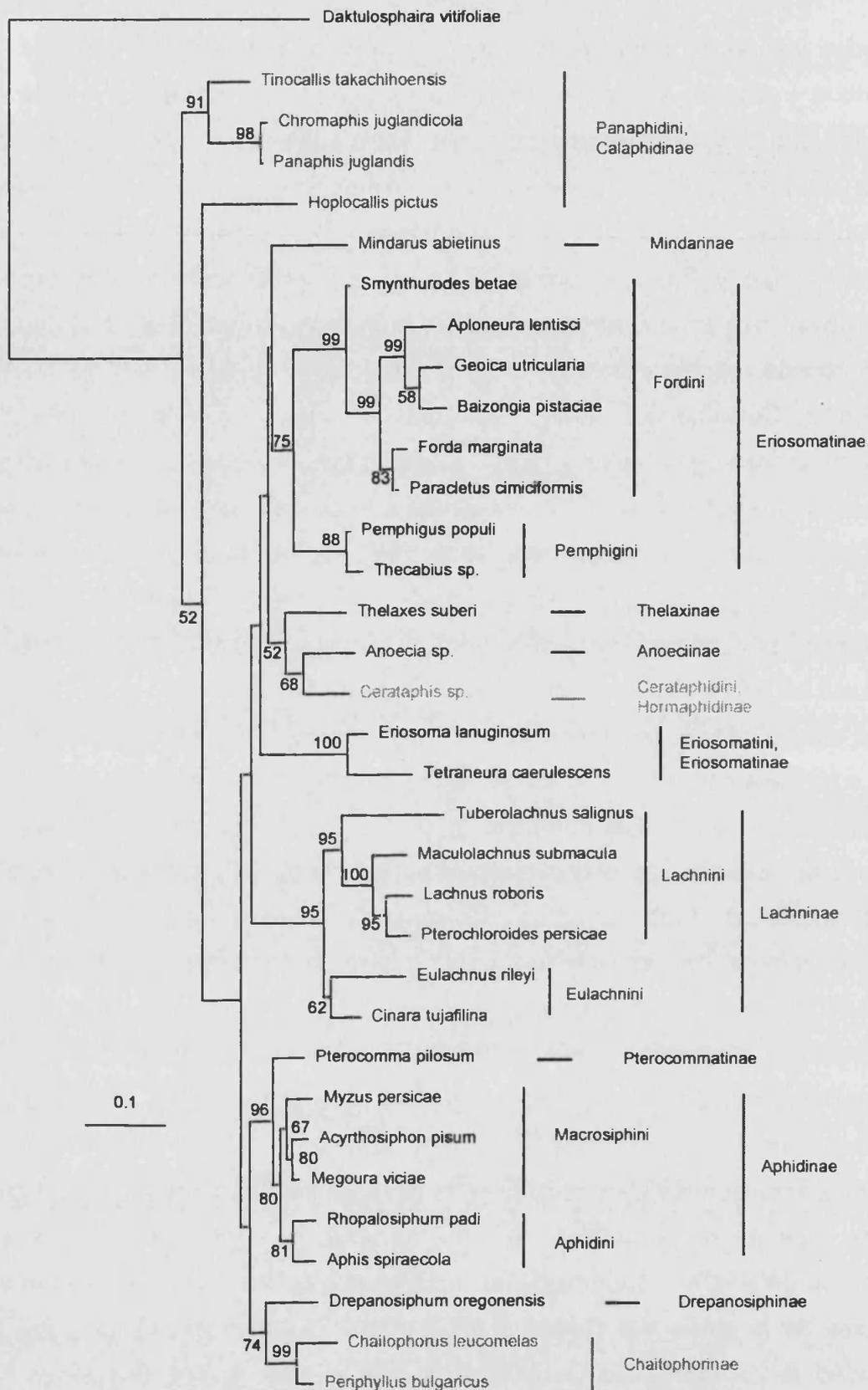


Figura 1.8. Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir de las secuencias nucleotídicas del gen *lwrh*, utilizando las estimas medias de los parámetros de los modelos incluidos en el programa Modeltest (ver Material y Métodos) y un valor de $\alpha=1'5214$. El modelo de mejor ajuste fue el TIM+I+G. Se muestran, junto a los nodos correspondientes, los valores de bootstrap obtenidos a partir de 300 pseudoréplicas, sólo cuando son mayores o iguales que 50%. Los nombres de las especies, tribus y subfamilias se muestran mediante el mismo código de color empleado en la tabla 1.1. La barra situada junto al árbol representa la longitud de rama que corresponde a una distancia de 0'1 sustituciones por sitio nucleotídico.

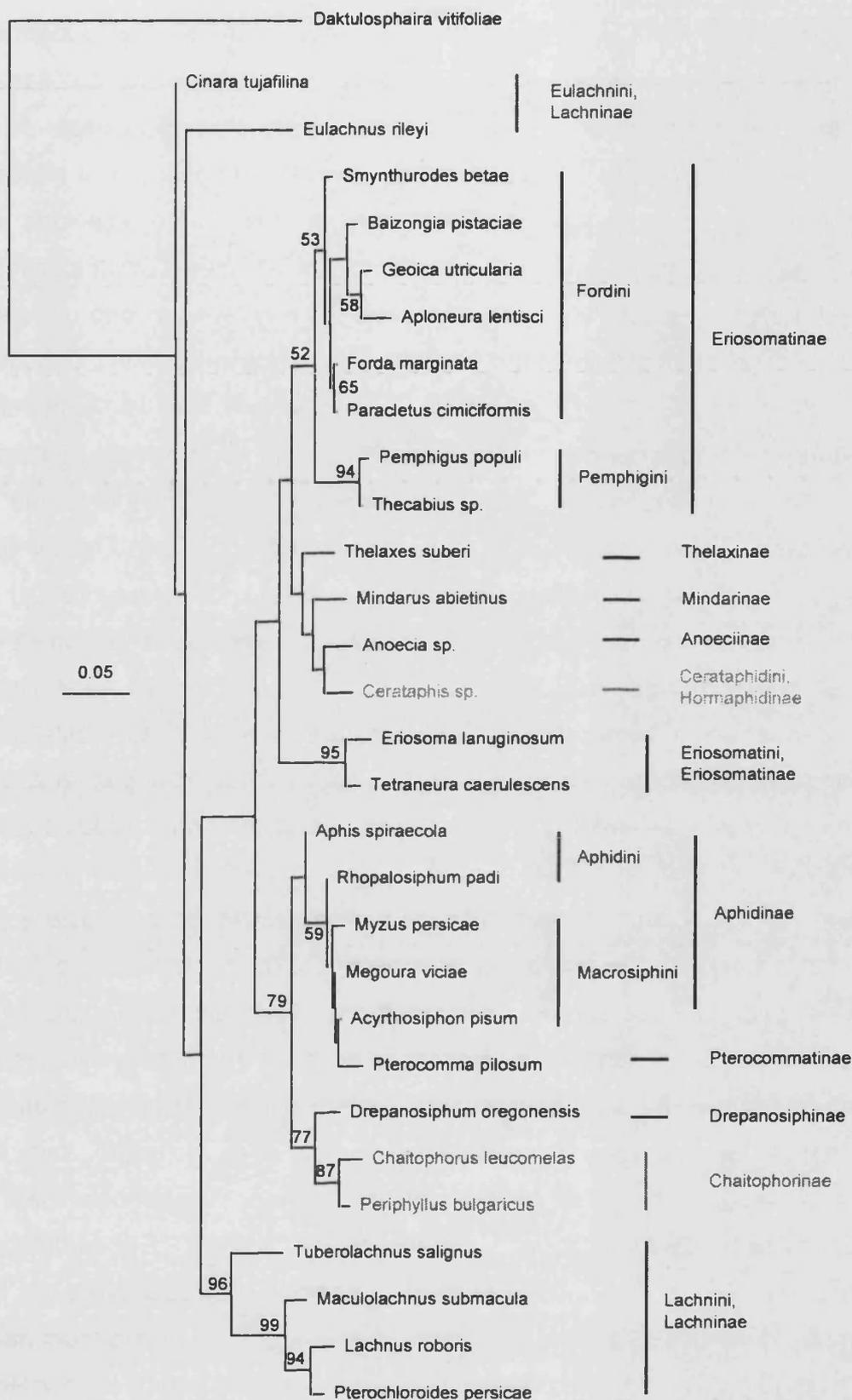


Figura 1.9. Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir de las secuencias gen *lwrh* con la eliminación de las terceras posiciones de codón y las especies de la subfamilia Calaphidinae. Se emplearon las estimas medias de los modelos y $\alpha=0.7017$ (modelo de sustitución nucleotídica de mejor ajuste: GTR+I+G). La barra situada a la izquierda del árbol indica la longitud de rama correspondiente a una distancia de 0.05 sustituciones por sitio nucleotídico.

La existencia de tasas aceleradas de evolución en la subfamilia Calaphidinae (ver apartado 4.2) podría estar provocando la colocación (discordante con las clasificaciones) de este grupo en la posición basal de la filogenia mediante un fenómeno de atracción de ramas largas con la especie externa. Por ello, además de la eliminación de las cuatro especies de Calaphidinae, se realizaron otros análisis eliminando la especie *Daktulosphaira vitifoliae*. La eliminación de la raíz en el análisis del gen *lwrh* provocó un ligero aumento general en los valores de bootstrap de las agrupaciones descritas anteriormente (figura 1.10). Además, las especies de la subfamilia Calaphidinae se agruparon de manera monofilética con un apoyo de bootstrap elevado (95%), y situándose junto a las subfamilias Chaitophorinae y Drepanosiphinae, formando así un grupo monofilético con todos los representantes de la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie (Heie, 1980). El grupo, no obstante, no se vio apoyado por valores elevados de bootstrap. El apoyo del clado formado por las especies de las subfamilias Anoeciinae, Hormaphidinae y Thelaxinae también aumentó, hasta el 65%. Es destacable que, cuando se eliminó de este análisis la especie *Mindarus abietinus*, el apoyo a este grupo llegó a ser del 75%, y del 76% a la relación entre *Anoecia sp.* y *Cerataphis sp.*

Aparte del ligero aumento generalizado en los valores de bootstrap y del cambio en la posición filogenética de Calaphidinae, la topología de la figura 1.10 muestra un resultado aún más relevante. A partir del análisis sin raíz de la secuencia del gen *lwrh*, puede definirse la existencia de tres grandes linajes de pulgones en los que se agrupan las subfamilias analizadas. Estos tres grandes linajes serán denominados en adelante como: **A+D**, formado por las subfamilias Aphidinae, Calaphidinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae y Pterocommatinae; **E+T**, con las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae, Hormaphidinae, Mindarinae y Thelaxinae; y **L**, formado exclusivamente por los representantes de la subfamilia Lachninae. El primer linaje se ha denominado A+D por incluir todas las subfamilias que en la clasificación propuesta por Heie (Heie, 1980) se hallaban agrupadas en las familias Aphididae y Drepanosiphidae (ver Introducción general, apartado 2.2). El linaje E+T recibe este nombre por incluir los representantes de la subfamilia Eriosomatinae y de

la familia Thelaxidae de la clasificación de Börner (Börner, 1952; Heie, 1980). El tercer linaje se denomina L por incluir sólo los representantes de la subfamilia Lachninae. En la figura 1.10, estos tres grandes grupos aparecen apoyados por valores estadísticos entre moderados y altos (A+D, 80%; E+T, 52%; L, 100%), los cuales aumentaron ligeramente cuando se eliminó la especie *M. abietinus* (A+D, 91%; E+T, 69%; L, 100%). Los valores fueron incluso más elevados cuando se eliminaron del análisis las terceras posiciones de codón y las especies de la subfamilia Calaphidinae y la tribu Eriosomatini (A+D, 90%; E+T, 88%; L, 100%; figura 1.11). Al eliminar de este último análisis la especie *M. abietinus*, el apoyo estadístico aumentó de nuevo ligeramente (A+D, 93%; E+T, 91%; L, 99%). Las especies de la tribu Eriosomatini ocuparon también en algunas reconstrucciones de otros genes la posición basal del árbol (ver figura 1.17), probablemente debido a problemas de atracción de ramas largas. Es importante recordar que una de las especies de la tribu Eriosomatini, *T. caerulescens*, mostró un sesgo significativo en la composición nucleotídica hacia un mayor contenido en A+T en el gen *lwrh* y cercano a la significatividad en el gen *ef1a*, coincidiendo con el sesgo de *D. vitifoliae*. Esta circunstancia podría ser la causa de una atracción entre las ramas de ambos grupos y por tanto de la colocación aberrante de esta tribu en la posición basal de algunas reconstrucciones filogenéticas.

El árbol resultante del análisis mediante máxima verosimilitud de las secuencias inferidas de aminoácidos del gen *lwrh* fue similar al hallado para las secuencias de nucleótidos. Las especies de la subfamilia Calaphidinae, excepto *Hoplocallis pictus*, ocuparon la posición basal, aunque sin un apoyo estadístico elevado. El resto de agrupaciones de la topología correspondieron a los tres linajes anteriormente definidos (excepto por la posición mencionada de la subfamilia Calaphidinae), con una relación más estrecha entre los linajes E+T y L. Ninguna de estas agrupaciones, sin embargo, se vio apoyada por valores elevados de bootstrap. El análisis filogenético realizado tras la exclusión de las especies pertenecientes a la subfamilia Calaphidinae y a la tribu Eriosomatini resultó en una topología con la subfamilia Lachninae en posición basal, aunque sin apoyo elevado (figura 1.12). Los tres grandes linajes definidos anteriormente formaron cada uno un grupo monofilético en esta

reconstrucción, con apoyos estadísticos entre moderados y altos (A+D, 96%; E+T, 54%, L, 82%). Cuando se eliminó del análisis de las secuencias de aminoácidos sólo la especie externa, *D. vitifoliae*, los tres linajes también aparecieron, con apoyos estadísticos generalmente elevados (A+D, 73%; E+T, 63%, L, 96%; ver figura 1.11), los cuales aumentaron notablemente cuando se eliminaron también las especies de la subfamilia Calaphidinae y la tribu Eriosomatini (A+D, 99%; E+T, 97%; L 100%)

Con el objetivo de conocer cual de estos tres grandes linajes es el basal en la filogenia de la familia Aphididae, y para evitar la probable atracción hacia la especie externa por parte de la subfamilia Calaphidinae y la tribu Eriosomatini, se realizaron posteriormente análisis con la siguiente restricción. Tomando como válidas las tres grandes agrupaciones observadas en los análisis sin raíz, se incluyó la especie externa y se constriñeron los análisis a mantener siempre en las topologías los 3 linajes descritos. La figura 1.13 muestra el resultado del análisis constreñido realizado sobre las posiciones primera y segunda de codón del gen *lwrh*, en el que la posición basal es ocupada por el linaje A+D, con un apoyo estadístico del 55%. Este valor fue del 68% cuando se incluyeron las terceras posiciones de codón. Aún estando constreñido a pertenecer a este linaje, las especies de la subfamilia Calaphidinae podrían ser responsables de la posición basal de éste. No obstante, la eliminación de esta subfamilia en el análisis constreñido no varió el resultado, quedando en posición basal el resto de grupos del linaje A+D.

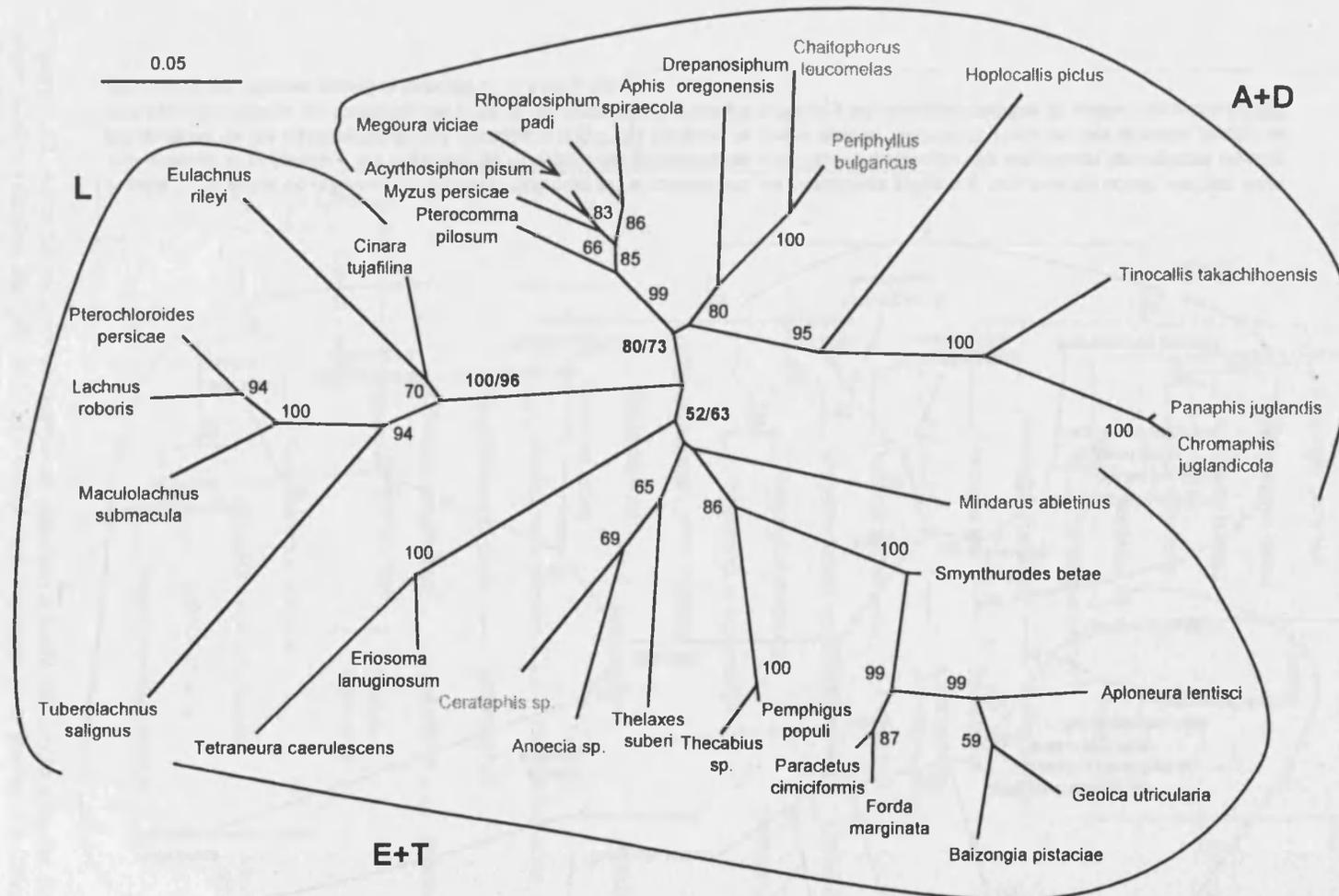


Figura 1.10. Árbol máximo verosímil sin raíz obtenido a partir de la secuencias del gen *lwrh*, empleando las estimas medias de los modelos y $\alpha=1'7019$ (modelo de mejor ajuste: K81uf+I+G). Los tres grandes linajes A+D, E+T y L (ver texto) quedan englobados por las líneas exteriores. Los valores de bootstrap de estos grupos se muestran resaltados en negra, con los valores obtenidos en el análisis de nucleótidos antes de la barra y los correspondientes al análisis análogo a partir de aminoácidos (modelo JTT) tras la barra.

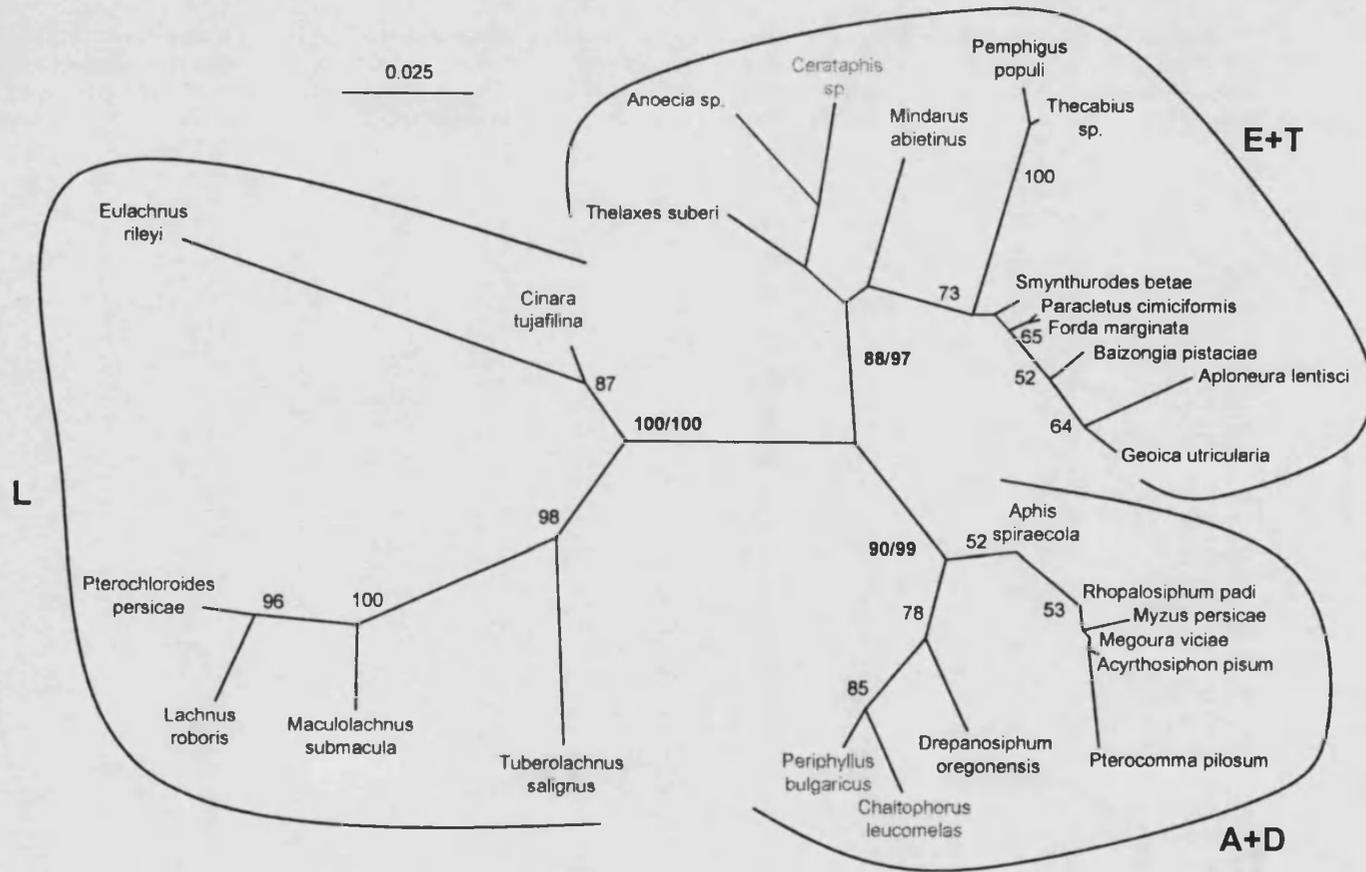


Figura 1.11. Árbol de máxima verosimilitud obtenido en el análisis de las posiciones primera y segunda de codón del gen *lwrh*, tras eliminar el outgroup y las especies de la subfamilia Calaphidinae y la tribu Eriosomatini. Se emplearon las estimas medias ponderadas de los parámetros de los modelos y $\alpha=0.7133$ (modelo de mejor ajuste: TVM+I+G). Para los tres grandes linajes se muestran los valores de bootstrap del análisis de nucleótidos antes de la barra y los correspondientes al análisis de aminoácidos eliminando las mismas especies (modelo JTT) tras la barra.

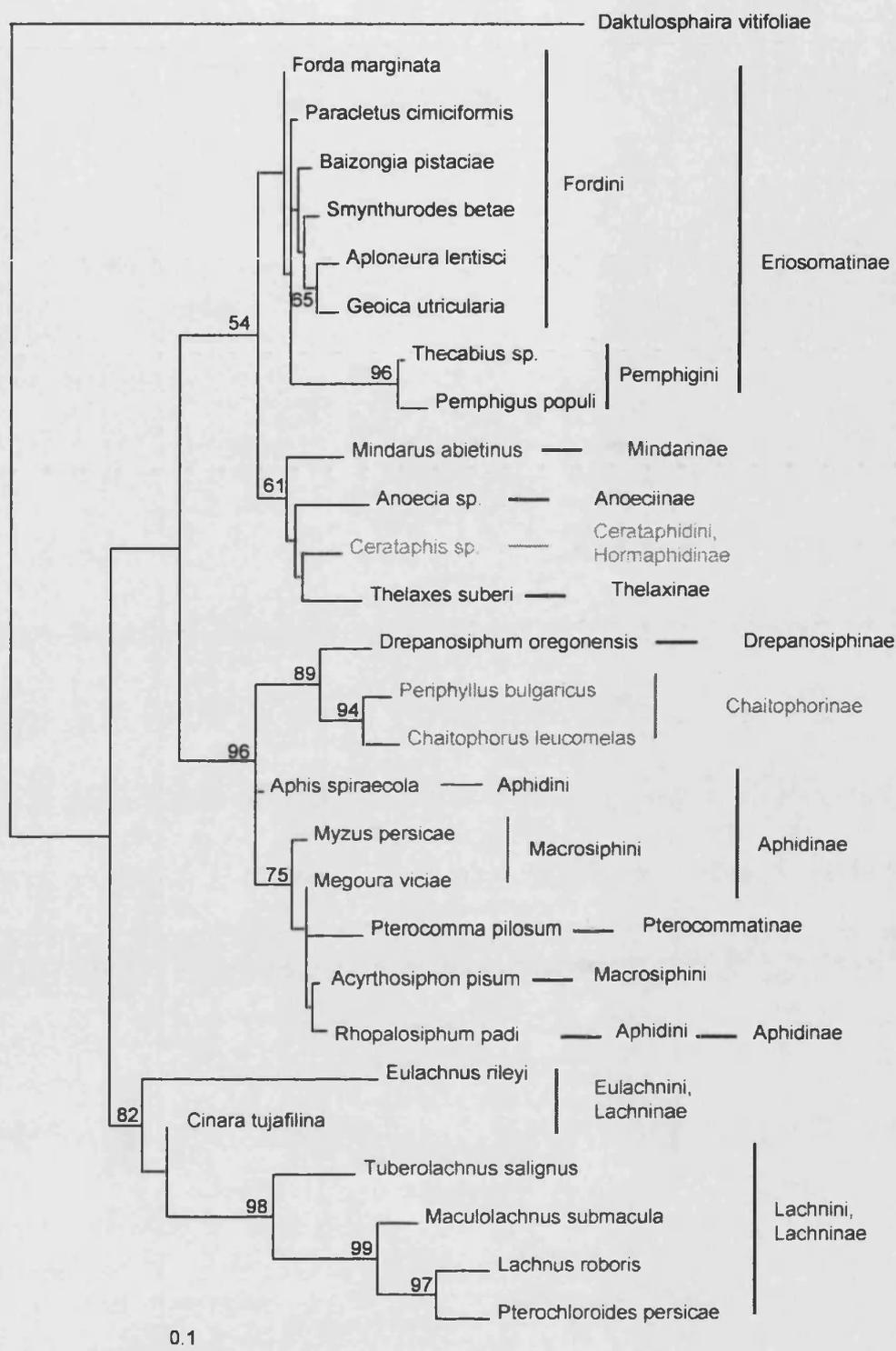


Figura 1.12. Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir del análisis de las secuencias de aminoácidos inferidas del gen *lwrh*, tras excluir las especies de la subfamilia Calaphidinae y la tribu Eriosomatini. Se muestran sobre los nodos correspondientes los valores de bootstrap mayores que 50% obtenidos tras 300 pseudorréplicas. El modelo de sustitución aminoacídica empleado fue JTT. La barra situada bajo el árbol indica la longitud de rama correspondiente a una distancia de 0.1 sustituciones por sitio aminoacídico.

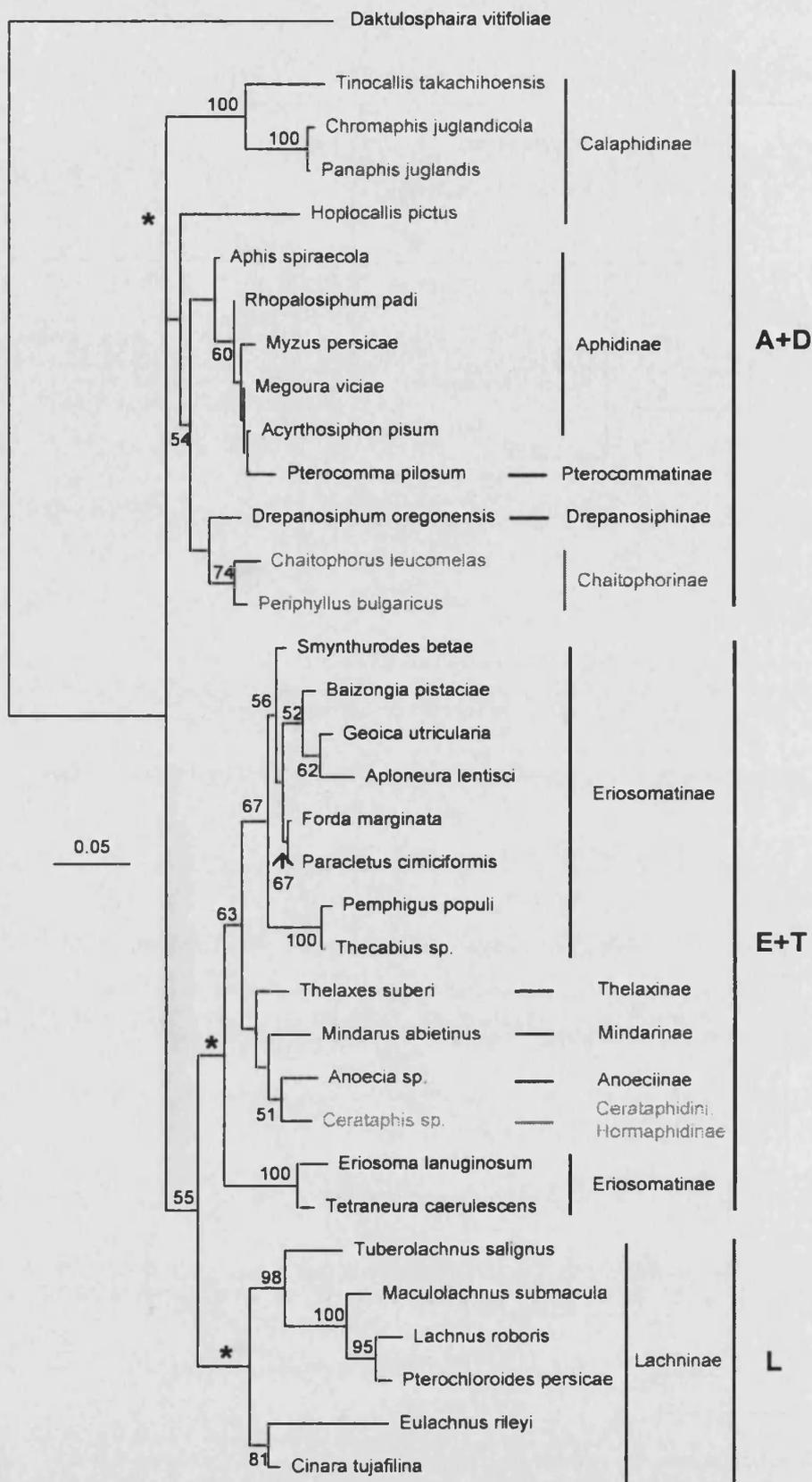


Figura 1.13. Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir de las posiciones primera y segunda del gen *lwrh* forzando a la topología a mantener los tres grandes linajes definidos a partir del análisis sin raíz (ver texto). Los asteriscos (*) indican los nodos constreñidos, que no llevan un valor de bootstrap asociado. El nodo constreñido del linaje A+D no aparece por estar colapsado debido a que la longitud de su rama es muy corta. Se emplearon las estimas medias de los modelos y $\alpha=0.6793$ (modelo de mejor ajuste: k81uf+l+G).

Gen del factor de elongación 1 α

Las reconstrucciones realizadas a partir de las secuencias del gen *ef1 α* mostraron una falta de estructura profunda más acusada que la hallada para el gen *lwrh*. En el análisis por máxima verosimilitud (figura 1.14), se observó un número menor de tribus agrupadas de manera monofilética y con un apoyo de bootstrap elevado en comparación con las reconstrucciones del gen *lwrh*, a pesar de estar representadas un número mayor. Algunas tribus monofiléticas y fuertemente apoyadas en los análisis anteriores, como Lachnini y Eulachnini de la subfamilia Lachninae, resultaron parafiléticas. Otras tribus recibieron un apoyo estadístico elevado, en términos generales (Aphidini, 99%; Macrosiphini, 59%; Eriosomatini, <50%; Fordini, 98%; Pemphigini, 92%; Nipponaphidini, 100%). El empleo de secuencias a partir de estudios previos permitió la inclusión de una nueva tribu de la subfamilia Lachninae, la tribu Tramini, cuyas especies agruparon en un clado monofilético apoyado por un valor de bootstrap de 100%. Además, las dos especies analizadas de esta tribu se agruparon junto con la especie *Tuberolachnus salignus*, perteneciente a la subfamilia Lachninae (69%). Sólo tres subfamilias con más de un representante se agruparon de manera monofilética: Calaphidinae (70%), Chaitophorinae (95%) y Hormaphidinae (<50%). Las subfamilias Lachninae y Aphidinae, que formaron grupos monofiléticos y fuertemente apoyados en general en los análisis del gen *lwrh*, agruparon de manera parafilética en el análisis por máxima verosimilitud del gen *ef1 α* . La ausencia de monofilia para la subfamilia Aphidinae se debió a la inclusión en ésta de la especie *Pterocomma pilosum*, única representante de la subfamilia Pterocommatinae, que se agrupó como especie hermana de la tribu Macrosiphini. La relación entre las tribus Fordini y Pemphigini, pertenecientes a la subfamilia Eriosomatinae, ni siquiera apareció en la topología, y cualquier relación más profunda, entre subfamilias, no se vio apoyada nunca por valores de bootstrap mayores que 50%. Pese a esta falta de resolución para los nodos más antiguos, es importante destacar que, aunque de manera parafilética, las especies de la subfamilia Lachninae ocuparon la posición basal de la filogenia, aunque con un apoyo estadístico menor que 50%.

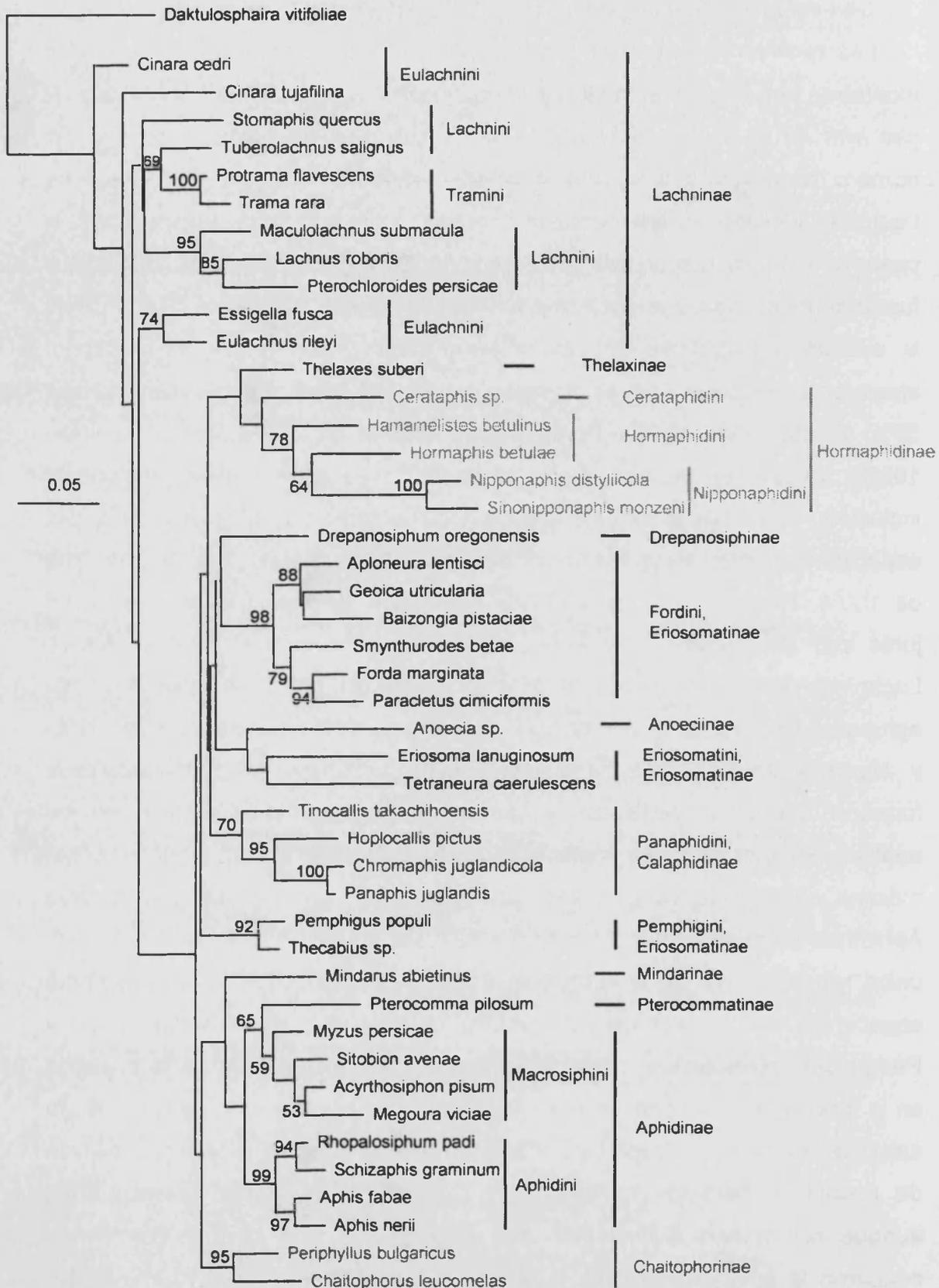


Figura 1.14. Topología máximo verosímil obtenida a partir del alineamiento de las secuencias del gen *ef1a* con el modelo de sustitución nucleotídica GTR+I+G ($\alpha=1'0407$). Se muestran los valores de bootstrap mayores que 50% obtenidos tras 300 pseudorréplicas.

La eliminación de los análisis de la especie externa *D. vitifoliae* no dio lugar a la aparición de relaciones entre subfamilias de pulgones que estuvieran apoyadas por valores estadísticos elevados (figura 1.15). Los tres grandes linajes descritos a partir del resultado del análisis sin raíz del gen *lwrh* no aparecieron en el análisis análogo sobre las secuencias del gen *ef1α*. No obstante, sí aparecieron algunas de las relaciones entre subfamilias anteriormente descritas, como la de *Thelaxes suberi* con la subfamilia Hormaphidinae o la de la subfamilia Chaitophorinae con el clado formado por *Pterocomma pilosum* y la subfamilia Aphidinae, aunque sin apoyo estadístico elevado. Otras subfamilias ocuparon posiciones dispares respecto a los resultados a partir del gen *lwrh*, aunque de nuevo sin valores elevados de bootstrap. A diferencia de los resultados obtenidos con este último gen, los análisis realizados a partir del gen *ef1α*, tanto con especie externa como sin ella, dieron lugar a la agrupación de la especie *Mindarus abietinus*, único representante de la subfamilia Mindarinae, como especie hermana del clado formado por las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae.

A pesar de estas discrepancias, aceptando como buenos los resultados del gen *lwrh*, en los que se apoyaba fuertemente la agrupación de las especies analizadas en tres linajes, se realizaron sobre las secuencias del gen *ef1α* análisis constreñidos a mantener estos grupos a la vez que se incluyó la especie externa. Con estas condiciones, algunos grupos relevantes vieron aumentado su apoyo estadístico. En concreto, la monofilia de la subfamilia Hormaphidinae llegó a tener un apoyo de bootstrap de 81% y la de la subfamilia Calaphidinae un 90%. La relación filogenética entre las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae presentó un apoyo de 92%, aumentando también el bootstrap asociado a la relación entre *Pterocomma pilosum* y las especies de la tribu Macrosiphini (72%). No obstante, el resultado más notorio es probablemente que, en esta ocasión, fue la subfamilia Lachninae la que ocupó la posición basal del árbol filogenético, con un apoyo estadístico del 100% (figura 1.16).

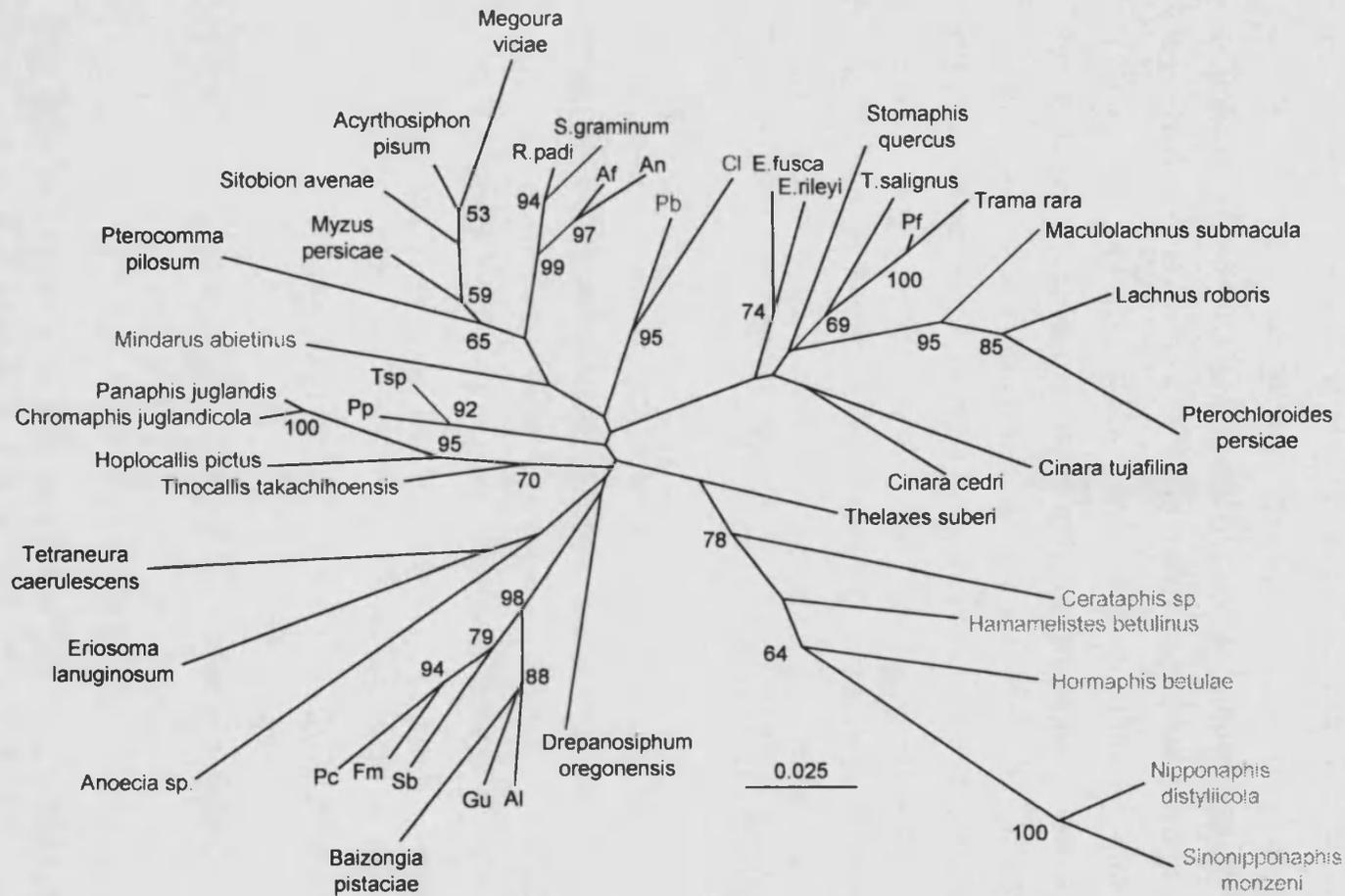


Figura 1.15. Árbol de máxima verosimilitud obtenido a partir del gen *ef1a* al eliminar la especie externa, utilizando el modelo GTR+I+G ($\alpha=1'0888$). Por cuestiones de espacio, algunos de los nombres genéricos han sido abreviados y algunos de los nombres de las especies se han reducido: Pf, *Protrama flavescens*; Cl, *Chaitophorus leucomelas*; Pb, *Periphyllus bulgaricus*; An, *Aphis nerii*; Af, *Aphis fabae*; Tsp, *Thecabius sp.*; Pp, *Pemphigus populi*; Pc, *Paracletus cimiciformis*; Fm, *Forda marginata*; Sb, *Smynthuroides betae*; Gu, *Geoica utricularia*; Al, *Aploneura lentisci*. Junto a los nodos se muestran aquellos valores de bootstrap superiores a 50%.

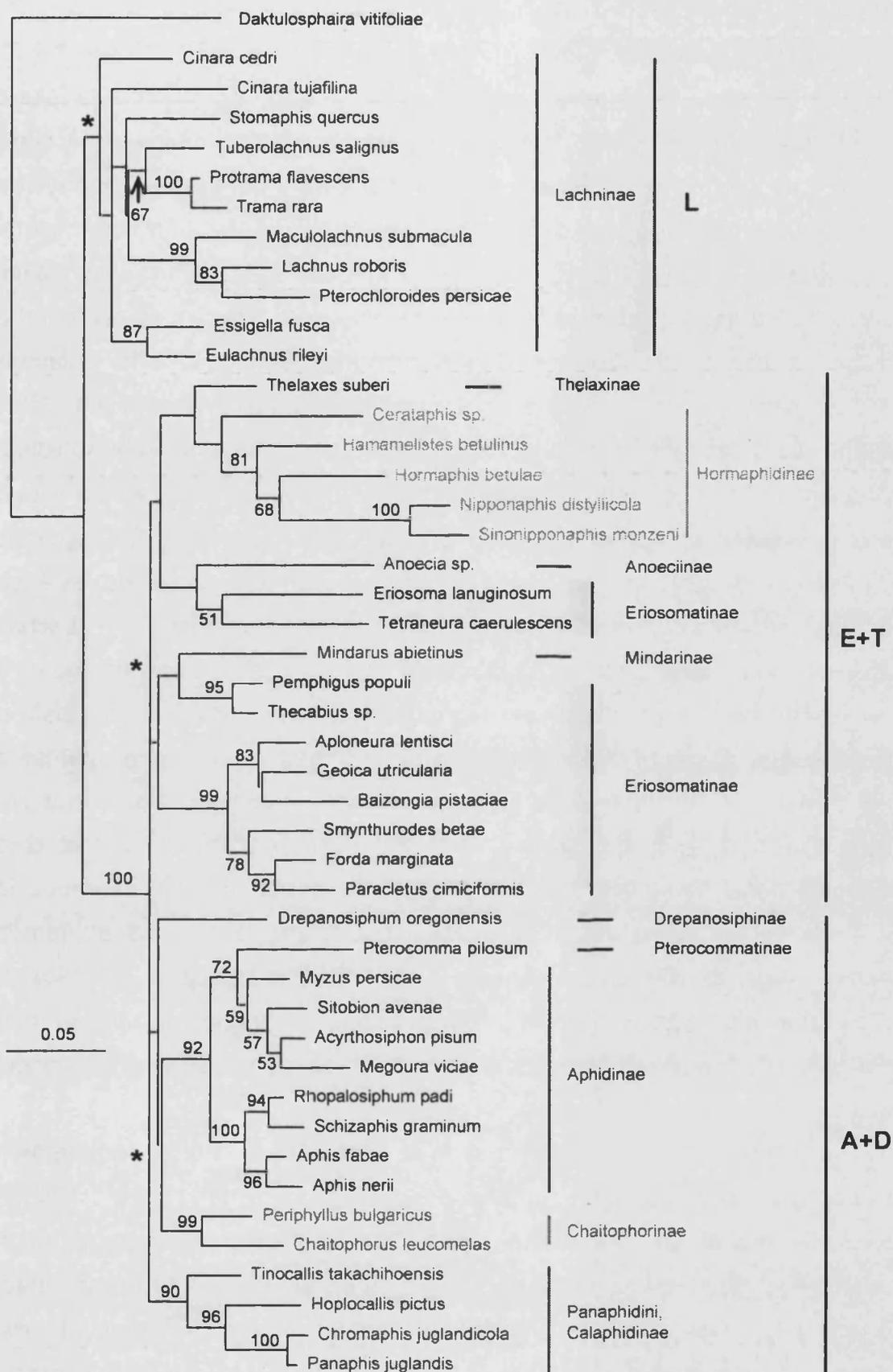


Figura 1.16. Topología máximo verosímil obtenida en el análisis del gen *ef1a* con la restricción de los tres grandes linajes (ver texto) y mediante el modelo de sustitución nucleotídica GTR+I+G ($\alpha=1'0072$). Se muestran los valores de bootstrap mayores que 50%. Los asteriscos (*) indican los nodos constreñidos del análisis. Los nodos constreñidos de los linajes A+D y E+T no aparecen debido a la escasa longitud de sus respectivas ramas.

Gen de la subunidad 6 de la ATPasa-F

Los genes mitocondriales no fueron una excepción en cuanto a la falta de resolución para los niveles más profundos del árbol filogenético de la familia Aphididae. De hecho, el número de grupos apoyado por valores de bootstrap mayores que 50% fue más bajo, incluso en los niveles taxonómicos menores. La figura 1.17 muestra la topología resultante del análisis mediante máxima verosimilitud de la secuencia completa del gen *atp6*. Algunas de las tribus de pulgones fuertemente apoyadas en los anteriores resultados, como Eulachnini o Macrosiphini, ni siquiera aparecen agrupadas de manera monofilética. Sólo la subfamilia Calaphidinae presentó un apoyo superior al 50%, aunque Aphidinae, Chaitophorinae y Lachninae agruparon monofiléticamente. Pese a esta falta de apoyo, algunas de las relaciones entre subfamilias halladas en los resultados de los genes nucleares se vieron refrendadas en el análisis de este gen mitocondrial. Las tribus Eriosomatini, Fordini, Pemphigini y Lachnini aparecieron como grupos monofiléticos, aunque las tres primeras, miembros de la subfamilia Eriosomatinae, no agruparon juntas. Las dos especies de Eriosomatini ocuparon la posición basal de la filogenia. Los representantes de las subfamilias Chaitophorinae y Drepanosiphinae también agruparon juntos, pero alejados de la subfamilia Calaphidinae, no apareciendo así el taxón definido por Heie (1980) como familia Drepanosiphidae. Otra agrupación interesante fue la de las tres especies representantes de las subfamilias Anoeciinae (*Anoecia sp.*), Hormaphidinae (*Cerataphis sp.*) y Thelaxinae (*Thelaxes suberi*), grupo que también apareció en los árboles obtenidos a partir del gen *lwrh*, aunque en la reconstrucción obtenida a partir del gen mitocondrial el apoyo estadístico fue menor del 50%.

La eliminación de la tercera posición de codón del gen *atp6*, aparentemente saturada, no redundó en un aumento del apoyo a los nodos (figura 1.18). Más bien al contrario, un número aún menor de nodos encontró un apoyo mayor que 50%, y algunas agrupaciones como la de las subfamilias Chaitophorinae y Drepanosiphinae, o la que incluía los representantes de las subfamilias Anoeciinae, Hormaphidinae y Thelaxinae, desaparecieron. La tribu Eriosomatini se agrupó con la subfamilia Lachninae, abandonando la posición basal del árbol, que fue ocupada por las especies de las subfamilias Chaitophorinae y

Drepanosiphinae. Por otro lado, en las figuras 1.17 y 1.18 puede observarse que la especie *Mindarus abietinus*, único representante de la subfamilia Mindarinae, quedó agrupada a partir de los datos moleculares de este gen junto al clado formado por las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae. Aunque esta relación tiene un apoyo de bootstrap menor que 50%, es destacable que esta relación aparece también en los resultados obtenidos con las secuencias del gen nuclear *ef1 α* (ver figuras 1.14 a 1.16). Además, esta posición discrepa con la que esta especie ocupa en los análisis del gen *lwrh*, en los que se posicionó junto con las subfamilias incluidas en el linaje E+T, con apoyos estadísticos en ocasiones superiores al 88% (ver la figura 1.11).

El resultado más destacable obtenido en el análisis de las secuencias de aminoácidos fue la posición basal que ocupó la subfamilia Lachninae en la topología resultante de la reconstrucción mediante máxima verosimilitud (figura 1.19). La posición de esta subfamilia, no obstante, no se vio apoyada por valores de bootstrap elevados.

La eliminación de la especie externa de los análisis no alteró de manera notable los resultados descritos, ni en las reconstrucciones realizadas a partir de nucleótidos ni en las correspondientes a aminoácidos. Los tres grandes linajes descritos en los resultados del gen *lwrh* no aparecieron para el gen *atp6*. No obstante, dado el elevado apoyo que esos grupos recibieron en el análisis del gen nuclear al eliminar la especie externa (ver figuras 1.10 y 1.11), también se realizaron análisis constreñidos a partir de este gen mitocondrial con la asunción de la validez de la existencia de los linajes A+D, E+T y L. En la figura 1.20 puede apreciarse que, tal y como ocurrió en el análisis constreñido del gen *ef1 α* , y a diferencia del resultado obtenido con el gen *lwrh*, el análisis constreñido de las secuencias nucleotídicas correspondientes al gen *atp6* resultó en la posición basal de las especies de la subfamilia Lachninae. Este resultado vino acompañado de un elevado apoyo de bootstrap tanto para el gen completo (99%) como cuando se consideran sólo las dos primeras posiciones de codón (77%).

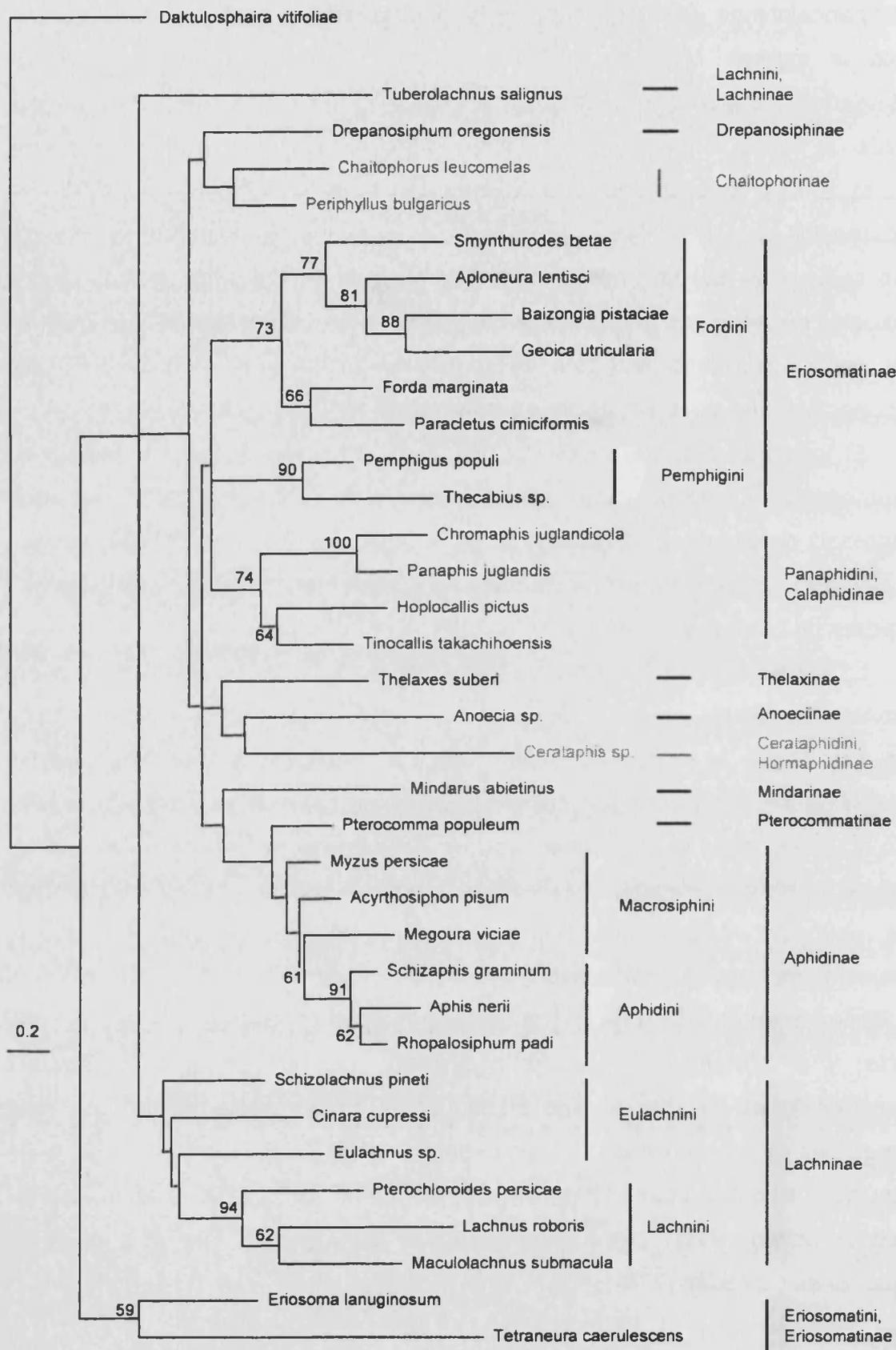


Figura 1.17. Árbol máximo verosímil resultante del análisis de las secuencias del gen mitocondrial *atp6* con el modelo de evolución TVM+I+G ($\alpha=0.4219$). Se muestran, junto a los nodos, los valores de bootstrap superiores al 50%.

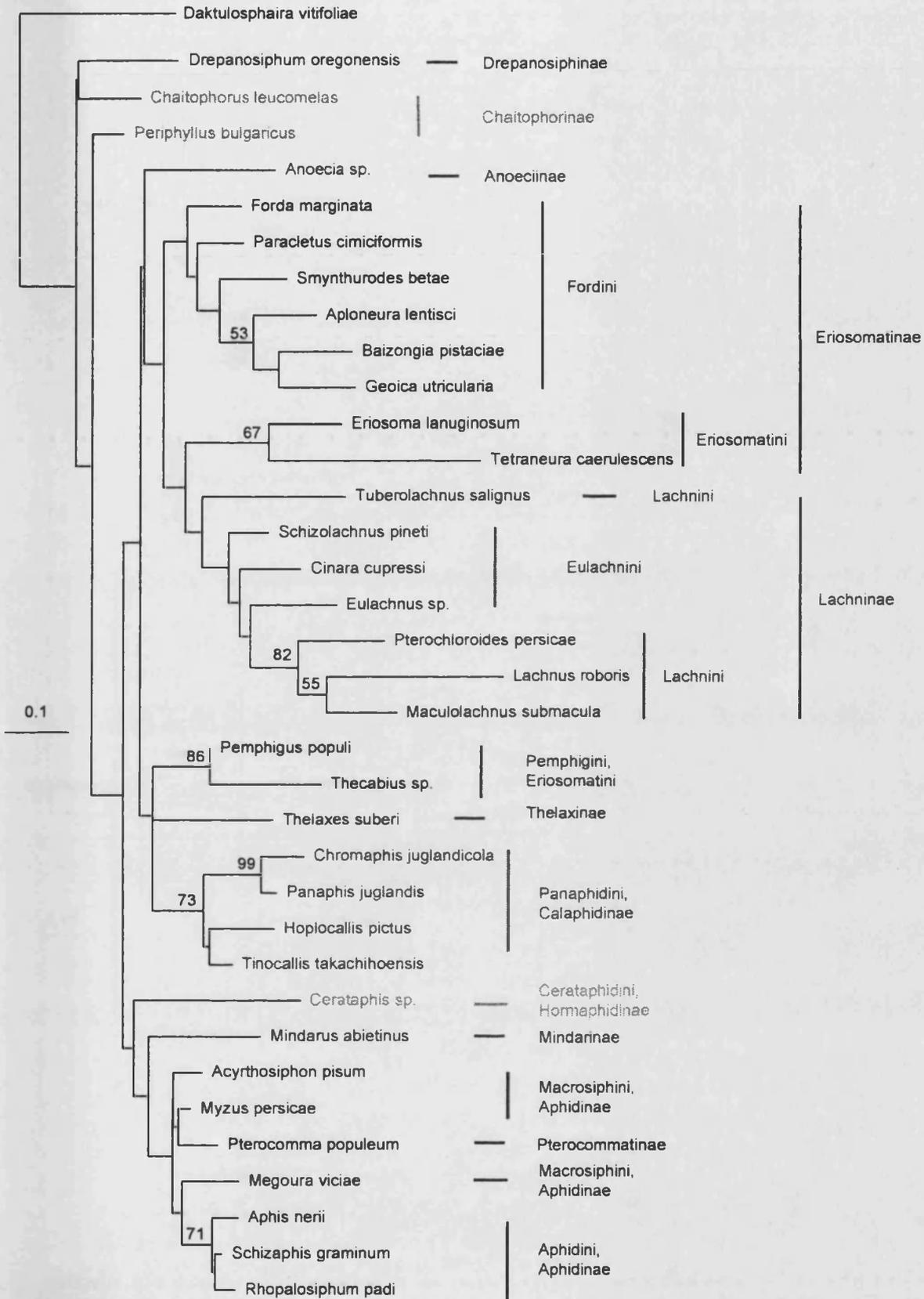


Figura 1.18. Topología máximo verosímil obtenida a partir del análisis de las posiciones primera y segunda del gen *atp6*, utilizando las estimas medias de los modelos y un valor de $\alpha=0.4247$ (modelo de mejor ajuste: TVM+I+G). Se muestran los valores de bootstrap mayores que 50%.

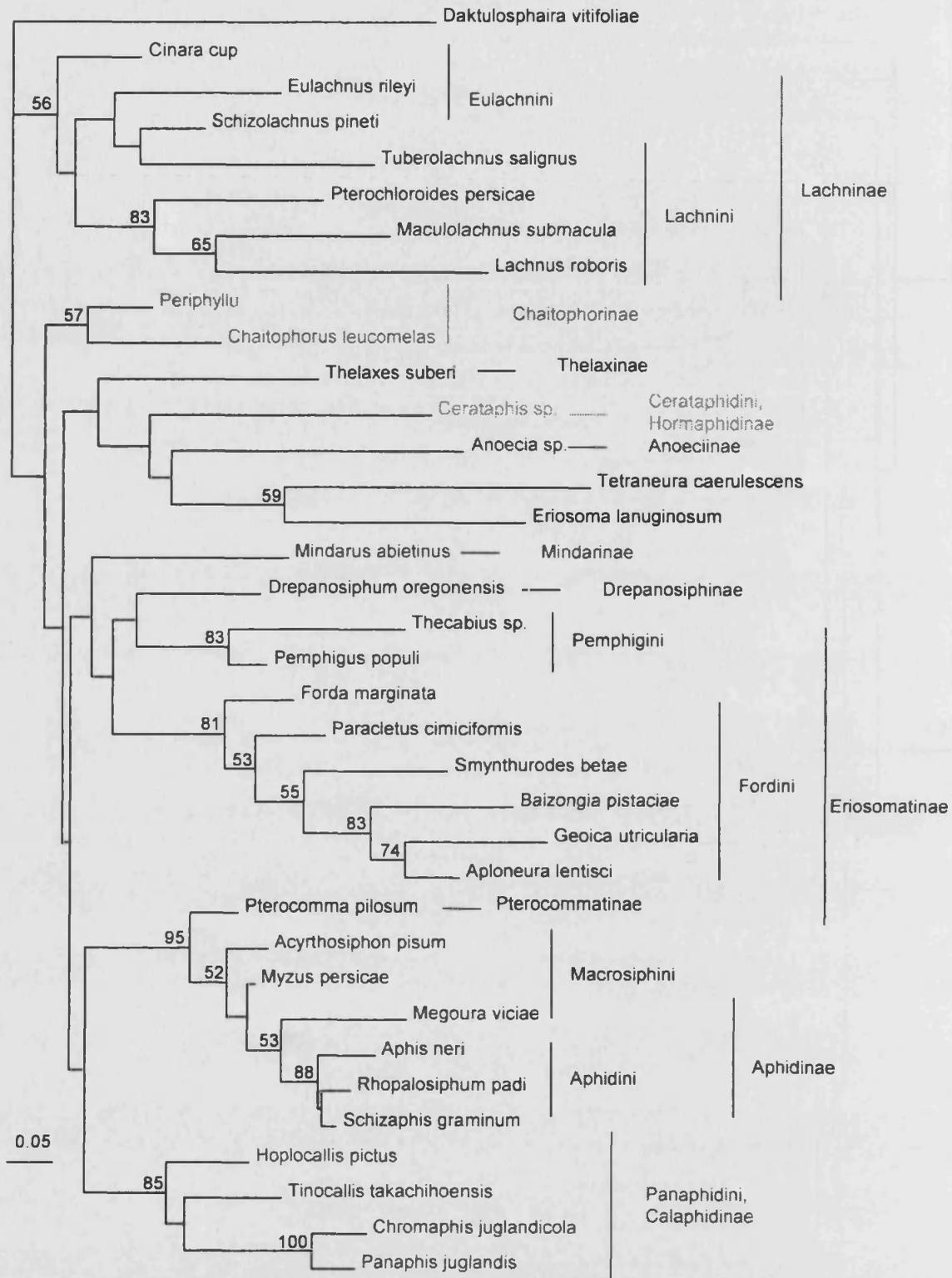


Figura 1.19. Árbol filogenético obtenido en el análisis de las secuencias de aminoácidos inferidas del gen *atp6* mediante máxima verosimilitud. El modelo de sustitución aminoacídica empleado fue MtMam. Se muestran aquellos valores de bootstrap superiores a 50%.

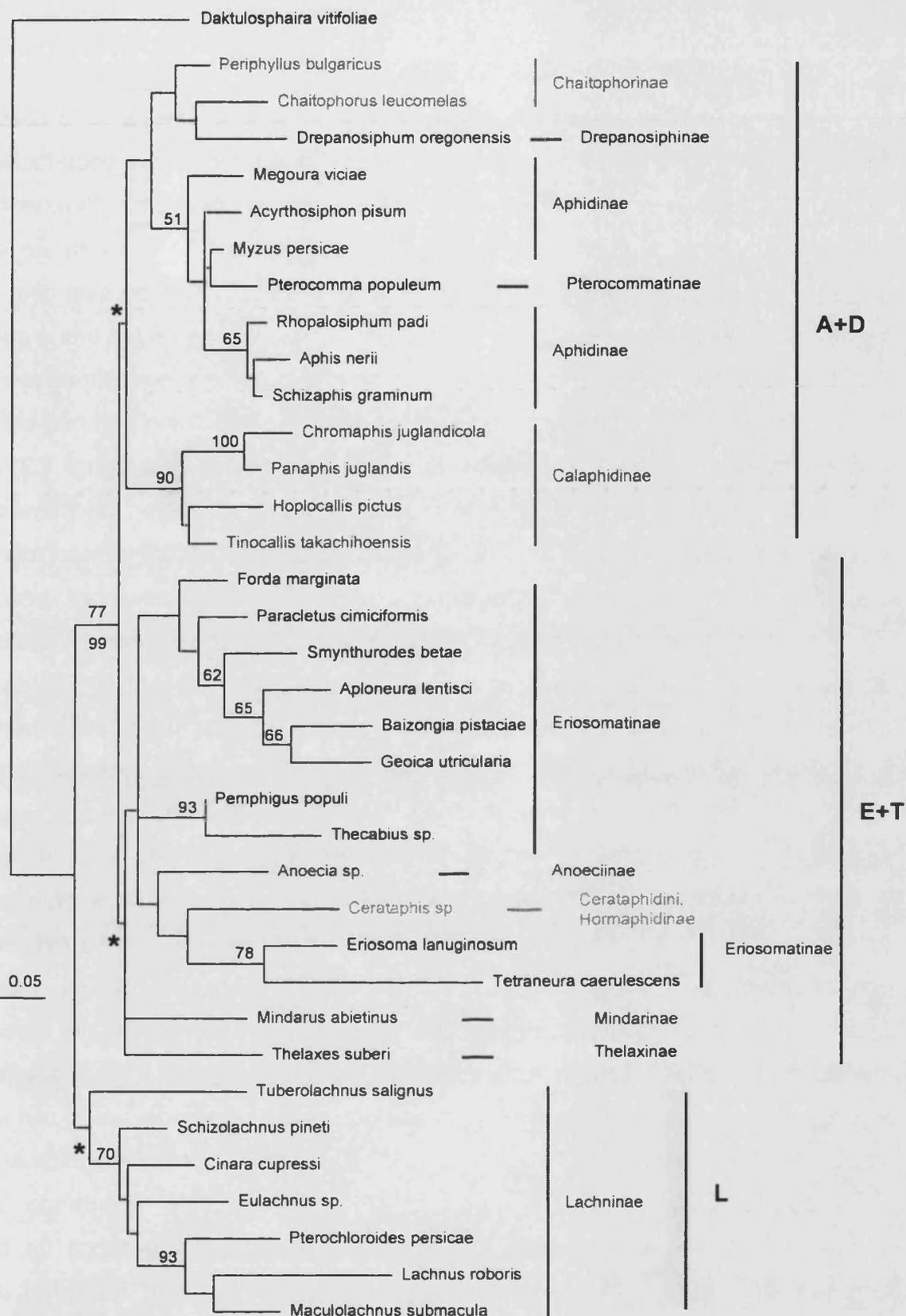


Figura 1.20. Árbol filogenético obtenido en el análisis por máxima verosimilitud de las secuencias del gen *atp6*, utilizando sólo las posiciones primera y segunda de codón y forzando la topología a mantener los tres grandes linajes obtenidos en las reconstrucciones sin especie externa del gen *lwrh* (ver texto). Se emplearon las estimas medias de los modelos y $\alpha=0.3943$ (modelo de mejor ajuste: TVM+I+G). La topología resultante en el análisis de las tres posiciones de codón fue prácticamente idéntica. Para el nodo que agrupa los linajes A+D y E+T se muestra el valor de bootstrap obtenido en el análisis de todas las posiciones bajo la rama, de sólo las posiciones primera y segunda sobre la rama. Los asteriscos (*) indican los nodos constreñidos del análisis, que no llevan un valor de bootstrap asociado.

Gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa

El bajo número de grupos con apoyos estadísticos superiores a 50 también fue característico en las reconstrucciones obtenidas a partir de las secuencias recopiladas del gen mitocondrial *coll*. Esta particularidad ocurrió principalmente en los nodos más profundos de las topologías (figuras 1.21 a 1.23). En la filogenia resultante del análisis de todas las posiciones de codón de este gen, y de manera similar a lo que ocurriera con el gen *atp6*, algunas de las tribus que aparecieron como monofiléticas y con elevados apoyos en las reconstrucciones de los genes nucleares no aparecieron en los árboles obtenidos a partir de este gen mitocondrial, como Macrosiphini, Eulachnini o Lachnini (ver figura 1.21). Otras tribus con más de una especie representante sí agruparon de manera monofilética, como Aphidini, Fordini, Pemphigini, Cerataphidini, Hormaphidini, Nipponaphidini y Tramini. No obstante, de entre éstas, sólo las tribus Pemphigini y Tramini tuvieron apoyos mayores que 50%. Las especies de esta última tribu se agruparon, de nuevo con un valor estadístico elevado (89%), con otra especie de la tribu Lachnini, *Nippolachnus piri*. Tampoco fueron superiores a 50% los apoyos de las subfamilias que aparecieron como monofiléticas: Aphidinae, Chaitophorinae, Eriosomatinae y Lachninae. A diferencia de lo que ocurriera en las reconstrucciones obtenidas a partir de los dos genes nucleares y del gen mitocondrial *atp6*, en los análisis del gen *coll* la subfamilia Eriosomatinae sí resultó monofilética. Sin embargo, para este gen no existen por el momento secuencias correspondientes a especies de la tribu Eriosomatini, grupo responsable de que subfamilia Eriosomatinae no fuese monofilética en las reconstrucciones de los otros genes. La especie *Pterocomma populifoliae* (subfamilia Pterocommatinae) agrupó de nuevo con la subfamilia Aphidinae, y dos de las tribus de la subfamilia Hormaphidinae, Hormaphidini y Nipponaphidini, formaron un clado conjunto, quedando la tercera tribu de esta subfamilia, Cerataphidini, en la posición basal de la filogenia (ver figura 1.21). Las especies de esta tribu también ocuparon la posición basal en la reconstrucción mediante máxima verosimilitud obtenida a partir del alineamiento de las secuencias inferidas de aminoácidos, aunque en ninguno de los casos el apoyo estadístico para esta posición superó el 50%.

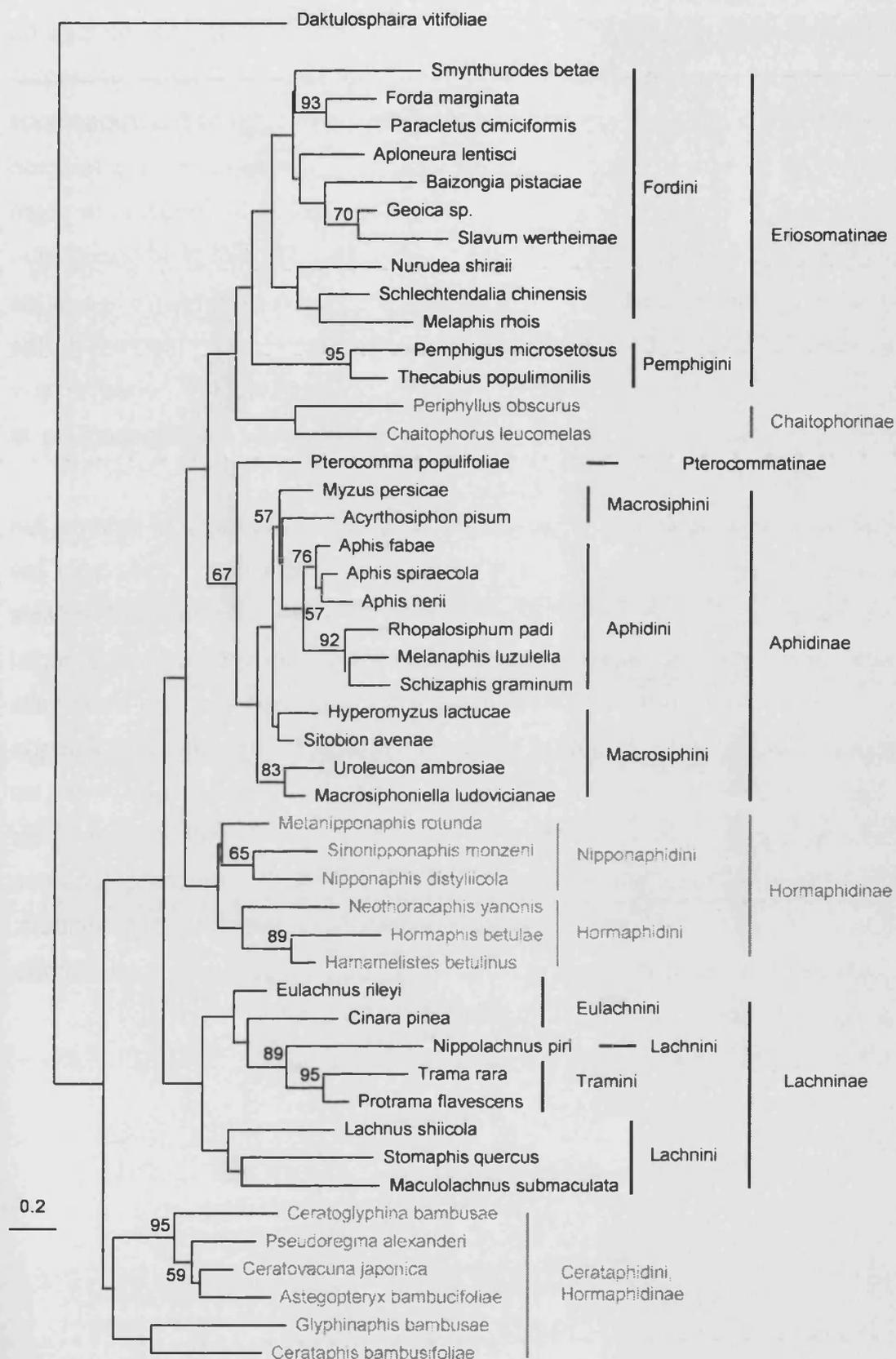


Figura 1.21. Reconstrucción filogenética obtenida por máxima verosimilitud a partir de las secuencias del gen mitocondrial *coII* utilizando las estimas medias de los modelos y $\alpha=0.3656$ (modelo de mejor ajuste: TVM+I+G). Junto a los nodos se muestran aquellos valores de bootstrap superiores a 50% obtenidos tras 300 pseudorréplicas.

La eliminación de las terceras posiciones de codón de las secuencias no mejoró los apoyos estadísticos a los grupos, sino que en términos generales los disminuyó, y además provocó la desaparición de algunas agrupaciones monofiléticas como las de las tribus Cerataphidini y Hormaphidini o la relación entre Fordini y Pemphigini (ver figura 1.22). La pérdida de información también podría ser responsable de la agrupación de la especie *Pterocomma populifoliae* entre las especies de la tribu Macrosiphini. Esta posición es similar a la que los representantes de la subfamilia Pterocommatinae ocuparon en algunas de las reconstrucciones realizadas a partir de las secuencias de los genes *ef1a* y *atp6*. La posición basal de la filogenia siguió ocupada por las especies de la tribu Cerataphidini.

Las relaciones descritas no variaron mucho cuando la especie externa fue eliminada de los análisis, tanto para toda la secuencia como para sólo las posiciones primera y segunda. Es destacable, no obstante, que en el análisis sin raíz de las posiciones primera y segunda de codón la tribu Cerataphidini agrupó con el resto de tribus de Hormaphidinae, apareciendo esta subfamilia como monofilética, aunque con un apoyo estadístico menor que 50%. Aunque los tres grandes linajes descritos a partir del análisis del gen *lwrh* no aparecieron en los análisis del gen *coll* tras eliminar la especie externa, se realizaron también reconstrucciones constreñidas a mantener estos grupos con este gen. Tanto considerando la tercera posición de codón como eliminándola, los análisis constreñidos resultaron en la posición basal de la subfamilia Lachninae, con apoyos de bootstrap moderados (figura 1.23).

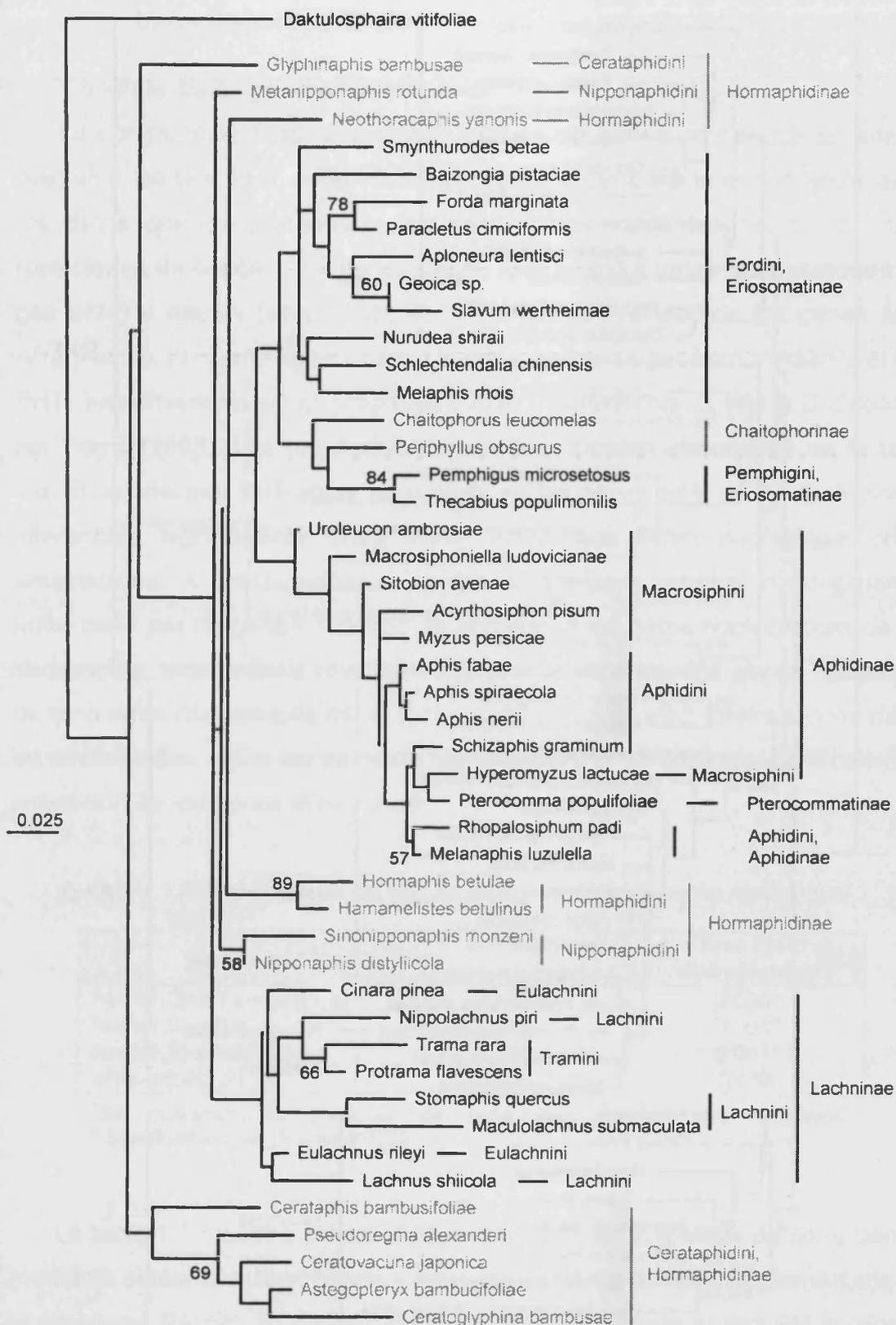


Figura 1.22. Árbol filogenético resultante del análisis por máxima verosimilitud de las posiciones primera y segunda de codón del gen *coll*, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica GTR+I+G ($\alpha=0.3980$). Se muestran los valores de bootstrap mayores que 50%.

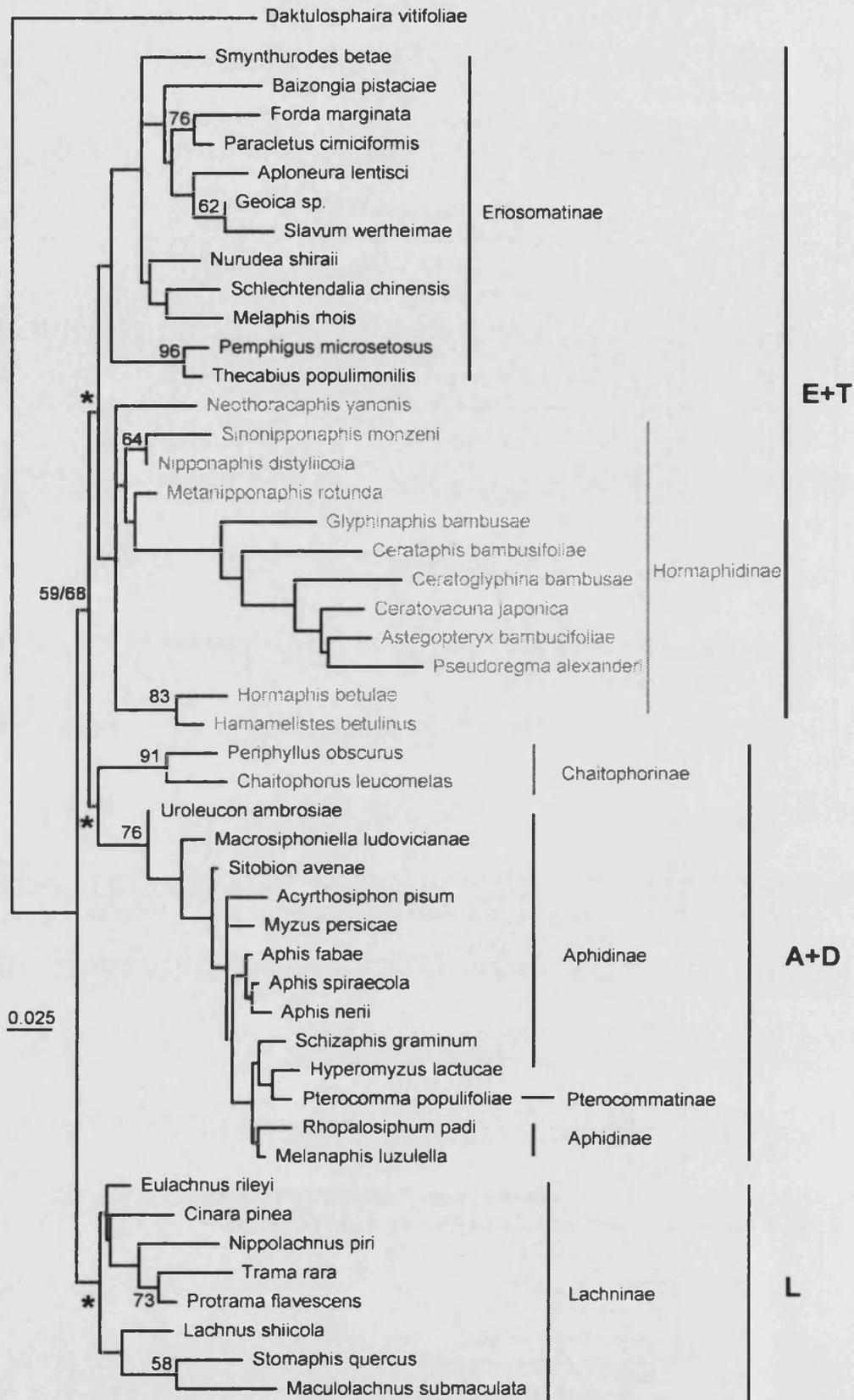


Figura 1.23. Topología máximo verosímil obtenida a partir de las posiciones primera y segunda del gen *coll* con la constricción de los tres grandes linajes (ver texto) y utilizando las estimas medias de los modelos, con $\alpha=0.3656$ (modelo de mejor ajuste TVM+I+G). Se muestran los valores de bootstrap mayores que 50%. Para el nodo que agrupa los linajes A+D y E+T se muestra el valor de bootstrap de las posiciones primera y segunda antes de la barra, el correspondiente al análisis de todas las posiciones tras la barra. Los asteriscos (*) indican los nodos constreñidos.

b) Análisis combinado

Congruencia filogenética entre genes

La congruencia filogenética entre tres de los genes empleados se analizó mediante los test PHT y SH. Concretamente, se estudió la congruencia entre los datos que se pretendían combinar en los conjuntos de datos ntLEA (posiciones de codón 1 y 2 de los genes *lwrh* y *atp6* y todas las posiciones del gen *ef1α*) y aaLEA (secuencias de aminoácidos inferidas de los genes *lwrh*, *ef1α* y *atp6*). Inicialmente se analizó la congruencia filogenética mediante el test PHT, implementado en el programa PAUP*, equivalente al test ILD diseñado por Farris (1995). Los resultados de este test pueden observarse en la tabla 1.6. El uso del test PHT sobre el conjunto de los genes *lwrh*, *ef1α* y *atp6* mostró diferencias significativas entre ellos, empleando tanto nucleótidos como aminoácidos. A continuación, se repitió el test para estudiar la congruencia entre cada par de genes. Cuando se emplearon los datos nucleotídicos de las secuencias, este análisis reveló incongruencia entre los dos genes nucleares, pero no entre cada uno de éstos y el gen mitocondrial *atp6*. Utilizando los datos de aminoácidos, todos los pares de genes mostraron diferencias significativas a excepción de los genes *ef1α* y *atp6*.

Tabla 1.6. Resultado de los test de congruencia entre genes mediante el test PHT¹.

Genes	Test PHT nucleótidos	Test PHT aminoácidos
<i>lwrh</i> (1,2)- <i>ef1α</i> - <i>atp6</i> (1,2)	0'002*	0'030*
<i>lwrh</i> (1,2)- <i>ef1α</i>	0'001*	0'001*
<i>lwrh</i> (1,2)- <i>atp6</i> (1,2)	0'092	0'001*
<i>ef1α</i> - <i>atp6</i> (1,2)	0'898	0'858

¹Se muestran los p-valores de cada uno de los test realizados.

* Significativo a un nivel de $\alpha=0'05$.

La tabla 1.7 muestra los resultados obtenidos en el análisis de congruencia mediante el test SH (Shimodaira y Hasegawa, 1999), también implementado en el programa PAUP*. El análisis de congruencia mediante el test SH implica la comparación de dos topologías alternativas, resultantes del análisis de las secuencias de dos genes, utilizando como datos el alineamiento de uno de

ellos. Todas las comparaciones mostraron diferencias significativas, con independencia del alineamiento elegido como datos y de la pareja de árboles comparada.

A pesar de las incongruencias encontradas entre las secuencias analizadas, se utilizaron los datos obtenidos a partir de los tres genes en un análisis combinado (ver Discusión para más detalle).

Tabla 1.7. Test SH para el análisis de la congruencia entre genes¹.

Alineamiento	Arbol		
	<i>lwrh</i> (1,2)	<i>ef1α</i>	<i>atp6</i> (1,2)
<i>lwrh</i> (1,2)	-	0'000*	0'000*
<i>ef1α</i>	0'000*	-	0'000*
<i>atp6</i> (1,2)	0'000*	0'009*	-

¹Se muestran los p-valores de cada test realizado. * Significativo a un nivel de $\alpha=0'05$.

Análisis combinado de los conjuntos de datos ntLEA y aaLEA

Los resultados obtenidos tras la reconstrucción filogenética a partir del conjunto de datos combinados ntLEA, que contenía las posiciones primera y segunda de codón de los genes *lwrh* y *atp6* y todas las posiciones del gen *ef1α*, fueron mucho más similares a los obtenidos en el análisis independiente del gen *lwrh* que a los de las otras secuencias estudiadas. Las discrepancias topológicas entre los árboles obtenidos con los distintos genes y la incongruencia detectada entre algunos de ellos no han impedido que en el análisis combinado aparezcan algunas relaciones importantes detectadas en el análisis del gen *lwrh*. En la figura 1.24 puede observarse el resultado de la reconstrucción mediante máxima verosimilitud obtenida a partir del conjunto de datos ntLEA, considerando las 34 especies para las que se pudo reunir los tres genes. La topología fue prácticamente idéntica en el análisis mediante inferencia bayesiana, aunque discrepó en algunas de las relaciones más profundas en los análisis obtenidos por máxima parsimonia y neighbor-joining. El árbol resultante del análisis por máxima verosimilitud (ver figura 1.24) mostró una topología en la que los tres grandes linajes anteriormente descritos pueden apreciarse salvo por dos excepciones. Por un lado, las especies de la subfamilia Lachninae ocuparon, aunque sin apoyo estadístico elevado, la

posición basal de la filogenia, pero no se agruparon de manera monofilética. Si lo hicieron, no obstante, en el correspondiente árbol de bootstrap, con un apoyo del 75%. La segunda excepción consistió en la posición de la tribu Eriosomatini, que se añadió al árbol justo después de las especies de Lachninae, de nuevo alejada del resto de especies representantes de la subfamilia Eriosomatinae. Tras la subfamilia Lachninae y la tribu Eriosomatini, apareció en el árbol un nodo que unió los linajes A+D y E+T (excluyendo Eriosomatini), con bajo apoyo estadístico tanto para esta relación como para la monofilia de cada linaje. El linaje A+D se vio apoyado por un valor de bootstrap de 58% (y una probabilidad *a posteriori* de 90% en el árbol obtenido mediante inferencia bayesiana). En este linaje, por un lado, la especie *Pterocomma sp.* se unió junto a la subfamilia Aphidinae, no rompiendo su monofilia como ocurrió en algunos de los análisis independientes de genes. La subfamilia Aphidinae no se vio fuertemente apoyada por valores estadísticos, pero cada una de sus dos tribus sí recibieron un apoyo de bootstrap del 100%. Por otro lado, apareció un grupo formado por todos los representantes de la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie, en el que la subfamilia Calaphidinae quedó como grupo hermano del clado formado por las subfamilias Chaitophorinae y Drepanosiphinae. El linaje E+T tampoco recibió un fuerte apoyo, así como ninguna de las relaciones internas entre subfamilias o tribus, en el árbol de máxima verosimilitud. Sin embargo, en el árbol de inferencia bayesiana el grupo se vio apoyado por una probabilidad *a posteriori* de 98%, la agrupación de las tribus Fordini y Pemphigini por un 99%, y la relación entre las especies de las subfamilias Anoeciinae, Hormaphidinae y Thelaxinae recibió una probabilidad también de 99%. La posición de *Mindarus abietinus* fue más congruente con la observada en las reconstrucciones del gen *lwrh*, en las que también se agrupó en el linaje E+T, que con las halladas para los genes *ef1 α* y *atp6*, en los que se posicionó junto a las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae. En la figura 1.24 esta especie quedó situada junto a las dos tribus de la subfamilia Eriosomatinae, aunque sin un apoyo estadístico elevado. En el resultado del análisis por inferencia bayesiana la especie de la subfamilia Mindarinae quedó agrupada en una tricotomía con los clados de las tribus Fordini y Pemphigini, por un lado, y de las especies *Anoecia sp.*, *Cerataphis sp.* y *Thelaxes suberi*, por otro.

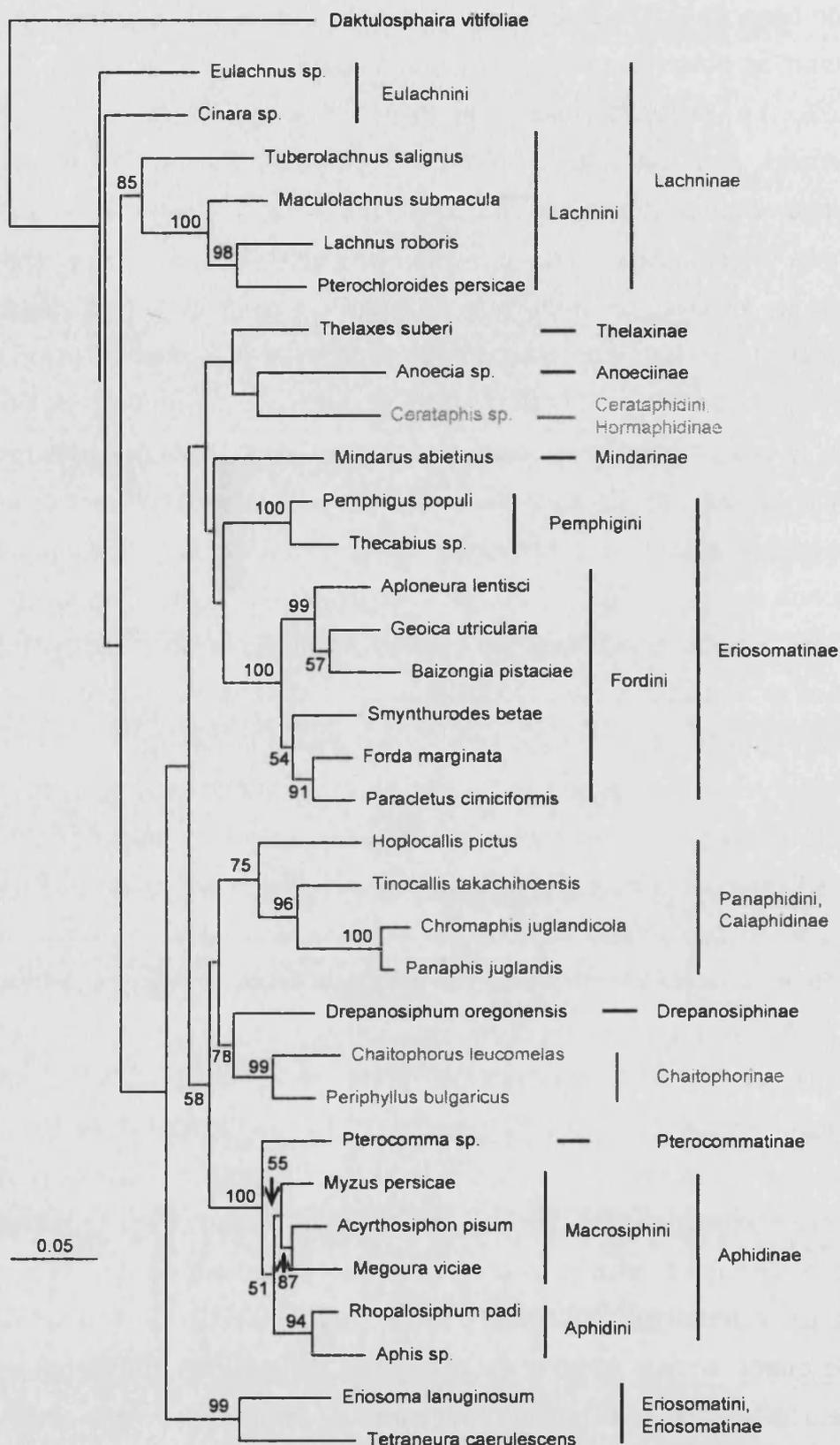


Figura 1.24. Árbol resultante de la reconstrucción por máxima verosimilitud a partir del conjunto de datos ntLEA mediante el modelo de sustitución nucleotídica GTR+I+G ($\alpha=0.7094$). Junto a los nodos se muestra aquellos valores de bootstrap mayores que 50% de un total de 300 pseudorréplicas. La barra junto al árbol indica la longitud de rama que se corresponde con una distancia de 0.05 sustituciones por sitio nucleotídico.

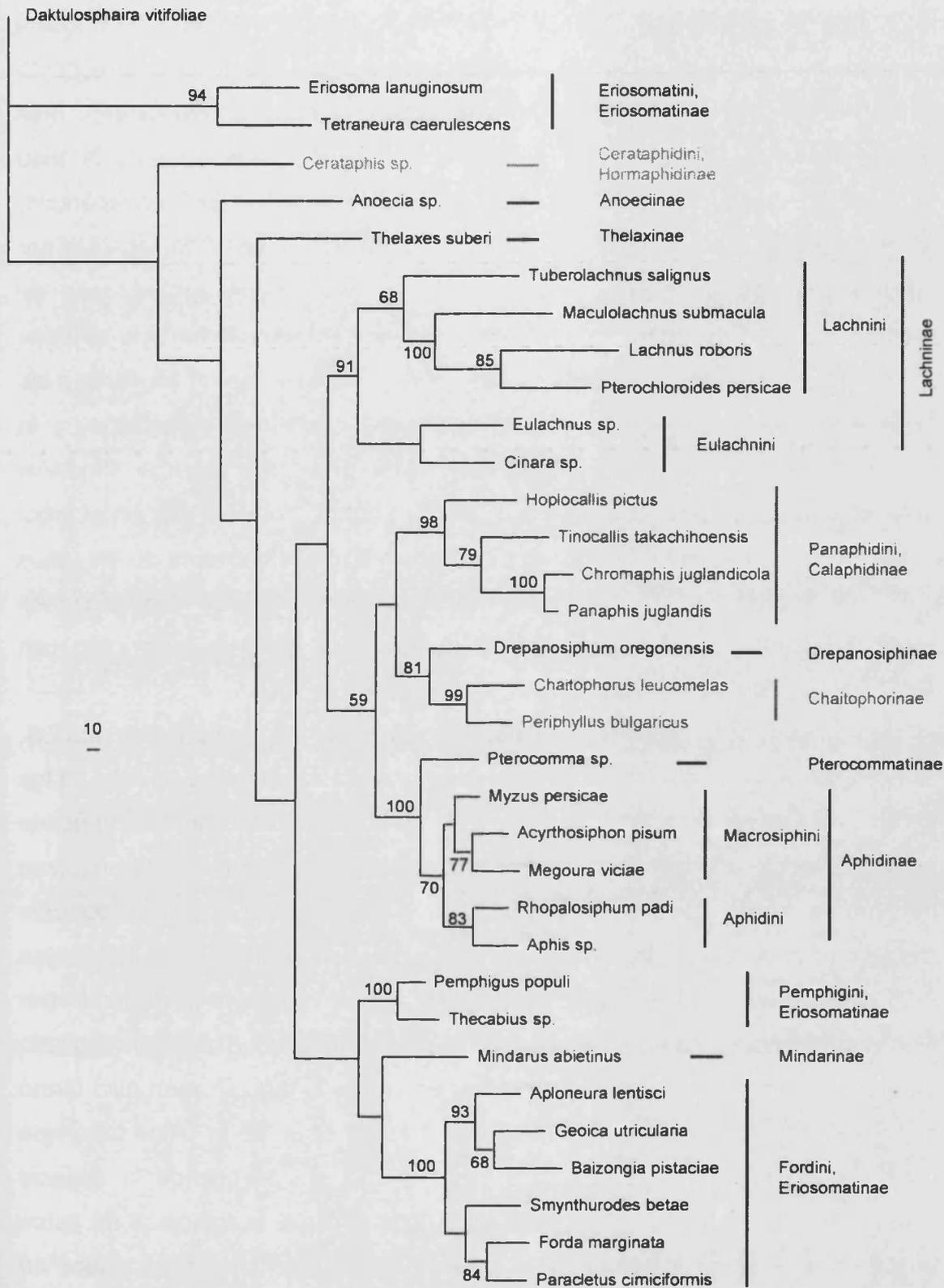


Figura 1.25. Uno de los dos árboles máximo parsimónicos obtenidos en el análisis del conjunto de datos combinados ntLEA. La topología alternativa era idéntica salvo por la agrupación monofilética de las especies *Anoecia sp.* y *Cerataphis sp.* Se muestran, sobre los nodos correspondientes, el valor de bootstrap a partir de 2000 pseudorréplicas, cuando es mayor que 50%

Los análisis filogenéticos realizados mediante los métodos de máxima parsimonia y neighbor-joining dieron lugar a resultados algo diferentes respecto a los nodos más profundos de las topologías, aunque las relaciones más recientes fueron prácticamente idénticas. Mediante ambos métodos la tribu Eriosomatini ocupó la posición basal del árbol y el linaje E+T desapareció, permaneciendo los linajes L y A+D (figura 1.25). En el caso del análisis por máxima parsimonia, los integrantes del linaje E+T fueron agrupándose de manera sucesiva en el árbol tras la tribu Eriosomatini, probablemente atraídos a estas posiciones por ella. Otras relaciones más internas fueron similares a las observadas en la figura 1.24, con la subfamilia Lachninae monofilética y la aparición de la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie. La especie *Mindarus abietinus* apareció aquí agrupada con la tribu Fordini, mientras que en el árbol obtenido mediante neighbor-joining quedó como especie hermana de las tribus Fordini y Pemphigini, mostrando así variación en la posición filogenética en función del método de reconstrucción, aunque siempre agrupada junto con clados del linaje E+T.

El análisis del conjunto de datos combinados de aminoácidos aaLEA, consistente en la combinación de las secuencias aminoacídicas inferidas de los genes *lwrh*, *ef1a* y *atp6*, dio lugar a resultados idénticos en cuanto a los nodos más profundos en las reconstrucciones por máxima verosimilitud, máxima parsimonia e inferencia bayesiana. La tribu Eriosomatini ocupó la posición basal, tras la cual se agrupó la subfamilia Lachninae y, por último, los linajes A+D y E+T (excluyendo la tribu Eriosomatini). Únicamente la reconstrucción por neighbor-joining a partir de las secuencias de aminoácidos dio como resultado un árbol filogenético distinto (figura 1.26), en el que la tribu Eriosomatini formó parte del linaje E+T, el cual fue basal en el árbol. Ésta fue la única topología obtenida en la que aparecieron los tres grandes linajes cuando la especie externa se incluyó y el análisis no estaba constreñido a la aparición de estos tres grupos. Aunque los linajes A+D y L se vieron fuertemente apoyados en esta reconstrucción, ni el linaje E+T ni su basalidad recibieron apoyos de bootstrap superiores a 50.

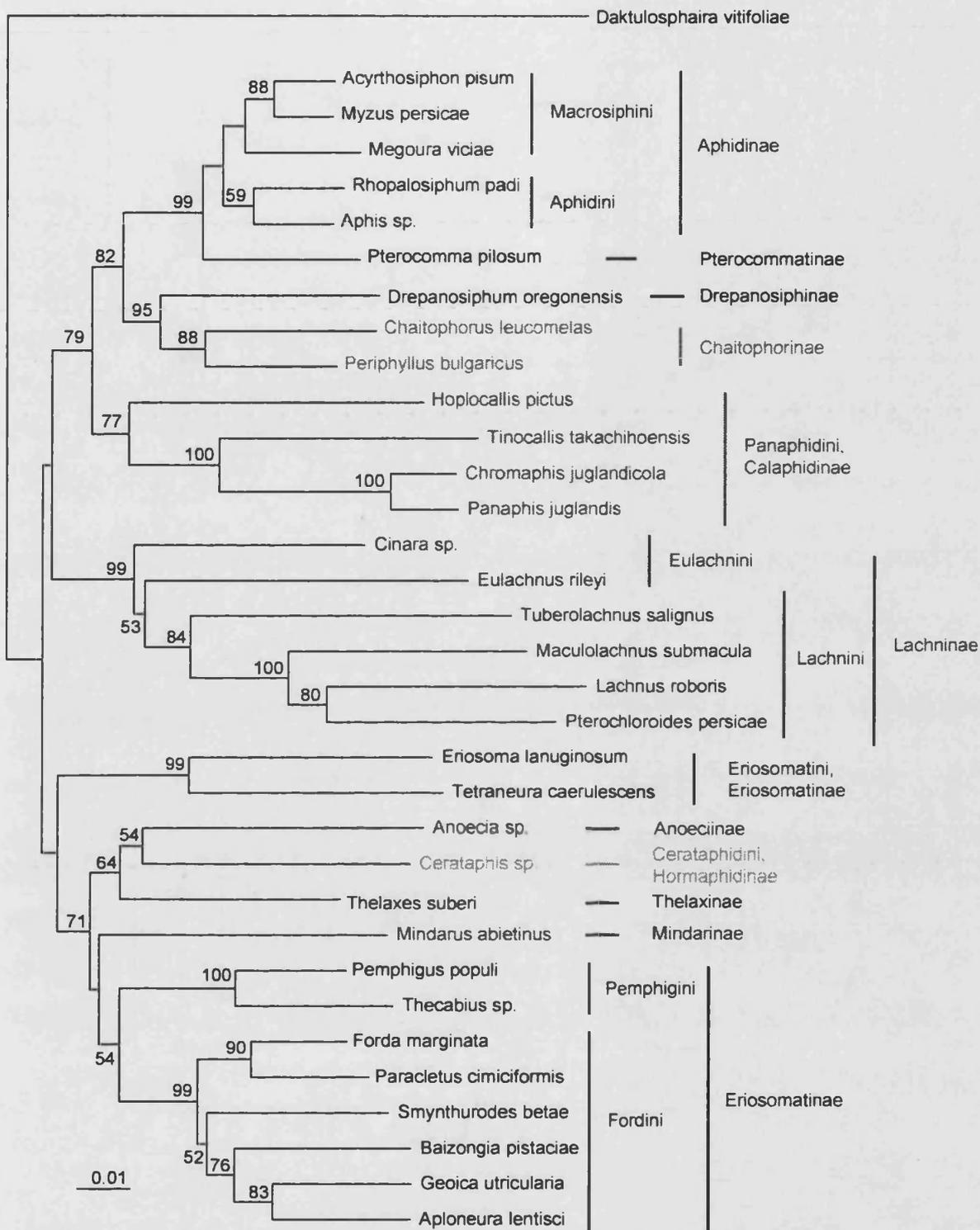


Figura 1.26. Árbol obtenido mediante el algoritmo neighbor-joining a partir de las distancias aminoacídicas corregidas con el modelo de sustitución JTT para el conjunto de datos aaLEA. Se muestran aquellos valores de bootstrap mayores que 50% resultantes de las 300 pseudorréplicas realizadas.

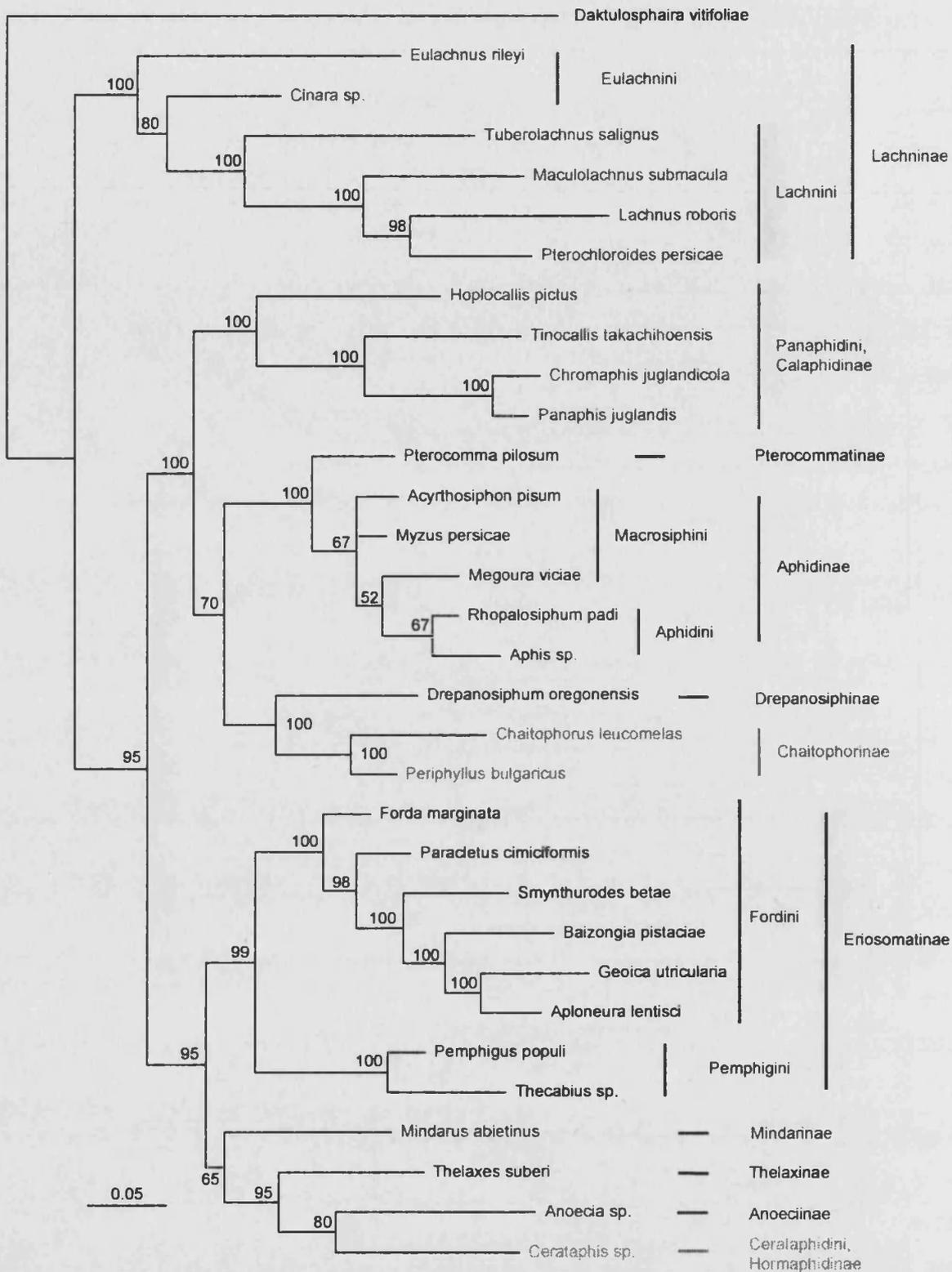


Figura 1.27. Árbol de inferencia bayesiana del conjunto de datos aaLEA, considerando tres particiones correspondientes a los tres genes concatenados y excluyendo las especies de la tribu Eriosomatini. Junto a los nodos se muestra la probabilidad a posteriori resultante del consenso de los últimos 3750 árboles muestreados.

Los sesgos en composición nucleotídica detectados en la tribu Eriosomatini (ver apartado 4.1.b) podrían ser responsables de la posición incongruente con las clasificaciones de esta tribu en las reconstrucciones, en muchas ocasiones basal y siempre distante del resto de representantes de su subfamilia. Por este motivo, se realizaron algunos análisis excluyendo este grupo. El resultado general fue el posicionamiento basal de la subfamilia Lachninae y la aparición de los otros dos grandes linajes, aunque el apoyo estadístico para el nodo más profundo no fue siempre elevado. Llegó a ser de un 95% en la probabilidad *a posteriori* del árbol obtenido por inferencia bayesiana a partir del conjunto aaLEA (figura 1.27). Aparte de la basalidad de la subfamilia Lachninae, esta reconstrucción produjo algunas relaciones particulares y discrepantes con los resultados anteriores, como la parafilia de la tribu Eulachnini o la desaparición del clado congruente con la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie, el cual apareció, por el contrario, como un grupo parafilético. Por otro lado, *Mindarus abietinus* quedó agrupada junto al clado correspondiente a las subfamilias Anoeciinae, Hormaphidinae y Thelaxinae, abundando en la falta de estabilidad en la posición filogenética de esta especie. Los resultados obtenidos en las reconstrucciones mediante inferencia bayesiana, tanto en la reconstrucción mostrada en la figura 1.27 como en general, no discreparon topológicamente en función del número de particiones utilizadas (ver apartado 3.7.b). Las discrepancias entre los resultados obtenidos utilizando distinto número de particiones se limitaron a cambios en algunos valores de las probabilidades *a posteriori*. Todos los árboles mostrados resultantes de análisis por inferencia bayesiana corresponden a análisis con una partición por gen.

Otra aproximación analítica realizada para intentar eliminar las posibles atracciones entre algunos grupos y la especie externa fue la eliminación de esta última. A partir de los datos combinados de nucleótidos y mediante todos los métodos de reconstrucción, el análisis sin raíz resultó en la aparición de los mismos cuatro grupos principales observados en la reconstrucción con raíz, a saber: la tribu Eriosomatini, la subfamilia Lachninae, el linaje A+D y el linaje E+T excluyendo los Eriosomatini. En cualquiera de los casos, los apoyos estadísticos para los dos primeros grupos fueron del 100%. El linaje A+D se vio fuertemente apoyado en todas las condiciones, mientras que el apoyo del linaje

E+T fue variable (figura 1.28). La topología de los cuatro grupos apareció también en las reconstrucciones a partir del conjunto aaLEA cuando éste se analizó mediante máxima verosimilitud o inferencia bayesiana. Sin embargo, su análisis mediante máxima parsimonia o neighbor-joining volvió a agrupar la tribu Eriosomatini en la posición basal del linaje E+T, mostrando así los tres grandes linajes (figura 1.29). La fiabilidad de, al menos, algunas de las relaciones definidas dentro de estos tres grandes linajes, es realmente elevada, ya que la eliminación de la especie externa y de las tribus aparentemente más problemáticas resulta en un apoyo muy alto para cada uno de estos tres grupos con cualquiera de los métodos de reconstrucción filogenética (figura 1.30).

Los conjuntos de datos combinados también se utilizaron para realizar análisis con todas las especies, incluida la especie externa, constreñidos a mantener en la topología los tres grandes linajes denominados como A+D, E+T y L. Todos los métodos de reconstrucción empleados coincidieron en la posición basal de la subfamilia Lachninae, posición apoyada de manera moderada a elevada por los valores estadísticos (figura 1.31). En todas las reconstrucciones la tribu Eriosomatini ocupó la posición basal dentro del linaje E+T, y las subfamilias Calaphidinae, Chaitophorinae y Drepanosiphinae formaron un grupo concordante con la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie. Con todos los métodos, salvo neighbor-joining, apareció la agrupación de las especies representantes de las subfamilias Anoeciinae, Hormaphidinae y Thelaxinae. La posición de *Mindarus abietinus* fue totalmente variable entre los métodos, agrupándose con Fordini y Pemphigini en el análisis por máxima verosimilitud (figura 1.31), con Pemphigini en las reconstrucciones de máxima parsimonia, con Fordini en el árbol de neighbor-joining y en una politomía en la reconstrucción resultante del análisis mediante inferencia bayesiana.

El análisis constreñido sobre el conjunto de datos combinados aaLEA sólo pudo realizarse mediante máxima parsimonia e inferencia bayesiana. Los programas utilizados para el análisis por máxima verosimilitud (PHYML) y neighbor-joining (MEGA) de aminoácidos no permiten la construcción de la topología. Para los dos métodos que pudieron emplearse, la posición basal fue también ocupada por las especies de la subfamilia Lachninae, con apoyos estadísticos entre moderados y altos (figura 1.32).

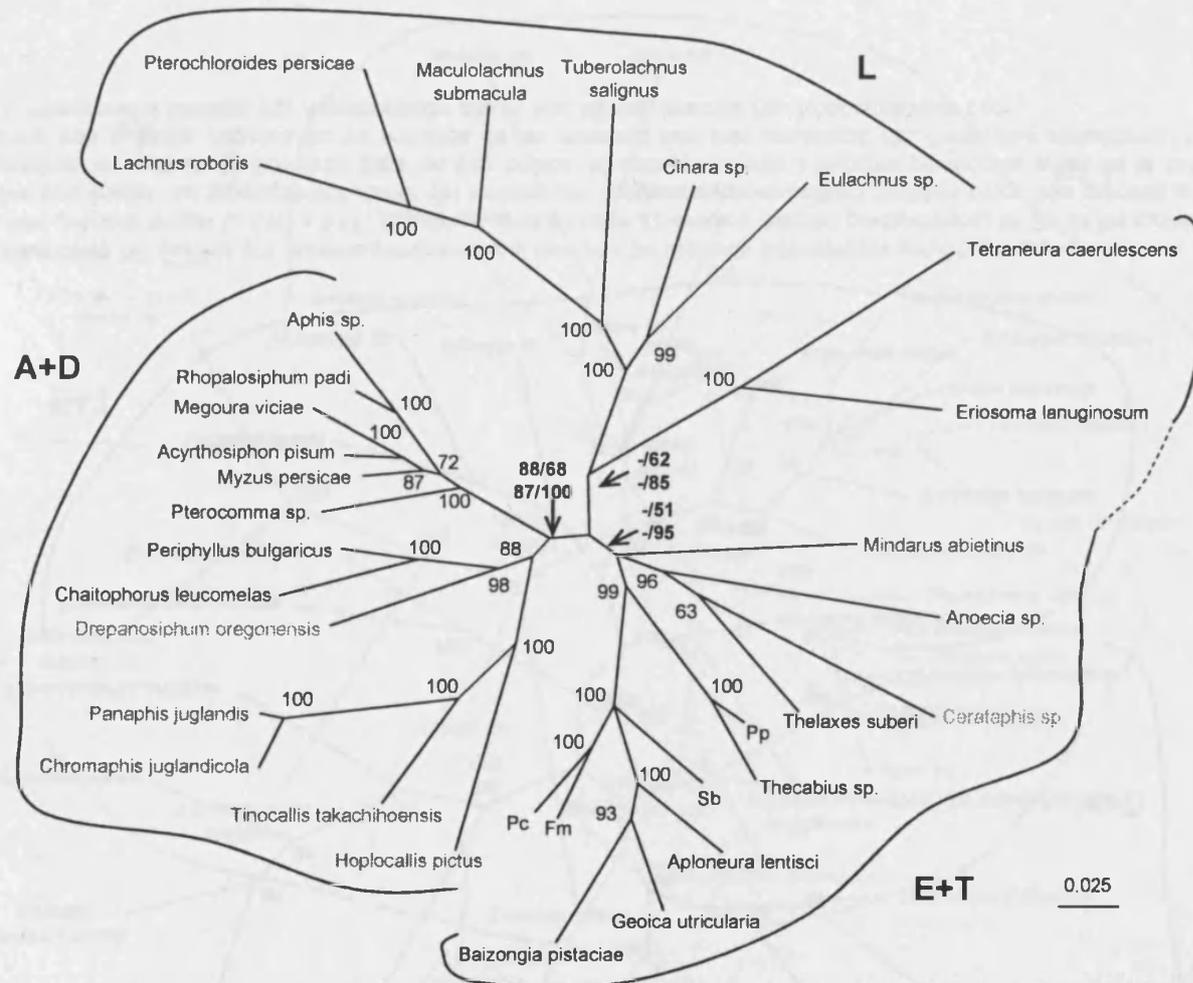


Figura 1.28. Topología obtenida en la reconstrucción filogenética mediante análisis bayesiano del conjunto de datos LEA al eliminar la especie externa *Daktulosphaira vitifoliae*. Se muestra para todos los nodos la probabilidad a posteriori resultante del consenso entre los árboles muestreados en el análisis (tras desechar el 25% inicial). Para tres de los nodos más profundos, que aparecen también en las reconstrucciones análogas realizadas con el resto de métodos, se muestra, en negrita y por este orden, los valores de bootstrap del análisis por máxima verosimilitud, máxima parsimonia, neighbour joining y, por último, la probabilidad a posteriori resultante en la inferencia bayesiana. Aquellos valores de bootstrap inferiores a 50% han sido sustituidos por un guión. Por cuestiones de espacio, algunos de los nombres de las especies se han reducido: Pp, *Pemphigus populi*; Pc, *Paracletus cimiciformis*; Fm, *Forda marginata*; Sb, *Smynthurodes betae*. Los tres grandes linajes (ver texto) quedan englobados por las líneas exteriores. La línea del linaje E+T aparece con una discontinuidad para mostrar que este grupo no es monofilético en esta topología.

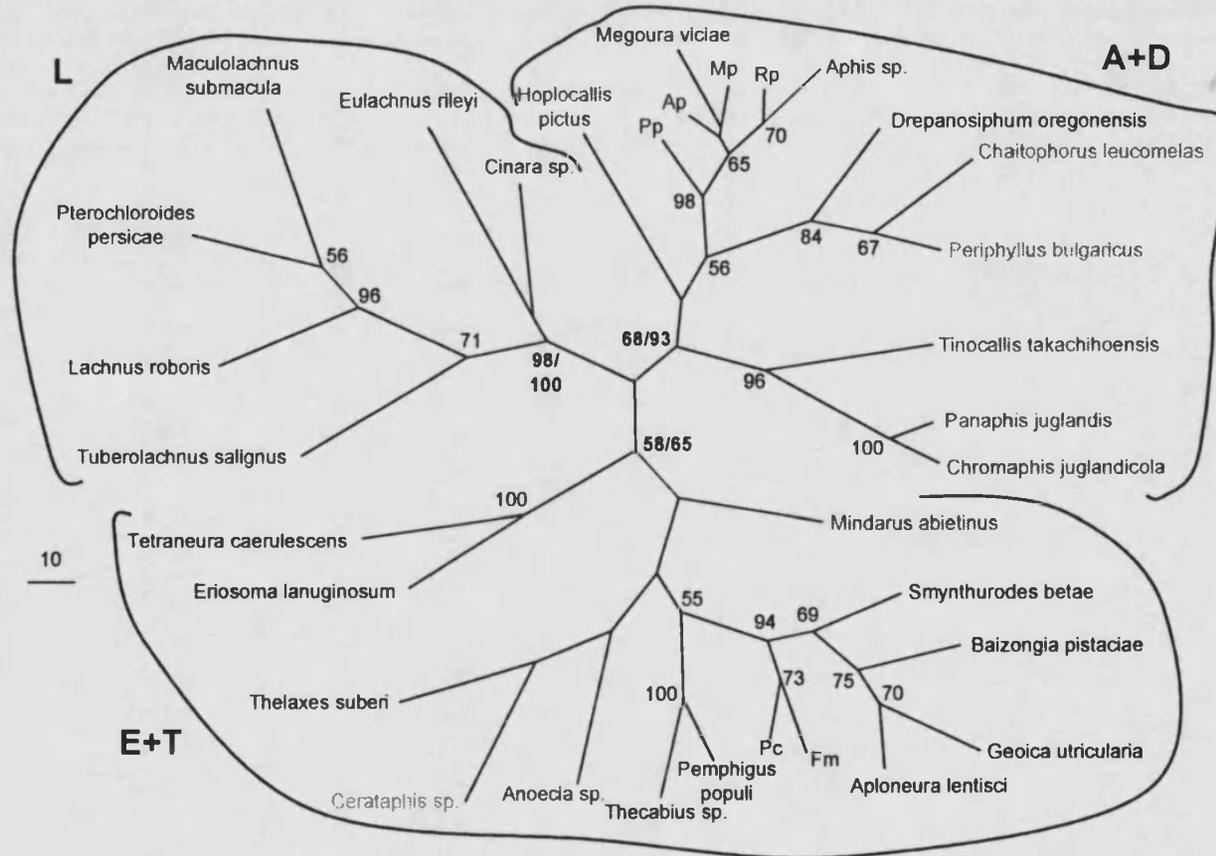


Figura 1.29. Resultado del análisis por máxima parsimonia del conjunto de datos de aminoácidos aaLEA sin especie externa, en el que aparecen los tres grandes linajes L, A+D y E+T. El análisis produjo otros 22 árboles máximo parsimónicos, en 20 de los cuales también aparecieron los tres linajes. La topología resultante del análisis por neighbour joining mostró también estos tres grandes grupos. En negrita se muestran los valores de bootstrap para los tres cladogramas, el correspondiente a máxima parsimonia antes de la barra, el del neighbour joining tras la barra. Algunos de los nombres de las especies han sido reducidos: Pc, *Paracletus cimiciformis*; Fm, *Forda marginata*; Pp, *Pterocomma pilosum*; Ap, *Acyrtosiphon pisum*; Mp, *Myzus persicae*; Rp, *Rhopalosiphum padi*.

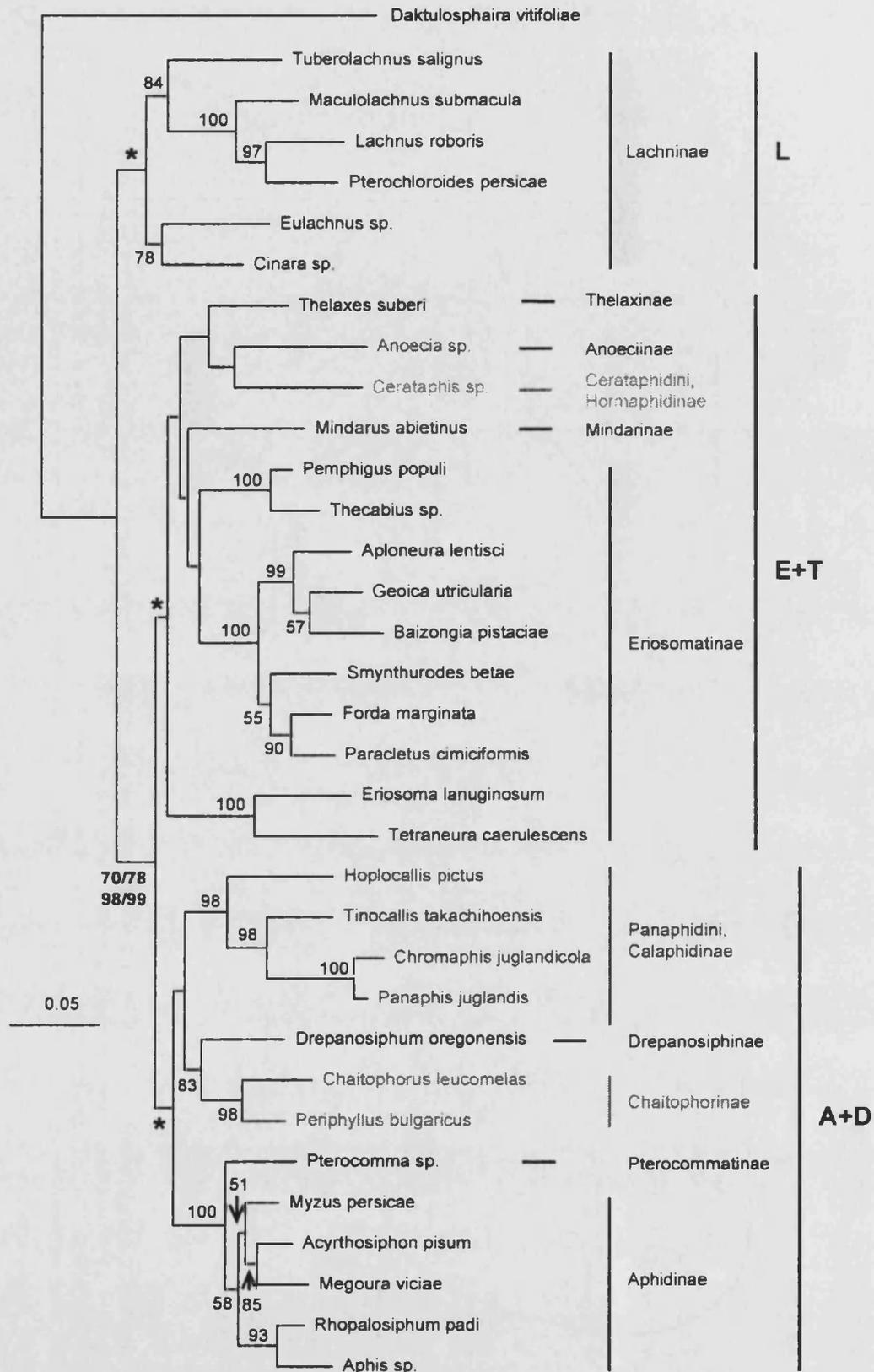


Figura 1.31. Árbol máximo verosímil obtenido a partir del conjunto de datos ntLEA forzando las topologías a mantener los tres grandes linajes (ver texto), y utilizando el modelo GTR+I+G ($\alpha=0.7195$). Junto a los nodos se muestran aquellos valores de bootstrap mayores que 50%. Para el nodo que agrupa los linajes A+D y E+T, se muestran, separados por barras y por este orden, los valores de bootstrap de los análisis de máxima verosimilitud, máxima parsimonia, neighbor-joining y la probabilidad a posteriori de la inferencia bayesiana. Los asteriscos (*) indican los nodos constrñidos del análisis, correspondientes a los tres grandes linajes.

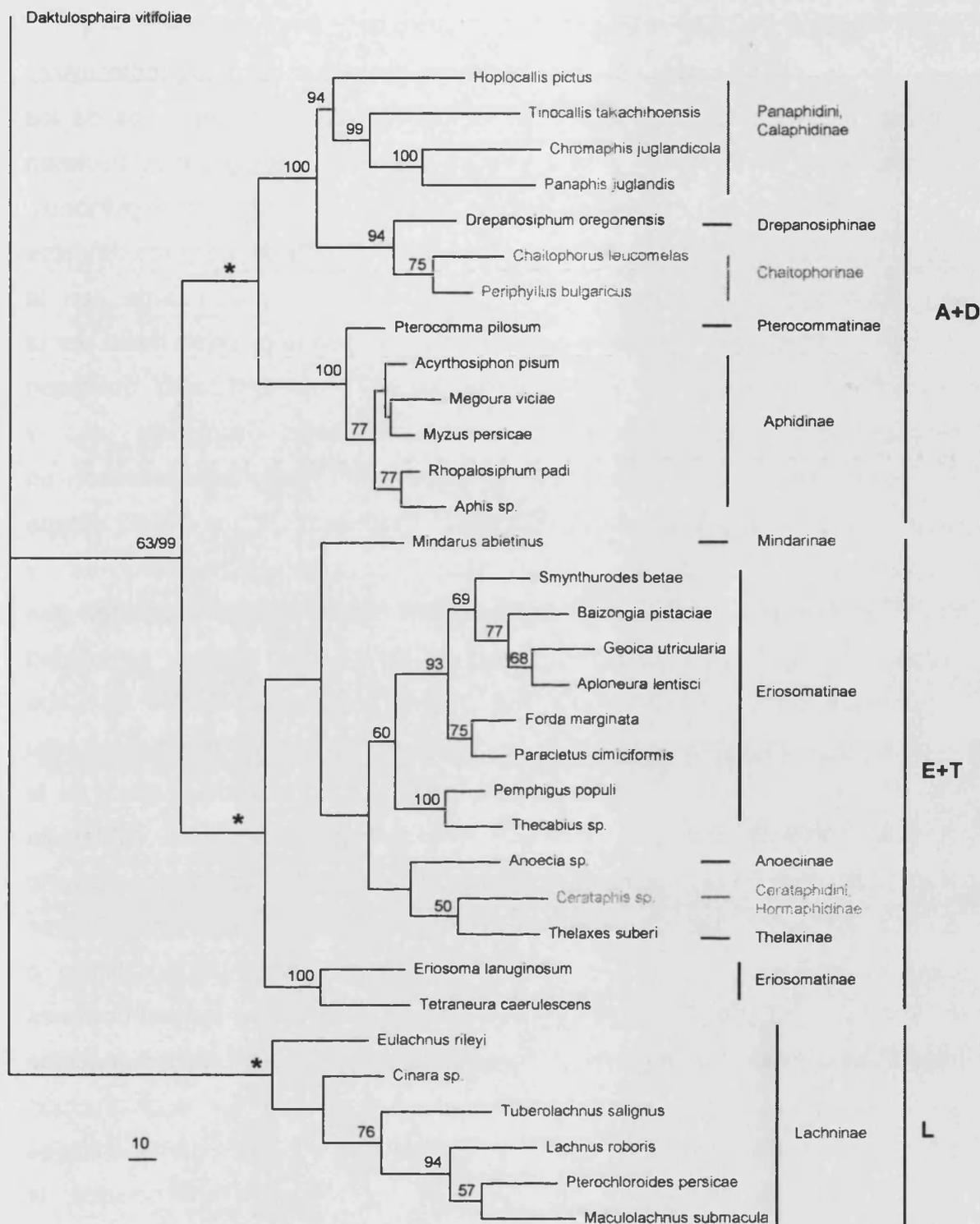


Figura 1.32. Uno de los cuatro árboles máximo parsimónicos obtenidos en el análisis constreñido del conjunto de datos de aminoácidos aaLEA. Las topologías alternativas contenían pequeñas diferencias en las relaciones entre las especies de la subfamilia Aphidinae. Se muestran aquellos valores de bootstrap mayores que 50% y, para el nodo que une los linajes A+D y E+T, el bootstrap del análisis por máxima parsimonia antes de la barra y la probabilidad a posteriori de análisis bayesiano análogo, tras la barra. Los asteriscos (*) indican los nodos constreñidos a mantenerse en las topologías del análisis.

Análisis de los conjuntos de datos combinados ntLEAC y aaLEAC

Los resultados obtenidos a partir de los conjuntos de datos moleculares totales ntLEAC y aaLEAC fueron en varios aspectos similares a los de los conjuntos de datos ntLEA y aaLEA, pese a que los cuatro genes pudieron combinarse para un número más limitado de especies o géneros de pulgones. La reconstrucción mediante máxima verosimilitud a partir del conjunto de datos combinados de nucleótidos ntLEAC (figura 1.33) fue concordante con la presencia de los tres grandes linajes, siendo ocupada la posición basal por la subfamilia Lachninae. En este análisis, en el linaje E+T sólo quedaron representadas las subfamilias Hormaphidinae (por *Cerataphis sp.*) y Eriosomatinae (por las tribus Fordini y Pemphigini), las cuales formaron un clado monofilético sin un apoyo de bootstrap elevado. El linaje A+D estaba representado sólo por las subfamilias Aphidinae, Chaitophorinae y Drepanosiphinae, que también formaron un clado. La inclusión del gen mitocondrial *coll* fue posiblemente responsable de una falta de estabilidad filogenética entre los distintos métodos para la especie *Cerataphis sp.* Cabe recordar que en algunos de los análisis independientes de este gen la tribu Cerataphidini, a la cual pertenece esta especie, ocupó la posición basal de la filogenia, alejada del resto de tribus que forman parte de la subfamilia Hormaphidinae. En el análisis del conjunto de datos ntLEAC esta especie varió en posición, siendo basal en el análisis por máxima parsimonia o agrupándose después de la subfamilia Lachninae en los análisis por neighbor-joining o inferencia bayesiana. *Cerataphis sp.* fue siempre basal en las reconstrucciones obtenidas a partir del conjunto de datos moleculares totales de aminoácidos (aaLEAC; figura 1.34), independientemente del método de reconstrucción utilizado. Cuando se realizaron análisis constreñidos a los tres grandes linajes o eliminando *Cerataphis sp.*, con datos de nucleótidos o aminoácidos, la posición basal de los árboles resultantes fue siempre ocupada por la subfamilia Lachninae, salvo en la reconstrucción constreñida a partir del conjunto de aminoácidos analizados mediante máxima parsimonia.

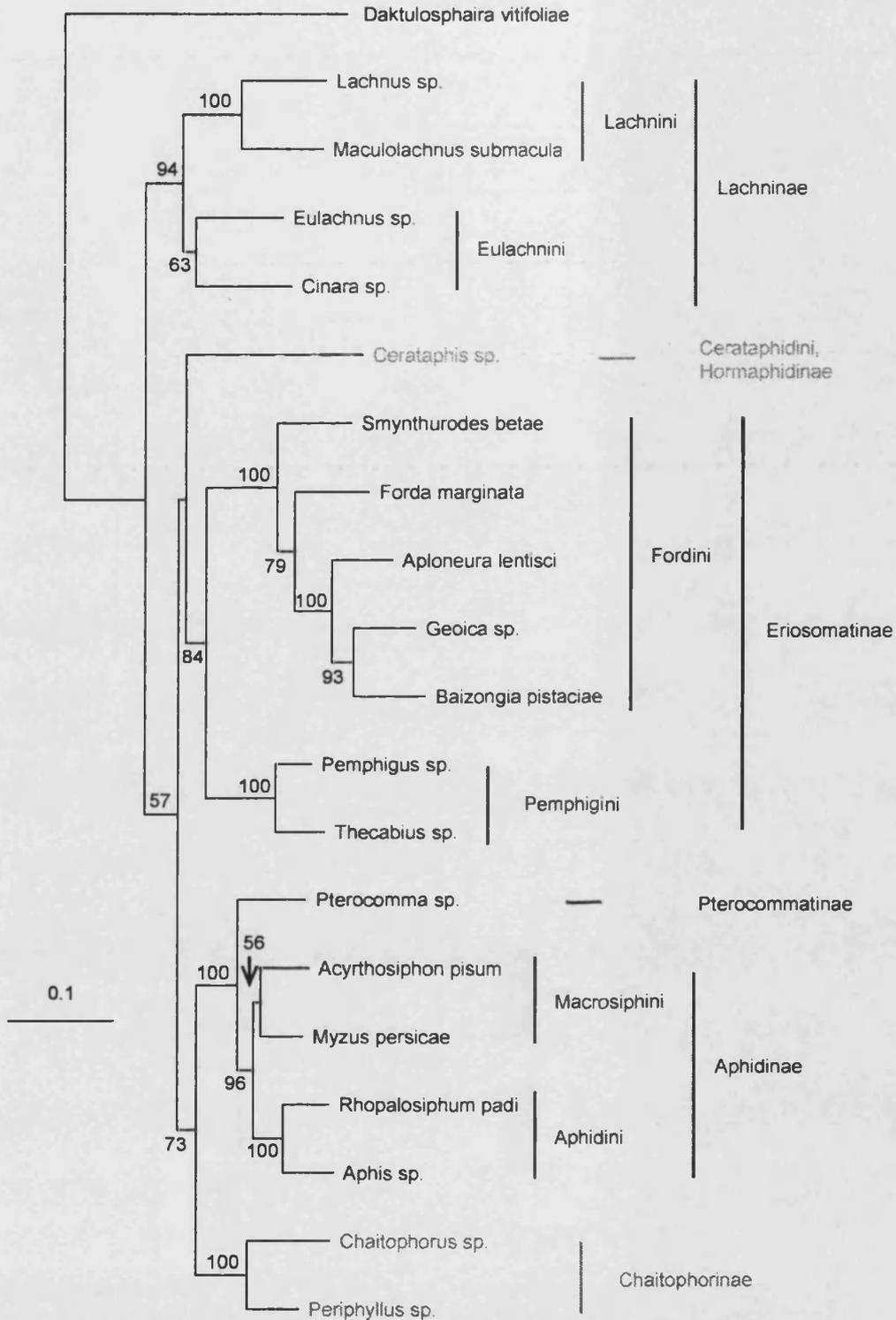


Figura 1.33. Árbol máximo verosimil obtenido a partir del análisis del conjunto de datos ntLEAC para 19 especies de pulgones, utilizando el modelo de evolución GRT+I+G ($\alpha=0.7749$). Junto a los nodos se muestran aquellos valores de bootstrap superiores a 50%.

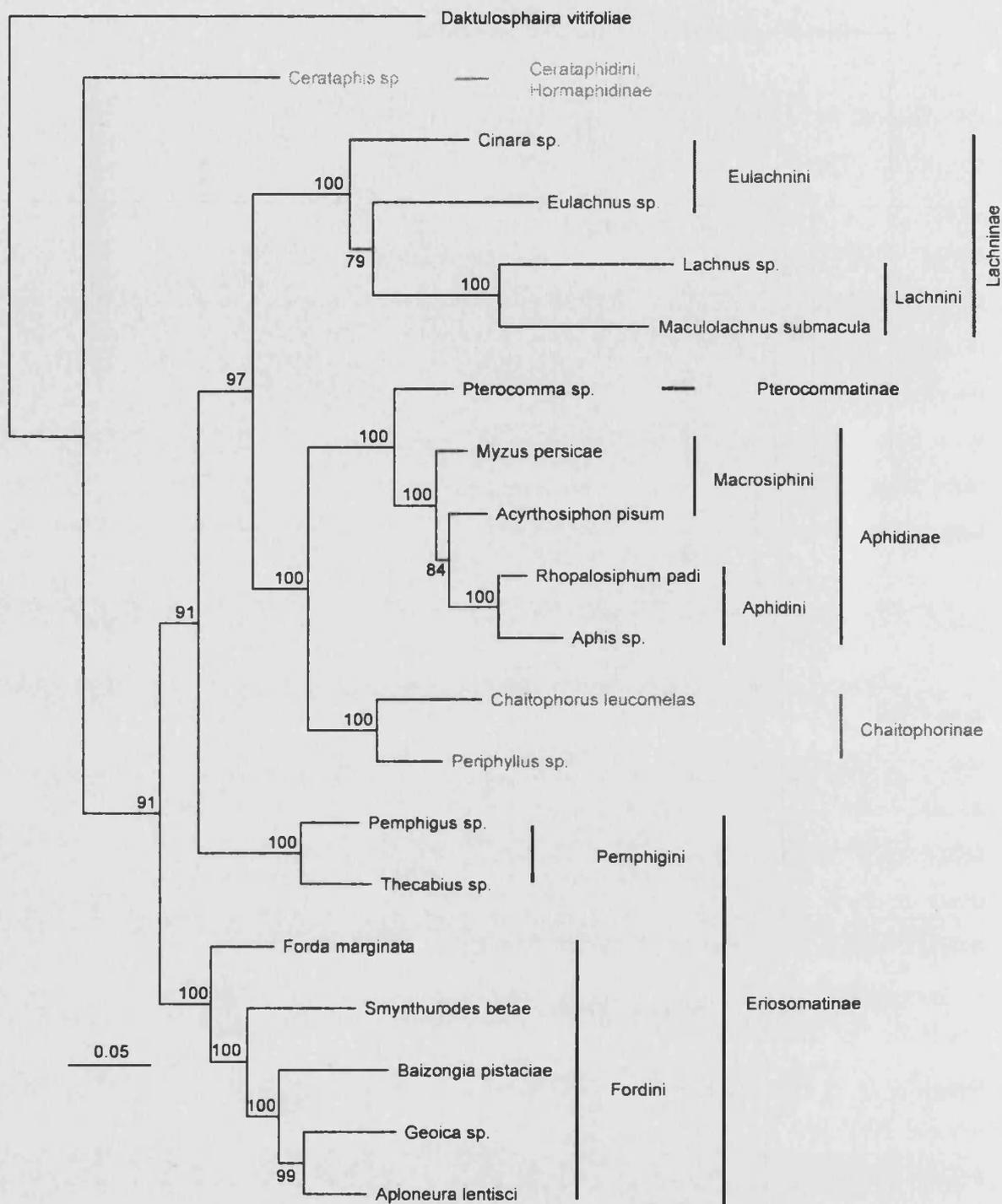


Figura 1.34. Resultado de la inferencia bayesiana de la filogenia a partir de los datos moleculares totales de aminoácidos (aaLEAC). Para cada nodo se muestra la probabilidad a posteriori asociada, resultante del consenso de los últimos 3750 árboles muestreados en el análisis.

4.4. Comparación de hipótesis filogenéticas alternativas

El conjunto de datos ntLEA, creado a partir de las secuencias de los genes *lwrh*, *ef1 α* y *atp6*, se utilizó para realizar varios test de comparación de hipótesis filogenéticas alternativas. Se creó, inicialmente, un conjunto de 30 topologías alternativas, que se evaluaron mediante los test ELW y SH. Dentro de este conjunto se incluyeron las topologías máximo verosímiles obtenidas en los análisis separados de cada uno de los genes y las correspondientes a los análisis de los conjuntos de datos combinados con los diferentes métodos de reconstrucción. Asimismo, se incluyeron las topologías propuestas a partir de datos morfológicos por Heie y Wojciechowski, y otras topologías en las que se incluyeron relaciones específicas entre subfamilias que aparecen en las filogenias morfológicas, como la relación entre Aphidinae y Lachninae o entre Thelaxinae y las subfamilias que formaban la familia Drepanosiphidae en la clasificación de Heie. El total de topologías incluidas puede observarse en la tabla 1.8, con una breve descripción de cada una de ellas. Además, las topologías pueden observarse bien en las diversas figuras de este capítulo (ver referencias a figuras en la tabla 1.8) o en el Anexo II (CD adjunto).

El test SH demostró ser un test mucho más conservador, rechazando sólo 5 de las 30 topologías incluidas (ver tabla 1.8). Éstas fueron las resultantes de los análisis independientes de los genes *ef1 α* y *atp6* para nucleótidos y las correspondientes a los análisis independientes de los aminoácidos de los genes *lwrh* y *atp6*. El test no rechazó las hipótesis basadas en datos morfológicos de Heie y Wojciechowski, ni ninguna de las topologías incluidas que contenían algunas de las relaciones propuestas en estas filogenias morfológicas. El test ELW fue menos conservador, y sólo incluyó 10 topologías en el intervalo de confianza, excluyendo así las otras 20. Las relaciones filogenéticas propuestas tanto por Heie como por Wojciechowski a partir de caracteres morfológicos se rechazaron en este test. Además, varias de las reconstrucciones que se realizaron constreñidas a mantener sólo algunas relaciones particulares que aparecen en las filogenias morfológicas también fueron rechazadas. Así, algunas relaciones comúnmente aceptadas, como la de las subfamilias Aphidinae y Lachninae o la de la subfamilia Thelaxinae con

Tabla 1.8. Resultados de los test SH y ELW realizados sobre el conjunto de 30 topologías¹.

Descripción de la topología	ELW		SH	
	δ	c	δ	P
1 ML ntLEA (fig. 1.24)	0.13	0.1617	mejor	mejor
2 ML cs3 ntLEA (fig. 1.31)	7.18	0.0174	7.64	0.974
3 Heie (fig. 1.8)	77.22	0.0000*	74.31	0.072
4 Wojciechowski (fig. 1.8)	53.43	0.0000*	50365	0.295
5 ML <i>lwrh</i> (fig. 1.8)	7.82	0.0383	9.14	0.934
6 ML <i>lwrh</i> posiciones 1 y 2	58.29	0.0030*	58.51	0.221
7 ML <i>ef1a</i> (fig. 1.14)	129.58	0.0000*	139.25	0.008*
8 ML <i>atp6</i> (fig. 1.17)	217.65	0.0000*	218.34	0.000*
9 ML <i>atp6</i> posiciones 1 y 2 (fig. 1.18)	151.01	0.0000*	150.34	0.004*
10 ML ntLEA 2º mejor árbol	mejor	0.2114	2.06	0.975
11 ML cs3 <i>lwrh</i>	13.53	0.0038*	14.38	0.867
12 ML ntLEA cs basalidad de Eriosomatini	2.36	0.0611	3.25	0.994
13 ML ntLEA cs basalidad de especies de E+T	2.26	0.1275	5.84	0.950
14 ML ntLEA cs Thelaxinae+Drep.	45.70	0.0001*	44.80	0.393
15 ML ntLEA cs Aphidinae+Lachninae	15.37	0.0110*	16.31	0.839
16 ML ntLEA cs Mindarinae+Aphidinae	20.12	0.0394	21.97	0.788
17 ML ntLEA cs Mindarinae+Drep.	35.46	0.0000*	36.90	0.513
18 ML ntLEA cs Mindarinae+Thelaxinae+Drep.	46.15	0.0009*	48.85	0.312
19 ML ntLEA cs monofilia de Eriosomatinae	7.82	0.0459	9.44	0.920
20 MP ntLEA (fig. 1.25)	2.36	0.1750	7.02	0.919
21 Inferencia bayesiana ntLEA	4.68	0.0755	5.93	0.956
22 NJ ntLEA	25.21	0.0022*	26.14	0.726
23 ML aaLEA	33.20	0.0076*	33.12	0.596
24 MP aaLEA	25.49	0.0131*	28.26	0.663
25 Inferencia bayesiana aaLEA	37.87	0.0017*	37.89	0.515
26 NJ aaLEA (fig. 1.26)	30.94	0.0010*	31.80	0.611
27 ML <i>lwrh</i> aminoácidos	203.50	0.0000*	198.65	0.000*
28 ML <i>atp6</i> aminoácidos (fig. 1.19)	154.98	0.0000*	156.86	0.001*
29 ML ntLEA cs a basalidad de linaje E+T	13.72	0.0013*	13.50	0.895
30 ML ntLEA cs a basalidad de linaje A+D	26.88	0.0012*	26.12	0.690

¹La topología de cada árbol puede consultarse en el Anexo II (CD adjunto). Abreviaturas: ML: máxima verosimilitud; ntLEA y aaLEA: conjuntos de datos combinados de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente; cs3: topología constreñida a mantener los tres grandes linajes; cs: topología constreñida a mantener las relaciones indicadas; Drep.: Drepanosiphidae *sensu* Heie; MP: máxima parsimonia; NJ: neighbor joining. δ : diferencia en el valor de verosimilitud respecto al mejor árbol en cada test calculada por el correspondiente programa. c: valor de confianza (peso esperado de verosimilitud). Un * marca aquellas topologías significativamente fuera del conjunto de confianza en el test ELW o significativamente peor que el árbol máximo verosímil en el test SH.

los miembros de la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie, fueron rechazadas por este test a partir de los datos moleculares empleados. También quedaron fuera del intervalo de confianza la mayoría de topologías obtenidas en los análisis independientes sobre nucleótidos y de los análisis independientes y combinados sobre aminoácidos. Algunas hipótesis que quedaron incluidas en este intervalo muestran también algunas relaciones importantes. Las topologías constreñidas a mantener la monofilia de la subfamilia Eriosomatinae, o aquellas

en la que la tribu Eriosomatini o todas las especies del linaje E+T (sin formar un clado monofilético) se situaban en la posición basal, se incluyeron en el intervalo. De entre las topologías constreñidas a mantener los tres grandes linajes sólo aquella que situaba a la subfamilia Lachninae en posición basal fue aceptada, quedando excluidas del intervalo de confianza las topologías en las que el linaje A+D o el linaje E+T eran basales.

Tabla 1.9. Resultados de los test SH y ELW realizados sobre el conjunto de 25 topologías resultantes de excluir las 5 topologías rechazadas por el test SH en el conjunto inicial (ver tabla 1.8)¹.

Descripción de la topología		ELW		SH	
		δ	c	δ	P
1	ML ntLEA (fig. 1.24)	0'13	0'1661	mejor	mejor
2	ML cs3 ntLEA (fig. 1.31)	7'18	0'0160	7'64	0'954
3	Heie (fig. 1.8)	77'22	0'0000*	74'31	0'029*
4	Wojciechowski (fig. 1.8)	53'43	0'0000*	50'65	0'082
5	ML <i>lwrh</i> (fig. 1.8)	7'82	0'0450	9'14	0'890
6	ML <i>lwrh</i> posiciones 1 y 2	58'29	0'0029*	58'51	0'088
7	ML ntLEA 2º mejor árbol	mejor	0'2091	2'06	0'965
8	ML cs3 <i>lwrh</i>	13'53	0'0080*	14'38	0'791
9	ML ntLEA cs basalidad de Eriosomatini	2'36	0'0602	3'25	0'988
10	ML ntLEA cs basalidad de especies de E+T	2'26	0'1332	5'84	0'910
11	ML ntLEA cs Thelaxinae+Drep.	45'70	0'0003*	44'80	0'222
12	ML ntLEA cs Aphidinae+Lachninae	15'37	0'0067*	16'31	0'740
13	ML ntLEA cs Mindarinae+Aphidinae	20'12	0'0362	21'97	0'577
14	ML ntLEA cs Mindarinae+Drep.	35'46	0'0000*	36'90	0'234
15	ML ntLEA cs Mindarinae+Thelaxinae+Drep.	46'15	0'0000*	48'85	0'139
16	ML ntLEA cs monofilia de Eriosomatinae	7'82	0'0443	9'44	0'872
17	MP ntLEA (fig. 1.25)	2'36	0'1667	7'02	0'855
18	Inferencia bayesiana ntLEA	4'68	0'0835	5'93	0'923
19	NJ ntLEA	25'21	0'0031*	26'14	0'489
20	ML aaLEA	33'20	0'0035*	33'12	0'338
21	MP aaLEA	25'48	0'0107*	28'26	0'431
22	Inferencia bayesiana aaLEA	37'87	0'0002*	37'89	0'275
23	NJ aaLEA (fig. 1.26)	30'94	0'0026*	31'80	0'379
24	ML ntLEA cs a basalidad de linaje E+T	13'72	0'0012*	13'50	0'843
25	ML ntLEA cs a basalidad de linaje A+D	26'88	0'0003*	26'12	0'480

¹La topología de cada árbol puede consultarse en el Anexo II (CD). Las abreviaturas empleadas corresponden a las descritas en la tabla 1.8. δ : diferencia en el valor de verosimilitud respecto al mejor árbol en cada test calculada por el correspondiente programa. c: valor de confianza (peso esperado de verosimilitud). Un * marca aquellas topologías significativamente fuera del conjunto de confianza en el test ELW o significativamente peor que el árbol máximo verosímil en el test SH.

Además de ser más conservador, el test SH es también más sensible a la inclusión de topologías muy poco probables (Strimmer y Rambaut, 2002). Por ello, se repitieron los test sobre un conjunto de 25 topologías, eliminando aquéllas que fueron rechazadas por el test SH en el conjunto de 30. Como puede apreciarse en la tabla 1.9, el cambio provocó el rechazo de sólo una hipótesis más en el test SH, la correspondiente a la topología de Heie, y quedando la hipótesis morfológica de Wojciechowski cercana al rechazo (p -valor=0'082). El resultado del test ELW sobre este nuevo conjunto fue cualitativamente idéntico al descrito para el conjunto de 30 topologías.

4.5. Propuesta filogenética

La figura 1.35 muestra una propuesta para las relaciones filogenéticas entre las distintas subfamilias y tribus que se han analizado en este estudio. Debido a que el número de especies analizadas para algunas subfamilias y tribus ha sido especialmente variable entre los distintos genes estudiados, en la figura se muestra sólo el nombre de las subfamilias y las tribus y no el de cada especie. La propuesta filogenética trata de ser un consenso entre los resultados obtenidos en los análisis independientes y combinados presentados anteriormente. Dado el bajo apoyo que han recibido en términos generales las relaciones entre los grupos principales del linaje denominado E+T, varios de estos grupos aparecen relacionados en la figura 1.35 mediante una politomía basal para este linaje. La validez de algunas de las relaciones propuestas en esta hipótesis, así como su implicación para la evolución de la alimentación y los ciclos biológicos de los pulgones, se discuten con mayor detalle en el apartado de Discusión.

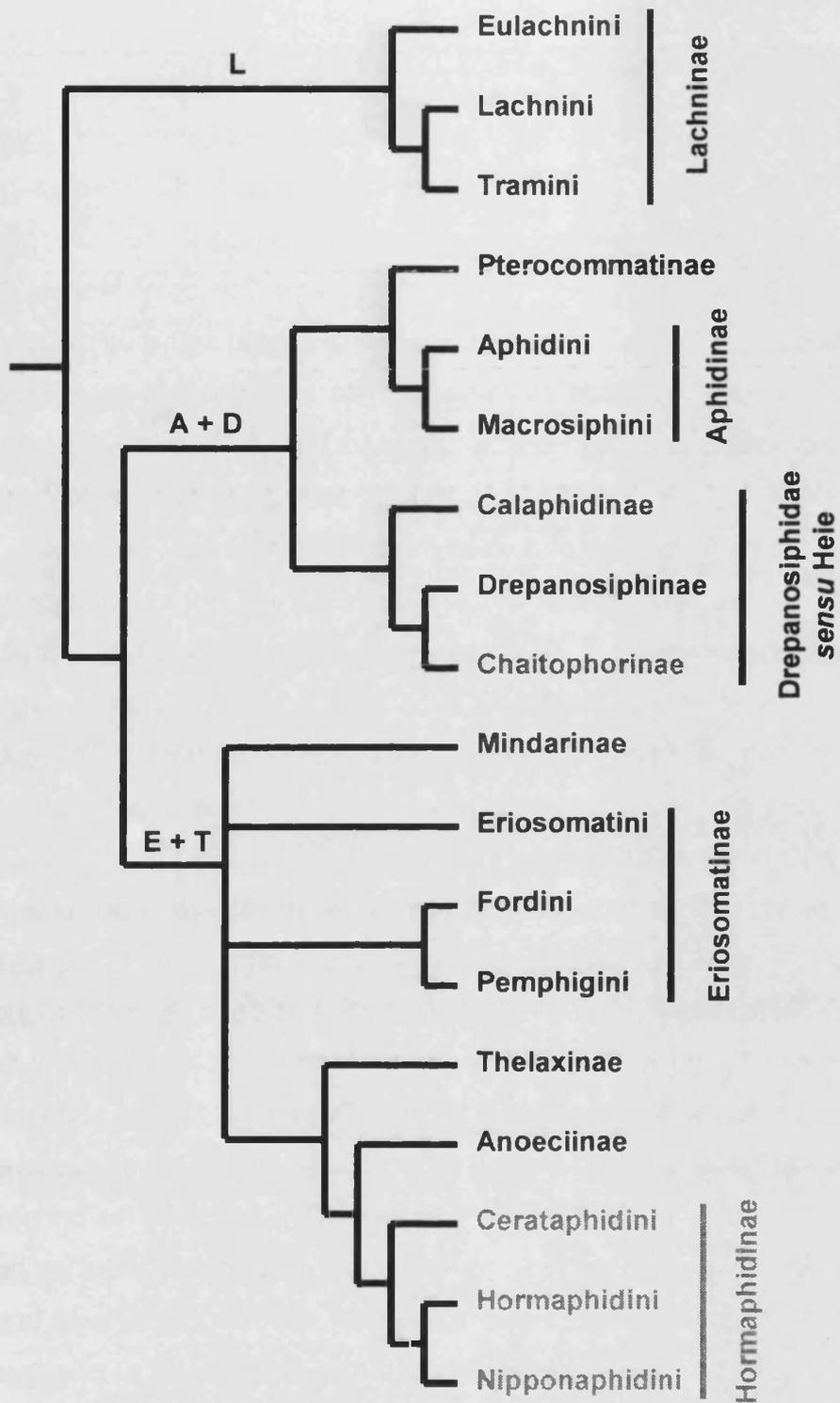


Figura 1.35. Propuesta filogenética de las relaciones entre las subfamilias y tribus de pulgones analizadas en este estudio. Debido al bajo apoyo estadístico hallado para las relaciones entre los integrantes del linaje E+T, éstas aparecen como una politomía.

5. Discusión

5.1. Relaciones filogenéticas en la familia Aphididae

La diversidad actual de la familia Aphididae es probablemente el resultado de una rápida radiación adaptativa a nivel de tribu ocurrida en este grupo durante el Cretácico Superior, asociada a la aparición de las plantas angiospermas durante este periodo (Heie, 1980; von Dohlen y Moran, 2000; Martínez-Torres *et al.*, 2001). La rapidez de esta radiación se ha utilizado como explicación de la dificultad de la clasificación y la inferencia de las relaciones filogenéticas en este grupo de insectos. La aparición de las tribus actuales de pulgones en un periodo de tiempo corto pudo impedir la acumulación de una amplia señal filogenética, tanto a nivel morfológico como molecular, que permitiera hoy en día realizar con certeza la inferencia de las relaciones de parentesco evolutivo entre los principales grupos de esta familia. Los primeros trabajos que abordaron el estudio de las relaciones filogenéticas entre pulgones mediante el empleo de datos moleculares encontraron, de hecho, una notable falta de estructura filogenética para los niveles taxonómicos superiores a tribu (von Dohlen y Moran, 2000; Martínez-Torres *et al.*, 2001) (ver figuras 1.2 y 1.3).

En este estudio se han obtenido nuevos datos moleculares para el análisis filogenético de la familia Aphididae, mediante la secuenciación o recopilación de secuencias correspondientes a los genes nucleares de la opsina de longitud de onda larga (*lwrh*) y el factor de elongación de la traducción 1 α (*ef1 α*) y de los genes mitocondriales de la subunidad 6 de la ATPasa-F (*atp6*) y la subunidad II de la citocromo oxidasa (*col1*). El análisis independiente de estas secuencias ha mostrado de nuevo la dificultad de la inferencia filogenética entre los principales grupos de áfidos, revelando una falta de estructura filogenética para los nodos más profundos de las reconstrucciones realizadas. Además de por esta falta de resolución, la hipotética rápida radiación adaptativa ocurrida en el origen de la composición actual de la familia Aphididae se ve apoyada por otra característica observable en los árboles filogenéticos obtenidos. En general, puede apreciarse que las longitudes de las ramas más profundas de las topologías, así como de aquéllas que conducen a las subfamilias, son relativamente mucho menores que las longitudes de las ramas que conducen a

las tribus y a las especies. De manera similar a lo que ocurrió en estudios anteriores, las tribus analizadas en el presente trabajo se han agrupado generalmente formando grupos monofiléticos en los árboles obtenidos, concordantes con las clasificaciones y apoyados además por valores estadísticos elevados. Por otro lado, esta agrupación estadísticamente apoyada de las especies en sus respectivas tribus ha sido más notable en las reconstrucciones realizadas a partir de las secuencias de genes nucleares que en las correspondientes a los genes mitocondriales. Sin embargo, las subfamilias para las cuales se ha analizado más de una tribu no han aparecido siempre como agrupaciones monofiléticas en las filogenias obtenidas en los análisis independientes. El apoyo encontrado en estos análisis para las relaciones entre las subfamilias ha sido aún menor. Estas relaciones corresponden a los nodos más profundos del árbol filogenético de la familia Aphididae, que datan probablemente del Cretácico Superior (Heie, 1987). A diferencia de lo observado en los análisis independientes, el análisis combinado de las secuencias, así como algunas de las reconstrucciones realizadas a partir del gen *lwrh*, ha mostrado algunas relaciones entre las subfamilias de pulgones analizadas que presentaron un apoyo estadístico elevado. Estas relaciones filogenéticas entre los principales grupos de la familia Aphididae suponen una contribución importante al conocimiento de la filogenia de este grupo de insectos.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los diferentes genes analizados que se concatenaron en los conjuntos de datos combinados ntLEA y aaLEA se utilizaron previamente para realizar diversas pruebas estadísticas con el objetivo de analizar la congruencia filogenética entre ellos. Estas pruebas mostraron la existencia de un grado muy elevado de incongruencia entre la información filogenética proveniente de los distintos genes utilizados (ver apartado 4.3.b). A pesar de ello, los datos se concatenaron para realizar un análisis filogenético combinado con el fin de aumentar la señal filogenética existente en los análisis independientes. No existe hoy en día un claro consenso entre los especialistas en filogenética molecular sobre si los datos provenientes de distintas fuentes pueden o no ser utilizados de manera combinada. Baker y DeSalle (1997) observaron un elevado nivel de

incongruencia entre los datos moleculares provenientes de 8 genes analizados en varias especies de moscas del género *Drosophila*. A pesar de ello, argumentaron que la mejor estima de la filogenia resultó del análisis combinado de los genes, y que la fuente de incongruencia entre ellos no era crítica para el cambio en la topología del análisis combinado. Por otro lado, cuando se combinan datos, a menudo pueden emerger relaciones filogenéticas no presentes en los análisis por separado, debido a una amplificación de la señal filogenética (Baker y DeSalle, 1997; Baker *et al.*, 2001). La falta de estructura filogenética en los nodos más profundos de la filogenia de los pulgones, detectada en los estudios previos al presente estudio basados en datos moleculares, así como en algunos de los análisis independientes presentados en este capítulo, sugieren que el análisis combinado de genes puede ser fundamental para el estudio de las relaciones filogenéticas entre los principales grupos de pulgones. El análisis combinado realizado mostró, a pesar de la incongruencia detectada entre las secuencias, resultados muy similares a los obtenidos en el análisis independiente del gen *lwrh*, mejorando los apoyos estadísticos de algunos nodos.

a) Relaciones filogenéticas en los niveles taxonómicos de tribu y subfamilia

Como se ha mencionado anteriormente, las reconstrucciones filogenéticas realizadas en este capítulo han reflejado en general la agrupación de las especies analizadas en las respectivas tribus reconocidas en las clasificaciones más importantes. Por ejemplo, en el caso de la subfamilia Eriosomatinae, los apoyos estadísticos a las agrupaciones de cada una de las tres tribus que la forman (Eriosomatini, Fordini y Pemphigini) (Remaudière y Remaudière, 1997) han sido por lo general muy elevados. Tanto la tribu Eriosomatini como la tribu Pemphigini, cada una representada por dos especies en este estudio, se han agrupado de manera monofilética y, por lo general, con apoyos de bootstrap superiores a 90% (ver por ejemplo la figura 1.24). El apoyo a la monofilia de la tribu Fordini no ha sido tan elevado en algunos de los análisis, particularmente en los realizados a partir de los genes mitocondriales, pero sí en los

correspondientes a los genes nucleares y en los análisis combinados, en los que ha llegado al 100% (ver figura 1.24). Las relaciones internas de esta tribu se analizan y discuten con mayor detalle en el capítulo 2. Las reconstrucciones presentadas muestran, además, una relación filogenética más estrecha entre las tribus Fordini y Pemphigini, particularmente en el análisis combinado. La relación filogenética entre estas dos tribus no apareció en las reconstrucciones obtenidas a partir de datos moleculares realizadas por von Dohlen y Moran (2000) (ver figura 1.2) ni en las del estudio de Martínez-Torres *et al.* (2001) (ver figura 1.3). Pese al elevado apoyo obtenido para la agrupación monofilética de cada una de las tres tribus de Eriosomatinae, no se recuperó la monofilia de esta subfamilia en ninguna de las reconstrucciones realizadas, debido a la posición variable de la tribu Eriosomatini en los distintos análisis. La discrepancia en la situación filogenética que ocupan los miembros de esta tribu en los diferentes análisis realizados puede ser debida a la existencia de sesgos en la composición nucleotídica de las secuencias analizadas. Las pruebas estadísticas realizadas para analizar la homogeneidad de la composición sólo han revelado un sesgo estadísticamente significativo hacia un mayor contenido en A+T en el gen *lwrh* para la especie *Tetraneura caerulescens*. No obstante, aunque no de manera significativa, en las tablas de composición nucleotídica obtenidas (ver Anexo III en CD adjunto), puede observarse una ligera tendencia hacia un mayor contenido en A+T tanto para esta especie como para *Eriosoma lanuginosum*, y para los tres genes obtenidos en estas especies (*lwrh*, *ef1 α* y *atp6*). Cabe destacar que el sesgo hacia un mayor contenido en A+T de estas dos especies pertenecientes a la tribu Eriosomatini puede apreciarse también en la composición nucleotídica de los genes analizados en la especie externa, *Daktulosphaira vitifoliae*. Por otro lado, las especies de la tribu Eriosomatini mostraron tasas de sustitución nucleotídica aceleradas en algunas de las pruebas estadísticas realizadas para analizar esta circunstancia. La existencia de tasas aceleradas y de sesgos en la composición podrían ser responsables de la posición aberrante de la tribu Eriosomatini en las reconstrucciones filogenéticas, provocando una atracción hacia la especie externa, con la cual comparten un sesgo hacia un mayor contenido en A+T. Las clasificaciones taxonómicas basadas en caracteres morfológicos reconocen de manera

general la monofilia de la subfamilia Eriosomatinae, fundamentada en la existencia de algunos caracteres comunes importantes como, por ejemplo, la inducción de agallas en los hospedadores primarios o el tipo de ciclo alternante, con sexúparas retornantes y sexuales enanos y áfagos. La obtención de nuevos datos moleculares, libres de sesgos en composición nucleotídica, podría ser de gran ayuda para comprobar la monofilia de este grupo. Asimismo, la inclusión de nuevas especies para ser utilizadas como outgroup, pertenecientes a la familia Phylloxeridae (como *D. vitifoliae*, incluida en el presente estudio) o a su familia hermana Adelgidae, pueden ser útiles para disminuir el efecto del sesgo en la composición nucleotídica.

La clasificación de Remaudière, Stroyan y Quednau (Remaudière y Stroyan, 1984; Remaudière y Quednau, 1988; Quednau y Remaudière, 1994) reconoce la existencia de tres tribus dentro de la subfamilia Hormaphidinae: Cerataphidini, Hormaphidini y Nipponaphidini. Debido a la escasa presencia de representantes de esta subfamilia en la Península Ibérica, sólo se pudo incluir una especie de este grupo, *Cerataphis sp.*, en el análisis independiente de los genes *lwrh* y *atp6*, así como en el análisis combinado. La recopilación de secuencias obtenidas en otros trabajos sí ha permitido analizar al menos un representante de cada una de las tres tribus de esta subfamilia en los análisis independientes de los genes *eff1α* y *coll*. A pesar de no aparecer en todas las reconstrucciones, la monofilia de cada una de las tribus apareció en algunas de las topologías obtenidas con esos dos genes (ver, por ejemplo, figuras 1.14 y 1.21). Cabe destacar que las especies de la tribu Cerataphidini ocuparon la posición basal del árbol filogenético de la familia Aphididae en la reconstrucción obtenida a partir de la secuencia completa del gen *coll* (ver la figura 1.21), así como en algunas de las obtenidas a partir del análisis de los conjuntos de datos combinados ntLEAC y aaLEAC, en las que esta tribu se hallaba representada por la especie *Cerataphis sp.* (ver figuras 1.33 y 1.34). El único representante de esta tribu presente en el estudio previo de von Dohlen y Moran (2000), *Tuberaphis styraci*, también ocupó la posición basal en algunas de sus reconstrucciones (ver figura 1.2). En ambos casos, la posición basal es ocupada por esta tribu en análisis realizados a partir de datos moleculares provenientes de DNA mitocondrial. Sin embargo, los análisis realizados en este

capítulo a partir de otra secuencia mitocondrial (gen *atp6*) y de genes nucleares (*lwrh* y *ef1α*) no apoyan que esta tribu ocupe esa posición en el árbol filogenético de la familia Aphididae. Los análisis de estas secuencias apoyan, por el contrario, que la tribu Cerataphidini sea basal dentro del conjunto de la subfamilia Hormaphidinae. Los análisis presentados en este estudio sugieren una relación filogenética más estrecha entre las tribus Hormaphidini y Nipponaphidini (con un apoyo de bootstrap de 81% en la figura 1.16). Esta relación sí aparecía en las reconstrucciones obtenidas por von Dohlen y Moran (figura 1.2). A diferencia de los resultados publicados por estas autoras, el análisis presentado en el presente capítulo apoya, en términos generales, la monofilia de la subfamilia Hormaphidinae, dando validez a este grupo reconocido clásicamente en las clasificaciones morfológicas.

Las clasificaciones más modernas dividen la subfamilia Lachninae en tres tribus: Eulachnini, Lachnini y Tramini; aunque con algunas diferencias en su nombre y rango (Heie, 1980; Remaudière y Remaudière, 1997). Los análisis filogenéticos realizados han apoyado en términos generales la monofilia de cada una de estas tribus, aunque las especies de la tribu Eulachnini mostraron una disposición parafilética en algunos análisis independientes. Además, las reconstrucciones a partir de los gen *ef1α* y *coll* sugieren la existencia de una relación filogenética más estrecha entre las tribus Lachnini y Tramini (ver figura 1.14). Aunque la agrupación no presentó un apoyo estadístico elevado, esta relación es concordante con los resultados obtenidos por Normark (2000), quien propuso que la tribu Eulachnini ocupa la posición basal de la subfamilia Lachninae. Los resultados de Normark, además, sugieren una relación filogenética más estrecha entre la tribu Tramini y las especies *Tuberolachnus salignus* y *Nippolachnus piri*, miembros de la tribu Lachnini en la clasificación de Remaudière, Stroyan y Quednau (Remaudière y Stroyan, 1984; Remaudière y Quednau, 1988; Quednau y Remaudière, 1994). Este resultado llevó a Normark a sugerir que estas especies fueran clasificadas en la tribu Tuberolachnini, siguiendo la propuesta de la clasificación de Mamontova (Mamontova, 1972; Mamontova, 1980; Normark, 2000). Los resultados presentados en este capítulo, en el que se han incluido las secuencias del gen *ef1α* obtenidas por Normark para las dos especies de la tribu Tramini y una

nueva secuencia para la especie *Tuberolachnus salignus*, confirman esta relación, que aparece apoyada por un valor de bootstrap de 69% en la reconstrucción realizada a partir de esta secuencia (ver figura 1.14). Por otro lado, en los análisis realizados a partir del gen *coll* se incluyeron las secuencias correspondientes a la tribu Tramini y a la especie *Nippolachnus piri* obtenidas por Normark, obteniendo también una estrecha relación entre ellas (ver figura 1.21), apoyada por un valor de bootstrap de 89%. Los resultados sugieren, por tanto, la posibilidad de la parafilia de la tribu Lachnini y de la relación más cercana de algunas de sus especies con la tribu Tramini. La relación filogenética más estrecha entre las tribus Lachnini y Tramini deja a la tribu Eulachnini en la posición basal de la subfamilia, hecho que tiene implicaciones importantes para la comprensión de la evolución del modo de alimentación en la familia Aphididae, que serán discutidas más adelante (ver apartado 5.2).

Por lo que respecta a las dos tribus que forman la subfamilia Aphidinae (Remaudière y Remaudière, 1997), la monofilia de la tribu Aphidini fue más general y se vio mejor apoyada que la correspondiente a la tribu Macrosiphini en las reconstrucciones obtenidas en este estudio. Por otro lado, ambas tribus han formado, de manera consistente, un clado en el que se incluía siempre la especie representante de la subfamilia Pterocommatinae utilizada en cada caso (*Pterocomma populeum*, *P. populifoliae* o *P. pilosum* dependiendo del gen, ver tabla 1.1). La inclusión en un mismo clado de los representantes de las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae se vio apoyada generalmente por valores estadísticos muy elevados. La relación filogenética entre estas dos subfamilias no es sorprendente, ya que, a pesar de ser independientes en la clasificación de Remaudière, Stroyan y Quednau (1984; 1988; 1994), ambas estaban incluidas en el mismo taxón en la mayoría de clasificaciones anteriores. En la clasificación propuesta por Heie (1980), ambas subfamilias estaban incluidas en un mismo taxón, denominado familia Aphididae, que incluía las subfamilias Aphidinae, Macrosiphinae y Pterocommatinae (equivalentes a las tribus Aphidini, Macrosiphini y la subfamilia Pterocommatinae en la clasificación de Remaudière, Stroyan y Quednau, ver tabla 1.1). La división de este grupo en dos taxones independientes se fundamenta en las diferencias entre ambos relativas al tipo de ciclo biológico y

de hospedador. Las especies de la subfamilia Pterocommatinae presentan ciclos monoicos sobre especies de la familia Salicaceae. Por su parte, las especies de la subfamilia Aphidinae viven sobre un elevado número de especies de plantas, y se acepta que su ciclo ancestral era dioico, aunque la gran mayoría de especies de este taxón presentan hoy en día ciclos no alternantes (von Dohlen *et al.*, 2006). Sin embargo, la división da lugar a una clasificación que no refleja la relación filogenética existente entre estas dos subfamilias, y que es evidente dado el elevado apoyo que recibe no sólo en los resultados presentados en este estudio sino también en otros anteriores (von Dohlen y Moran, 2000; Martínez-Torres *et al.*, 2001; von Dohlen *et al.*, 2006). De hecho, algunas de las reconstrucciones obtenidas en este capítulo han mostrado una relación filogenética más cercana entre la especie representante de la subfamilia Pterocommatinae y algunas especies de la tribu Macrosiphini, dando lugar a una disposición parafilética de la subfamilia Aphidinae. Por ejemplo, en la topología obtenida a partir de la secuencia del gen *ef1α* la especie *P. pilosum* se agrupó con los miembros de la tribu Macrosiphini con un apoyo de bootstrap de 65% (ver figura 1.14). Este hecho ya fue mostrado en un estudio anterior, en el que von Dohlen *et al.* (2006) utilizaron las secuencias de los genes *ef1α* y *coll* para determinar las relaciones filogenéticas entre los miembros de las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae, y en el que las especies de la tribu Macrosiphini agruparon junto con las correspondientes a la subfamilia Pterocommatinae con un apoyo de bootstrap de 68%. Esta relación también se observa en las reconstrucciones obtenidas en el presente capítulo en el análisis de las posiciones primera y segunda de codón de los genes *lwrh* y *atp6*, aunque siempre con un valor de bootstrap menor a 50%. No obstante, en otras reconstrucciones la topología resultante ha mostrado una relación más cercana entre las especies de las tribus Aphidini y Macrosiphini, dejando al representante de la subfamilia Pterocommatinae en la posición basal de este clado y coincidiendo con las clasificaciones taxonómicas. Además, en algunas de las reconstrucciones el apoyo estadístico a esta relación ha sido mucho más elevado que el de la relación alternativa antes mencionada. Las dos tribus de la subfamilia Aphidinae forman un grupo monofilético apoyado por un 80% de bootstrap en el árbol obtenido a partir de la secuencia completa del gen *lwrh*,

llegando a un 85% cuando la especie externa era excluida (ver figuras 1.8 y 1.10). Por otro lado, en ninguna de las reconstrucciones realizadas a partir de los conjuntos de datos combinados apareció la relación entre Pterocommatinae y Macrosiphini, sino que ambas tribus de la subfamilia Aphidinae agruparon juntas, con valores estadísticos elevados, llegando a una probabilidad *a posteriori* de 100% en el análisis mediante inferencia bayesiana del conjunto aaLEAC (ver figura 1.34). Por lo tanto, a pesar de algunas excepciones en los resultados presentados, los análisis realizados apoyan la monofilia de la subfamilia Aphidinae, hecho que tiene una implicación importante en la evolución de los ciclos biológicos en este grupo (ver apartado 5.2). Por otro lado, algunos datos moleculares obtenidos a partir de secuencias correspondientes al endosimbionte primario de los pulgones, *Buchnera aphidicola*, apoyan también la validez de la monofilia de la subfamilia Aphidinae y la posición como taxón hermano a ésta de la subfamilia Pterocommatinae (asumiendo la validez de la coevolución entre ambos grupos de organismos). Las filogenias obtenidas a partir de los genes *groEL* (Fares *et al.*, 2005) y *repA2* (Silva *et al.*, 1998) dieron lugar a la agrupación de las dos tribus de Aphidinae con valores de bootstrap de 94% y 100%, respectivamente, dejando a los representantes de la subfamilia Pterocommatinae en posición basal. Dada la generalidad de la cercana relación entre las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae en las reconstrucciones filogenéticas del presente estudio, así como de otros anteriores, cabría la posibilidad de plantear que ambas subfamilias formaran un único grupo, como se ha considerado en algunas clasificaciones, como la propuesta por Heie (1980). Así, la subfamilia Pterocommatinae de Remaudière, Stroyan y Quednau (1984; 1988; 1994) podría formar parte de la subfamilia Aphidinae, como una tercera tribu, denominada Pterocommatini.

b) Relaciones filogenéticas profundas en la familia Aphididae

La falta de resolución para los nodos más profundos del árbol filogenético de la familia Aphididae ha caracterizado los estudios previos sobre esta materia basados en datos moleculares, y ha podido observarse también en varias de

las reconstrucciones obtenidas en este capítulo en los análisis independientes de las secuencias utilizadas. A pesar de ello, los análisis de las secuencias correspondientes al gen *lwrh* (particularmente cuando la especie externa fue excluida) y de los conjuntos de datos combinados han mostrado algunas relaciones entre las subfamilias de pulgones analizadas que suponen un importante avance en el conocimiento de la filogenia de este grupo. El resultado más importante que se deriva de los análisis filogenéticos moleculares realizados en este capítulo es que las subfamilias analizadas pueden agruparse en tres grandes linajes. Estos linajes se han denominado en el presente estudio como: **A+D**, en el que se agruparon las especies de las subfamilias Aphidinae, Calaphidinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae y Pterocommatinae; **E+T**, en el que se incluyen los representantes de las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae, Hormaphidinae, Mindarinae y Thelaxinae; y **L**, formado por las especies de la subfamilia Lachninae. Los tres grandes grupos han presentado en varias reconstrucciones apoyos estadísticos de moderados a muy altos. Algunas de las topologías obtenidas, además, sugieren que la subfamilia Lachninae ocupa la posición basal del árbol filogenético de la familia Aphididae.

La eliminación de la especie externa, *Daktulosphaira vitifoliae*, en el análisis independiente del gen *lwrh*, dio lugar a un apoyo elevado para la agrupación de las subfamilias incluidas en el linaje denominado A+D (80% de bootstrap, ver figura 1.10). En los análisis combinados, el apoyo estadístico de este clado llegó a ser de una probabilidad *a posteriori* de 100% en la reconstrucción obtenida mediante inferencia bayesiana a partir del conjunto aaLEA (ver figura 1.27). En este grupo se incluyeron las especies analizadas que pertenecían a las subfamilias Aphidinae, Calaphidinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae y Pterocommatinae. El nombre dado a esta agrupación deriva de las iniciales de las dos familias que, en la clasificación de Heie (1980) incluían a todas las subfamilias mencionadas (ver tabla I.1). Como se ha comentado anteriormente, dentro del linaje A+D, los análisis realizados han apoyado fuertemente la relación filogenética entre las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae. El resto de relaciones dentro del linaje ha sido más variable entre las distintas reconstrucciones, y con apoyos estadísticos generalmente más bajos. Las dos

especies representantes de la subfamilia Chaitophorinae formaron un grupo monofilético en casi todos los árboles filogenéticos mostrados, con apoyos estadísticos muy elevados, llegando a un 100% de bootstrap en el análisis del gen *lwrh* al excluir la especie externa (ver figura 1.10). Los miembros de la subfamilia Chaitophorinae se agruparon generalmente junto al único representante de la subfamilia Drepanosiphinae incluido en este trabajo, recibiendo esta relación también apoyos generalmente elevados (95% de bootstrap en el análisis del conjunto aaLEA, ver figura 1.26). La relación entre estas dos subfamilias también apareció en los resultados obtenidos por von Dohlen y Moran (2000) a partir de secuencias mitocondriales (ver figura 1.2). Por otro lado, aunque no aparece en todas las reconstrucciones, los análisis también apoyan en general la monofilia de la subfamilia Calaphidinae, apoyada por un bootstrap de 95% en la topología del análisis del gen *lwrh* mencionado anteriormente (ver figura 1.10). La posición de esta subfamilia ha sido variable entre las distintas reconstrucciones, ocupando en algunas de ellas la posición basal de la filogenia de la familia Aphididae (ver, por ejemplo, la figura 1.8). La variabilidad en la posición de esta subfamilia puede deberse a la existencia de tasas aceleradas de sustitución nucleotídica en algunas de las secuencias analizadas. Para varios de los genes utilizados, así como para los conjuntos de datos combinados, las especies de esta subfamilia mostraron tasas de evolución significativamente aceleradas respecto a las correspondientes a las especies de las subfamilias Chaitophorinae y Drepanosiphinae (ver tabla 1.5). En aquellas reconstrucciones en las que las especies representantes de esta subfamilia quedaron incluidas dentro del linaje A+D, la posición que ocuparon fue en algunas ocasiones basal, apareciendo una relación más estrecha entre los grupos de Aphidinae+Pterocommatinae y Chaitophorinae+Drepanosiphinae. Esta relación tuvo un apoyo, por ejemplo, de un 82% de bootstrap en la topología obtenida en el análisis por neighbor-joining del conjunto de datos aaLEA (ver la figura 1.26). Sin embargo, otras reconstrucciones han apoyado la unión de las subfamilias Chaitophorinae y Drepanosiphinae con los miembros de la subfamilia Calaphidinae (bootstrap de 100% en el análisis por máxima parsimonia del conjunto aaLEA; figura 1.32), dando apoyo, por tanto, al taxón

denominado en la clasificación de Heie (1980) como familia Drepanosiphidae, al cual pertenecían estas tres subfamilias.

Las relaciones internas del linaje E+T fueron algo más inciertas que las halladas en el linaje A+D. El apoyo estadístico de este linaje, en el que se incluyeron los representantes de las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae, Hormaphidinae, Mindarinae y Thelaxinae, no fue elevado en la mayoría de reconstrucciones en las que apareció. No obstante, en aquellos análisis en los que no se incluyeron las especies de la tribu Eriosomatini, el apoyo del grupo monofilético formado por el resto de integrantes del linaje E+T fue muy elevado (ver, por ejemplo, la figura 1.30). Como se ha mencionado anteriormente, en ninguna de las topologías obtenidas se recuperó la monofilia de la subfamilia Eriosomatinae, aunque los análisis apoyaron fuertemente la relación de las tribus Fordini y Pemphigini. Por otro lado, los resultados obtenidos en este capítulo mostraron, de manera general, un grupo formado por las especies de las subfamilias Anoeciinae, Hormaphidinae y Thelaxinae. Cabe recordar que los miembros de estas tres subfamilias, así como de la subfamilia Mindarinae, fueron agrupados en un único taxón, denominado familia Thelaxidae, en las clasificaciones de Börner (1952) y Börner y Heinze (1957) (ver Introducción general, apartado 2.2). La denominación de este linaje como E+T se debió a la inclusión en éste de la subfamilia Eriosomatinae y de los miembros de la familia Thelaxidae *sensu* Börner y Heinze (1957). Aunque su apoyo estadístico no fue en general elevado, el grupo de las subfamilias Anoeciinae, Hormaphidinae y Thelaxinae apareció en gran parte de las reconstrucciones obtenidas a partir de los análisis independientes de los genes *lwrh* y *atp6*, así como en los correspondientes a los conjuntos de datos combinados ntLEA y aaLEA. Esta agrupación llegó a mostrar un apoyo de una probabilidad *a posteriori* de 100% en la topología resultante del análisis mediante inferencia bayesiana del conjunto de datos combinados aaLEA (figura 1.30). Además, las topologías obtenidas sugieren la existencia de una relación filogenética más estrecha entre las subfamilias Anoeciinae y Hormaphidinae. De nuevo, los apoyos estadísticos para esta agrupación fueron, en general, bajos, aunque llegaron a una probabilidad *a posteriori* de 95% en el análisis recién mencionado. Ninguna de las relaciones entre subfamilias halladas dentro del linaje E+T apareció en

los estudios previos basados en datos moleculares, si bien es cierto que no todos estos grupos se hallaban representados en ellos (von Dohlen y Moran, 2000; Martínez-Torres *et al.*, 2001).

Los análisis independientes de los genes empleados en este estudio han dado lugar a resultados incongruentes respecto a la posición de la especie *Mindarus abietinus*, único representante analizado de la subfamilia Mindarinae. Las reconstrucciones obtenidas a partir de los genes *ef1a* y *atp6* han coincidido en situar esta especie como hermana del clado formado por las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae, aunque nunca con valores de apoyo estadístico elevado. Sin embargo, el uso de las secuencias correspondientes al gen *lwrh* y de los conjuntos de datos combinados ntLEA y aaLEA produjo topologías en las que esta especie se posicionó bien como hermana del clado formado por las tribus Fordini y Pemphigini, bien dentro de un clado compartido con las especies representantes de las subfamilias Anoeciinae, Hormaphidinae y Thelaxinae. La discrepancia en la posición filogenética de esta subfamilia puede deberse en parte a la existencia de tasas aceleradas de sustitución, detectadas para el gen *ef1a* y el conjunto de datos combinados ntLEA. La agrupación de *M. abietinus* en el linaje E+T, independientemente de su ubicación dentro de éste, recibió apoyos más elevados, llegando a valores superiores a 90% en algunas reconstrucciones en las que no se incluyó la tribu Eriosomatini (ver la figura 1.30). En los resultados obtenidos por von Dohlen y Moran (2000) (figura 2.1) esta especie quedó agrupada con los representantes de la tribu Eriosomatini, aunque con bajo apoyo estadístico.

El último linaje definido fue el denominado linaje L, formado únicamente por las especies representantes de la subfamilia Lachninae. Como se ha mencionado anteriormente, los resultados obtenidos en este capítulo apoyan la monofilia de este grupo reconocido clásicamente en las clasificaciones taxonómicas (Heie, 1980; Remaudière y Remaudière, 1997). Además, las reconstrucciones filogenéticas realizadas apoyan en general la hipótesis de que la subfamilia Lachninae ocupa la posición basal en el árbol filogenético de la familia Aphididae. Los análisis independientes de cada una de las secuencias han mostrado al menos alguna topología que apoya esta posición, tanto en las reconstrucciones sin constreñir como en aquellas constreñidas a mantener los

tres grandes linajes. El apoyo a la posición basal de la subfamilia Lachninae en los análisis independientes ha llegado a ser de 100% de bootstrap en el análisis constreñido del gen *ef1 α* (figura 1.16). La mayoría de reconstrucciones de los análisis combinados han mostrado también topologías con las especies de Lachninae en posición basal, con apoyos estadísticos de moderados a muy altos en el análisis del conjunto ntLEA, y con cualquiera de los 4 métodos de reconstrucción empleados (ver figura 1.31). El análisis mediante máxima verosimilitud del conjunto de datos ntLEAC, en que se incluyeron todos los datos moleculares disponibles para 19 especies de pulgones, reveló también una topología en la que la subfamilia Lachninae quedó como taxón hermano del resto (figura 1.33). En los estudios previos basados en datos moleculares las especies utilizadas pertenecientes a esta subfamilia también ocuparon, en algunas de las reconstrucciones, una posición cercana a la basal (von Dohlen y Moran, 2000; Martínez-Torres *et al.*, 2001) (figuras 1.2 y 1.3). Por otro lado, el test ELW para la comparación de hipótesis filogenéticas alternativas rechazó, utilizando como datos el conjunto combinado ntLEA, aquellos árboles en los que se forzó que los linajes A+D o E+T ocuparan la posición basal (aunque no rechazaron una topología en la que las especies del linaje E+T ocupaban la posición basal sin formar un grupo monofilético). Aunque la subfamilia Lachninae no ocupa esta posición en las propuestas filogenéticas basadas en datos morfológicos de Heie (1987) y Wojciechowski (1992), la idea de la basalidad de este taxón no es nueva. Algunos autores como Baker (1920) o Shaposhnikov (1964) ya sugirieron anteriormente, en sus clasificaciones, que la subfamilia Lachninae era el grupo más antiguo de pulgones. Conocer la posición filogenética de esta subfamilia es fundamental para determinar la polaridad de la evolución de muchas de las características de los pulgones, tanto morfológicas como ecológicas, como su alimentación o sus ciclos biológicos (ver apartado 5.2).

Los datos moleculares empleados en esta tesis doctoral han permitido realizar algunos avances en el conocimiento de las relaciones filogenéticas entre los principales grupos de pulgones, mejorando en algunos aspectos los resultados obtenidos en estudios anteriores, en los que las reconstrucciones filogenéticas obtenidas mostraron una elevada falta de estructura

estadísticamente apoyada para los nodos profundos del árbol. Como se ha comentado anteriormente, los diversos análisis realizados en este capítulo han apoyado algunas relaciones entre tribus no presentes en los estudios de von Dohlen y Moran (2000) y Martínez-Torres *et al.* (2001). Algunos ejemplos de estas relaciones son las halladas entre las tribus Fordini y Pemphigini o la de las tres tribus componentes de la subfamilia Hormaphidinae. Además, los diversos análisis realizados han permitido apoyar, por primera vez con datos moleculares, algunas relaciones en los niveles más profundos de la filogenia de la familia Aphididae. Los dos trabajos previos que abordaron las relaciones filogenéticas entre los principales grupos de pulgones mediante la obtención de datos moleculares utilizaron secuencias correspondientes al DNA mitocondrial de estos insectos. Este tipo de secuencias puede no ser siempre ideal para el estudio de relaciones filogenéticas profundas, aunque los genes que codifican los rRNAs han sido utilizados con éxito para realizar la inferencia de nodos muy antiguos. Para las relaciones filogenéticas entre los principales grupos de pulgones, las secuencias nucleares utilizadas en este capítulo, particularmente las correspondientes al gen *lwrh*, han sido más útiles para la resolución de los nodos que las mitocondriales

Las relaciones filogenéticas existentes dentro de cada uno de los tres grandes linajes descritos anteriormente son más concordantes con la filogenia basada en caracteres morfológicos propuesta por Wojciechowski (1992) que con la sugerida por Heie (1987) (ver figura 1.8). Asimismo, estas agrupaciones coinciden en gran medida con las clasificaciones propuestas por Börner (1952) y Börner y Heinze (1957), muy similares a los grupos principales de la hipótesis filogenética de Wojciechowski (1992). La agrupación de las subfamilias que forman el linaje A+D coincide en gran medida con uno de los grupos que aparecen en la filogenia propuesta por este autor, en la que todas ellas estaban agrupadas en las familias Aphididae y Drepanosiphidae. La principal diferencia estriba en que este autor incluyó en este clado también a los miembros de la subfamilia Lachninae. Las subfamilias Aphidinae, Calaphidinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae y Lachninae formaban además un taxón denominado Semnocnemidia en las clasificaciones de Börner (1952) y Börner y Heinze (1957), aunque con diferencias en el nivel taxonómico y las

agrupaciones internas. Tanto Wojciechowski como Heie propusieron un estrecha relación de hermandad filogenética entre la subfamilias Lachninae y el clado de Aphidinae y Pterocommatinae, relación que ha sido ampliamente aceptada. Sin embargo, los datos moleculares obtenidos en este trabajo no apoyaron en ningún análisis esta relación. De hecho, los test de topologías alternativas realizados a partir del conjunto de datos ntLEA rechazaron la relación filogenética entre estas tres subfamilias. El segundo gran grupo que aparece en la propuesta realizada por Wojciechowski incluía los miembros de las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae, Hormaphidinae, Mindarinae y Thelaxinae, además de otras subfamilias poco diversas y no representadas en esta tesis doctoral. Esta agrupación coincide totalmente con la composición del linaje propuesto en el presente estudio y que ha sido denominado E+T, aunque las relaciones entre las subfamilias difieren con las sugeridas por Wojciechowski. El grupo es también equiparable al taxón Procnemidia de las clasificaciones de Börner (1952) y Börner y Heinze (1957), mencionadas anteriormente. Heie, sin embargo, realizó una agrupación en la que se incluyeron las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae y Hormaphidinae, pero agrupó las subfamilias Mindarinae y Thelaxinae junto a su familia Drepanosiphidae en función de la presencia de grandes placas céreas ventrales en la parte posterior del abdomen de las hembras ovíparas. A pesar de la similitud en la composición de los grandes grupos entre la filogenia de Wojciechowski y los resultados del presente estudio, los test ELW de comparación de topologías alternativas rechazaron la hipótesis propuesta por este autor, así como la de Heie, probablemente como consecuencia, en gran parte, de la relación propuesta por ambos autores entre las subfamilias Aphidinae y Lachninae.

c) Apoyo morfológico a la existencia de los tres grandes linajes

Se puede invocar una serie de caracteres morfológicos para apoyar la existencia de los tres linajes principales de la familia Aphididae propuestos a la luz de los resultados obtenidos en el presente estudio. Cada uno de estos tres linajes muestra un grupo de características, bien plesiomórficas bien

apomórficas, comunes a las subfamilias que los componen y que los distinguen del resto de linajes. Wojciechowski (1992) definió dos “líneas de desarrollo” en los pulgones en función de la forma del tubo digestivo y de la presencia o ausencia de triomatidio en las ninfas de primer estadio. Una de las líneas de desarrollo se caracteriza por su tubo digestivo corto, que para este autor representa el estado ancestral, y la presencia de triomatidio en la primera ninfa. En esta línea se incluyen las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae, Hormaphidinae, Mindarinae y Thelaxinae (además de otras dos subfamilias no representadas en esta tesis doctoral), subfamilias que conforman el linaje definido en esta tesis doctoral como E+T. Los pulgones incluidos en estas subfamilias muestran generalmente, además, cornículos muy cortos o tipo poro y, en el último artejo antenal, el filamento terminal más corto que la mitad de la longitud de la base (Wojciechowski, 1992). La longitud relativa de las dos partes del último segmento de la antena parece ser un buen carácter diagnóstico, ya que su estado es, según Wojciechowski, estable en los taxones superiores de la familia Aphididae. Además, algunas de las subfamilias de este linaje comparten otras características relativas a sus ciclos biológicos, que serán discutidas en el apartado 5.2. Heie (1987) propuso la existencia de un clado bastante similar, pero excluyendo la subfamilia Thelaxinae, la cual situó filogenéticamente más cerca de su familia Drepanosiphidae, en función de la presencia en ambas de placas glandulares ventrales en las hembras sexuadas. Sin embargo, el propio Heie reconoció que las placas glandulares ventrales de las hembras sexuadas no aparecían en varios géneros de su familia Drepanosiphidae, y Wojciechowski apuntó que, aunque menos desarrolladas, éstas placas también se hallan en otros grupos.

La segunda línea de desarrollo descrita por Wojciechowski (1992) se caracteriza por mostrar tubo digestivo enrollado y la ausencia de triomatidio en el primer estadio ninfal, ausencia que representa el estado plesiomórfico de este carácter según este autor. En este grupo, Wojciechowski incluyó las subfamilias Aphidinae, Calaphidinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae, Lachninae y Pterocommatinae. Como se ha mencionado anteriormente, este grupo coincide con el linaje que se ha denominado en el presente estudio como A+D, salvo por la inclusión de la subfamilia Lachninae. La forma del tubo

digestivo y la ausencia de triomatidio en la primera ninfa son compartidos entre los componentes de los linajes denominados A+D y L, pero existen al menos otras dos características que permiten diferenciar las especies pertenecientes al linaje A+D tanto de los componentes de la subfamilia Lachninae como de los del linaje E+T. Las especies de las subfamilias del linaje A+D muestran, en general, cornículos bien desarrollados, y el filamento terminal del último segmento antenal es más largo que la mitad de su base (Wojciechowski, 1992). Los miembros de la subfamilia Lachninae, al igual que lo descrito para el linaje E+T, muestran cornículos poriformes o poco elevados y el filamento terminal del último segmento de sus antenas es más corto que la mitad de la base.

Existen además otros caracteres que distinguen a los pulgones pertenecientes a la subfamilia Lachninae de los miembros de los otros dos linajes, entre los cuales se incluyen la división en 5 segmentos del rostro (4 segmentos en el resto de subfamilias) y la ausencia de glándulas accesorias en el sistema reproductivo masculino. El hecho de que los datos moleculares empleados en este capítulo sugieran que esta subfamilia ocupa la posición basal de la filogenia tiene implicaciones importantes para la discusión de la evolución de los caracteres morfológicos en este grupo de insectos. Según Heie (1987), el estado de muchos de los caracteres de Lachninae son plesiomórficos o lo parecen, y la edad que los afidólogos han asignado a este grupo depende en gran medida de si estos estados han sido realmente considerados o no ancestrales. Si se acepta que esta subfamilia es basal respecto al resto de pulgones y que muchos de sus caracteres morfológicos representan el estado ancestral (algo no necesariamente cierto), la evolución de los caracteres morfológicos mencionados anteriormente podría haber ocurrido de la siguiente manera. Por un lado, el rostro de los pulgones habría sufrido una fusión de dos segmentos, pasando de los 5 presentes en la subfamilia Lachninae, a los 4 del resto de subfamilias. Wojciechowski ya apuntó que la edad relativa y la posición filogenética de esta subfamilia dependen en gran medida de cómo se interprete este carácter. En general, ha prevalecido la idea de que el rostro de 4 segmentos representaba el estado ancestral. Sin embargo, Baker (1920) y el propio Heie (1976) propusieron que el rostro de 5 sería ancestral y que el rostro de 4 segmentos derivaría de la

fusión de los segmentos IV y V. La posición filogenética que la subfamilia Lachninae ocupa en la mayoría de árboles filogenéticos mostrados en el presente estudio apoyaría esta última hipótesis. Este resultado también sugiere que los machos de los pulgones ancestrales carecerían de glándulas accesorias en el sistema reproductor, apareciendo éstas en el resto de grupos. Los cornículos habrían evolucionado desde un estado poco elevado o tipo poro a estar bien desarrollados en los miembros del linaje A+D, en los que además el filamento terminal del último segmento antenal se habría alargado hasta presentar una longitud mayor que la mitad de su base. Por otro lado, la forma enrollada del tubo digestivo representaría el estado original, a diferencia de lo sugerido por Wojciechowski, reduciéndose en los miembros del linaje E+T. Por último, en este último linaje, habría aparecido el triomatidio del ojo compuesto en la primera ninfa. Aún aceptando que la subfamilia Lachninae ocupe la posición basal de la filogenia de los pulgones, es bastante improbable que todos sus caracteres presenten hoy en día el estado ancestral. Por ello, este escenario puede considerarse únicamente como una hipótesis de trabajo para otros estudios con análisis más detallados sobre la morfología de este tipo de insectos, en los que se comparen además los caracteres homólogos de los miembros del taxón hermano de la familia Aphididae, formado por los insectos de las familias Adelgidae y Phylloxeridae.

5.2. Implicaciones en el conocimiento sobre el origen y la evolución de los ciclos biológicos de los pulgones

La mayoría de especies de pulgones desarrollan su ciclo biológico sobre una única especie vegetal, sobre la que aparecen todas las formas. Este tipo de ciclo, denominado monoico, se contraponen al ciclo dioico, en el que tiene lugar una alternancia obligada entre dos hospedadores vegetales filogenéticamente alejados. Las especies dioicas de pulgones alternan entre un hospedador primario, típicamente una planta leñosa, sobre el que aparecen generalmente las formas sexuales, y un hospedador secundario, normalmente una planta herbácea, sobre la que sólo aparecen formas partenogenéticas (ver Introducción general, apartado 1.1). Los ciclos dioicos aparecen en las tres

familias componentes de la superfamilia Aphidoidea (Adelgidae, Aphididae y Phylloxeridae). Sin embargo, algunos autores han concluido que el ciclo ancestral de los pulgones vivíparos (familia Aphididae) era un ciclo monoico sobre plantas gimnospermas (Heie, 1987; Shaposhnikov, 1987a). La ancestralidad del ciclo monoico sobre gimnospermas es congruente con la hipótesis de la basalidad de la subfamilia Lachninae en el árbol filogenético de los pulgones. Las especies de esta subfamilia muestran en todos los casos ciclos monoicos, desarrollados sobre plantas angiospermas en las tribus Lachnini y Tramini y sobre gimnospermas en la tribu Eulachnini. Los análisis filogenéticos realizados a partir de las secuencias de los genes *ef1 α* y *coll*, tanto en este trabajo como en estudios anteriores (Normark, 2000), han apoyado que la tribu Eulachnini ocupe la posición basal dentro de la subfamilia Lachninae, sugiriendo así que el ciclo monoico sobre gimnospermas es ancestral en esta subfamilia. La alimentación sobre angiospermas de las especies pertenecientes a Lachnini y Tramini podría explicarse, por tanto, mediante una única transición desde gimnospermas en el ancestro de estas dos tribus (figura 1.36).

Los resultados mostrados en esta tesis doctoral apoyan, además, la hipótesis de que la subfamilia Lachninae es basal dentro de los Aphididae, hecho que refuerza a su vez la hipótesis de que el ciclo monoico sobre gimnospermas es ancestral dentro de este grupo de insectos. Este tipo de ciclo habría dado lugar, por tanto, a la aparición de ciclos desarrollados sobre plantas angiospermas en otros grupos de pulgones, una transición que podría haber dado lugar a la existencia de la rápida radiación adaptativa ocurrida durante el Cretácico Superior. El conocimiento preciso del número de transiciones desde gimnospermas a angiospermas ocurridos en la familia Aphididae requiere del conocimiento preciso de las relaciones filogenéticas entre todas las subfamilias que la componen. Para las subfamilias analizadas en este trabajo, y a la luz de los resultados obtenidos, una explicación parsimónica podría implicar la existencia de sólo cuatro transiciones, incluyendo la mencionada anteriormente para el ancestro de las tribus Lachnini y Tramini (ver figura 1.36). Dentro del linaje A+D, todas las subfamilias analizadas utilizan como hospedadores (primarios en el caso de las especies

alternantes) plantas angiospermas. Sin embargo, parece necesario proponer para este linaje la existencia de, al menos, dos transiciones de la alimentación desde el estado ancestral sobre gimnospermas. Varios autores coinciden en asegurar que el ancestro de la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie debió de vivir sobre coníferas. Esto se debe a que las especies de la subfamilia Neophyllaphidinae *sensu* Remaudière, Stroyan y Quednau (que formaba parte de la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie), las cuales se considera que han evolucionado muy poco desde finales del Mesozoico (Heie, 1987), viven aún hoy en día sobre especies de coníferas de los géneros *Araucaria* y *Podocarpa* (Shaposhnikov, 1987; Heie, 2004; von Dohlen *et al.*, 2004). Asumiendo que el ancestro de Drepanosiphidae *sensu* Heie vivía sobre coníferas, una única transición hacia angiospermas podría explicar este tipo de alimentación en las especies de las subfamilias Calaphidinae, Chaitophorinae y Drepanosiphinae, analizadas en el presente trabajo. Este hecho conllevaría necesariamente la existencia de otra transición en el ancestro del clado formado por las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae.

Por otro lado, la falta de resolución hallada para las relaciones entre las subfamilias analizadas que quedaron incluidas en el linaje E+T dificulta la discusión sobre cuantos cambios de hospedador desde gimnospermas a angiospermas han ocurrido en este grupo. Todas las subfamilias analizadas de este linaje utilizan como hospedadores (primarios en el caso de especies alternantes) plantas angiospermas salvo las especies de la subfamilia Mindarinae. Por tanto, el número de transiciones de este linaje podría reducirse a uno solo, ocurrido en el ancestro del grupo (figura 1.36). Este único cambio implicaría una posterior reversión del carácter en el ancestro de la subfamilia Mindarinae (desde angiosperma a gimnosperma) o, alternativamente, aceptar que esta subfamilia ocupa la posición basal de este linaje. Esta última opción sería coherente con el hecho de que las especies de la subfamilia Mindarinae son consideradas muy primitivas y, según varios autores, su alimentación sobre coníferas es ancestral (Heie, 1987; Heie, 2004; von Dohlen *et al.*, 2004). Además, esta subfamilia ocupa la posición basal del clado de la filogenia de Wojciechowski (1992) que es compatible con el linaje denominado E+T.

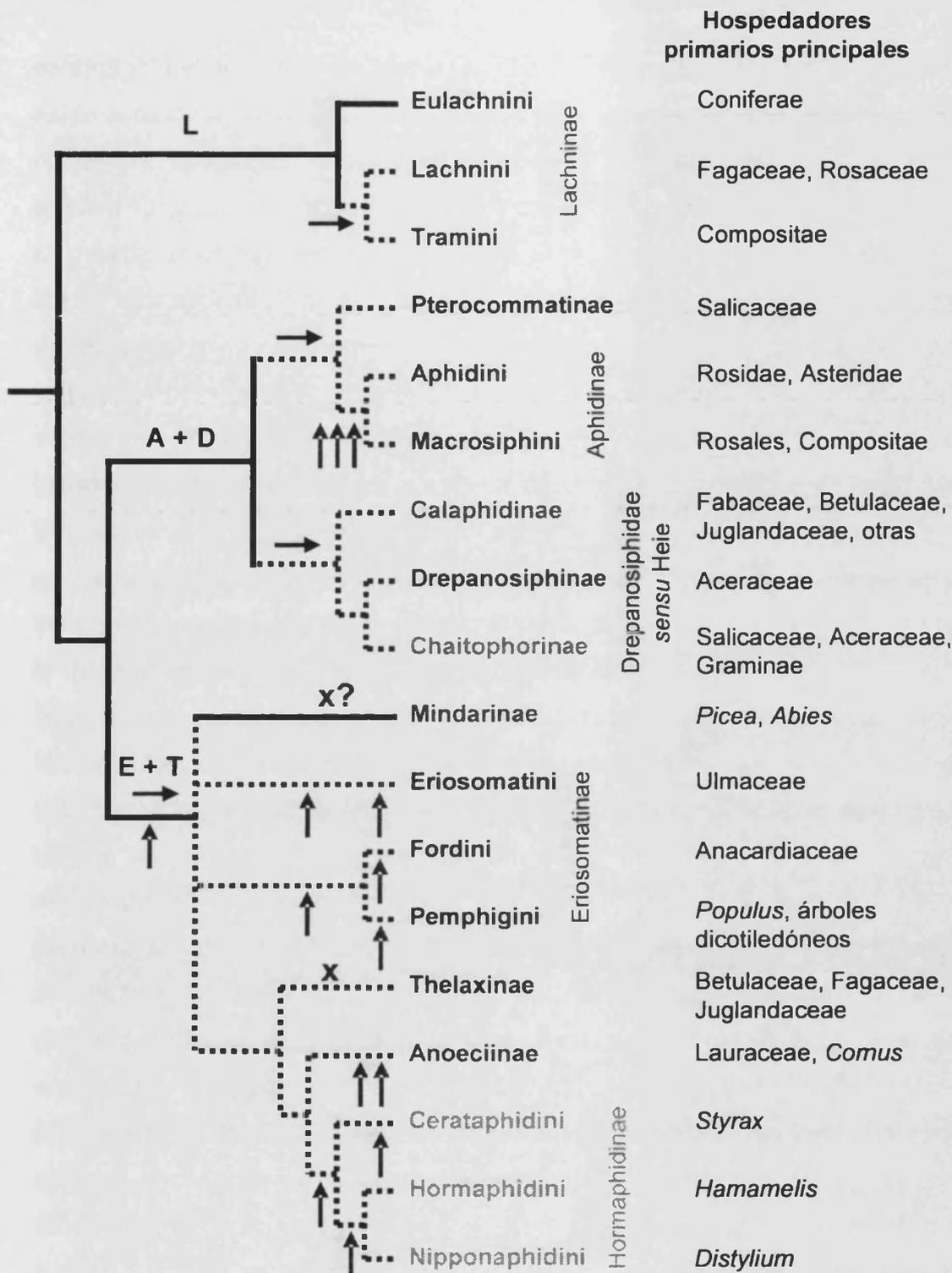


Figura 1.36. Tres posibles escenarios para la evolución de la alternancia de hospedador en los pulgones y un posible escenario para la evolución de su alimentación. A la derecha de cada subfamilia o tribu se muestra el tipo de hospedador primario principal del taxón (Nieto Nafria *et al.*, 1998, 2003; von Dohlen y Moran, 2000). Las flechas verticales indican tres hipótesis diferentes para la aparición de la alternancia de hospedador: en verde, los 7 orígenes propuestos por von Dohlen y Moran (2000); en azul, 5 orígenes en función de algunas relaciones fuertemente apoyadas en el presente estudio (ver texto); rojo, sólo 2 orígenes de la alternancia, que implican 1 o 2 pérdidas de la misma (cruces rojas). Los linajes asociados a plantas gimnospermas aparecen indicados con líneas continuas, mientras que aquéllos asociados a angiospermas se indican con líneas discontinuas. Las flechas negras horizontales indican transiciones de la alimentación desde plantas gimnospermas a plantas angiospermas.

La falta de estructura filogenética en los nodos más profundos de la filogenia de la familia Aphididae, hallada por von Dohlen y Moran (2000), condujo a estas autoras a apoyar la existencia de una rápida radiación adaptativa a nivel de tribu. Por otro lado, la larga existencia independiente de las tribus, unida a la falta de estructura filogenética profunda, dio pie a las autoras a sugerir la existencia de 7 orígenes independientes de la alternancia de hospedador en los pulgones. Estos orígenes de la alternancia habrían ocurrido en el ancestro de cada uno de los grupos siguientes: Anoeciinae, Aphidinae, Cerataphidini, Eriosomatini, Fordini, Hormaphidini+Nipponaphidini y Pemphigini (ver figura 1.36). Según von Dohlen y Moran, esta hipótesis cobra además sentido a la luz de la hipótesis de la restricción de la fundadora como explicación de la permanencia de la alternancia de hospedador en muchas de las especies de áfidos. Para algunos autores, la transferencia completa de todas las formas de los ciclos dioicos desde el hospedador primario (generalmente leñoso) al hospedador secundario (típicamente una planta herbácea) sería muy beneficioso en términos nutricionales. Existen numerosas explicaciones de corte adaptativo que tratan de explicar por qué el hospedador primario permanece en los ciclos biológicos de multitud de especies de pulgones. Moran (1988; 1990; 1992) ofreció una explicación alternativa, aunque no necesariamente excluyente, en términos de restricción evolutiva. Según esta autora, la forma fundadora de las especies alternantes ha llegado a especializarse de manera tan elevada a la vida sobre el hospedador primario que su transferencia (y por tanto su adaptación) a un hospedador secundario resulta muy improbable. Según von Dohlen y Moran (2000), si la hipótesis de la restricción de la fundadora es cierta, la especialización de esta forma también debe de suponer un impedimento para la transferencia entre hospedadores primarios alejados. Los hospedadores primarios de cada uno de los 7 grupos mencionados anteriormente pertenecen a grupos de plantas filogenéticamente alejados, con propiedades fenológicas necesariamente diferentes (von Dohlen y Moran, 2000). Según estas autoras, este hecho apoya la existencia de un origen de la alternancia de hospedador en el ancestro de cada uno de estos 7 grupos. Si la alternancia hubiera aparecido con anterioridad, en una única ocasión, la forma fundadora no podría haberse transferido a nuevos

hospedadores primarios de características tan diferentes. Sin embargo es muy probable que, como también mencionaron estas autoras, las fundadoras estuvieran menos especializadas a sus hospedadores en la época en que se originaron las tribus, presumiblemente durante el Cretácico Superior. Por tanto, un menor grado de especialización pudo permitir la transferencia de las fundadoras de una especie ancestral alternante entre hospedadores primarios alejados. Sobre los nuevos hospedadores podría haberse producido, entonces, una diversificación que daría lugar a las diferentes tribus. Posteriormente, las formas fundadoras podrían haberse especializado en mayor grado a los respectivos hospedadores primarios durante el largo tiempo de existencia de cada una de las tribus.

El tipo de retorno particular que ocurre en las especies alternantes de la subfamilia Aphidinae (retorno tipo afidino) aboga por, al menos, un origen independiente de la alternancia de hospedador en este taxón (von Dohlen y Moran, 2000). A diferencia de lo que ocurre en el resto de subfamilias en los que se presentan ciclos dioicos, el retorno de tipo afidino conlleva la migración por separado de los machos y de las hembras ginóparas (ver Introducción general, apartado 1.1). Según Shaposhnikov (1964), este tipo de alternancia apareció en el Terciario, a la vez que la aparición de las plantas herbáceas. Este origen independiente queda apoyado por los resultados filogenéticos obtenidos en este trabajo, donde la subfamilia Aphidinae queda posicionada muy lejos (linaje A+D) del resto de grupos con alternancia de hospedador (todos incluidos en el linaje E+T). Como se ha comentado anteriormente (ver apartado 5.1), algunas de las reconstrucciones obtenidas en este trabajo en los análisis independientes han mostrado una relación filogenética más estrecha de la subfamilia Pterocommatinae con una de las tribus de la subfamilia Aphidinae, la tribu Macrosiphini. Este resultado fue anteriormente obtenido por von Dohlen *et al.* (2006), hecho que llevó a estos autores a sugerir que la alternancia de hospedador en la subfamilia Aphidinae tuvo en realidad dos orígenes independientes, uno para la tribu Aphidini y otro para la tribu Macrosiphini. Sin embargo, los análisis combinados, así como algunos de los independientes, realizados en este capítulo, han dado un apoyo mucho mayor a la relación filogenética entre las dos tribus de la subfamilia Aphidinae, dando

validez a su monofilia y separándola de la subfamilia Pterocommatinae. Este resultado apoya, por tanto, la hipótesis de la existencia de un único origen de la alternancia en la subfamilia Aphidinae. Por otro lado, tanto los miembros de la subfamilia Pterocommatinae como los del resto de integrantes del linaje A+D (subfamilias Calaphidinae, Chaitophorinae y Drepanosiphinae) se caracterizan por mostrar ciclos monoicos. Esto implica que el ancestro de este linaje pudo haber mantenido este tipo de ciclo, ancestral en la familia Aphididae, existiendo, dentro del linaje A+D, sólo una transición evolutiva hacia la alternancia de hospedador en el ancestro de la subfamilia Aphidinae.

El hecho de que varios de los nodos internos del linaje E+T no hayan quedado resueltos con elevados apoyos estadísticos no permite conocer con seguridad cuántos orígenes de la alternancia han ocurrido en este grupo. A pesar de ello, los resultados mostrados permiten apoyar la existencia de un número menor de orígenes de la alternancia de hospedador en este grupo respecto a los 6 orígenes propuestos por von Dohlen y Moran (2000) (de los 7 grupos con un origen independiente propuestos por estas autoras sólo 1, la subfamilia Aphidinae, no se halla incluido en el linaje E+T; ver figura 1.36). Por ejemplo, resulta mucho más parsimónico apoyar la existencia de un único origen de la alternancia para las tribus Fordini y Pemphigini, dado el elevado apoyo que ha recibido su hermandad filogenética a partir de los datos moleculares aportados en el presente estudio. El número de orígenes independientes podría reducirse aún más si se aportasen nuevos datos que apoyaran la monofilia de la subfamilia Eriosomatinae. Algo similar sucede con los orígenes propuestos por von Dohlen y Moran para la tribu Cerataphidini, por un lado, y Hormaphidini+Nipponaphidini, por otro. Estas tres tribus forman la subfamilia Hormaphidinae en la clasificación utilizada en esta tesis doctoral (Remaudière y Stroyan, 1984; Remaudière y Quednau, 1988; Quednau y Remaudière, 1994). Algunas de las reconstrucciones obtenidas en el análisis de los genes *ef1a* y *coll* han mostrado la agrupación monofilética de esta subfamilia, hecho que apoya, a su vez, la existencia de sólo un origen de la alternancia en este grupo. Tanto en el caso de las tribus Fordini y Pemphigini como en el de las tres tribus de la subfamilia Hormaphidinae, la transferencia de las especies ancestrales alternantes a nuevos hospedadores primarios pudo

estar facilitada por la existencia de una menor adaptación de la fundadora en el momento del origen de las tribus. Esta transferencia, además, pudo ser el punto de partida de una diversificación que diera lugar a la aparición de cada una de las tribus.

Como se ha comentado anteriormente, Wojciechowski (1992) propuso que la subfamilia Mindarinae era basal dentro de un grupo compuesto por las mismas subfamilias que las integrantes del linaje E+T (salvo por dos subfamilias no representadas en el presente estudio). Las especies de esta subfamilia muestran un ciclo monoico sobre especies vegetales de los géneros *Picea* o *Abies*. Su ciclo, además, es el más reducido de la familia Aphididae, con sólo tres generaciones a lo largo del año (Nieto Nafría y Mier Durante, 1998). La posición de *Mindarus abietinus*, único representante analizado de la subfamilia Mindarinae en el presente estudio, ha sido discrepante entre los diversos análisis realizados. Los análisis independientes de los genes *ef1 α* y *atp6* han apoyado su proximidad filogenética al clado formado por las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae. Sin embargo, tanto el análisis independiente del gen *lwrh* como los análisis combinados de los conjunto de datos ntLEA y aaLEA, han resultado en la inclusión de esta subfamilia dentro del linaje E+T, aunque en posiciones variables. Algunas características morfológicas de esta subfamilia parecen, de hecho, favorecer su inclusión en el linaje definido como E+T. Wojciechowski incluyó la subfamilia Mindarinae en una de sus "líneas de desarrollo", coincidente con el mencionado linaje, por la presencia de tubo digestivo corto y la ausencia de triomatidio en la primera ninfa (Wojciechowski, 1992). Además, como ocurre en las subfamilias pertenecientes al linaje E+T, en las especies de la subfamilia Mindarinae el filamento terminal del último antenómero es más corto que la mitad de la base, y los cornículos suelen ser cortos o poriformes, a diferencia de los cornículos bien desarrollados presentes en general en los representantes del linaje A+D. Los sexuales de la subfamilia Mindarinae son además enanos, como ocurre en las especies de las subfamilias Anoeciinae y Eriosomatinae.

Si la subfamilia Mindarinae ocupa la posición basal dentro del linaje E+T, como propuso Wojciechowski, el resto de integrantes de este linaje consistiría en un clado formado por las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae,

Hormaphidinae y Thelaxinae. Todas estas subfamilias, excepto Thelaxinae, se caracterizan por presentar ciclos dioicos. Además, las especies alternantes de las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae y Hormaphidinae muestran un tipo común de retorno al hospedador primario, denominado en este estudio como tipo eriosomatino. En las especies alternantes de estos grupos, el retorno se produce siempre mediante una forma denominada sexúpara, la cual da lugar en el hospedador primario a los machos y las hembras sexuales. Según Shaposhnikov (1964), el tipo de alternancia eriosomatino es más antiguo que el afidino, habiéndose originado probablemente en el Mesozoico. Conocer con exactitud el número de orígenes de este tipo de alternancia depende en gran medida del conocimiento exacto de las relaciones filogenéticas entre estos grupos. Como se ha mencionado anteriormente, von Dohlen y Moran propusieron 6 orígenes independientes en los grupos que en el presente estudio han formado parte del linaje E+T. En función de las verdaderas relaciones internas de este linaje, el número máximo de orígenes independientes de la alternancia podría ser 4, correspondientes a las subfamilias Anoeciinae y Hormaphidinae, la tribu Eriosomatini, y el clado formado por las tribus Fordini+Pemphigini. Este número podría reducirse a 3 si, como ya se ha mencionado, se comprobase la validez de la monofilia de la subfamilia Eriosomatinae, no apoyada por los datos moleculares empleados en el presente estudio. El número de orígenes podría ser aún menor aceptando como válida la relación filogenética entre las subfamilias Anoeciinae y Hormaphidinae, presente en la mayoría de reconstrucciones obtenidas en este capítulo. Si la subfamilia Mindarinae es realmente basal en el linaje denominado E+T, el escenario evolutivo podría reducirse incluso a la existencia de un único origen común para todos estos grupos (ver figura 1.36). Este escenario implicaría necesariamente una pérdida posterior de este carácter en el ancestro de la subfamilia Thelaxinae.

5.3. Implicaciones en el conocimiento sobre la coevolución entre los pulgones y su endosimbionte primario *Buchnera*

Las especies de insectos de la familia Aphididae presentan un elevado número de asociaciones simbióticas con bacterias, entre las cuales destaca, por su antigüedad y su generalidad, la asociación endosimbiótica con *Buchnera aphidicola*, denominada el endosimbionte primario de los pulgones (ver Introducción general, apartado 1.2). El empleo de la secuencia del gen que codifica el rRNA 16S, obtenida a partir del endosimbionte primario de especies de pulgones pertenecientes a 4 subfamilias, condujo a Munson *et al.* (Munson *et al.*, 1991a; Moran *et al.*, 1993; Moran *et al.*, 1994; Moran *et al.*, 1995) a proponer la hipótesis de la estricta coespeciación y coevolución entre los pulgones y *Buchnera*. Los autores llegaron a esta conclusión tras comprobar la total concordancia de sus resultados filogenéticos con la filogenia propuesta por Heie (1987) para la familia Aphididae. Posteriormente, Martínez-Torres *et al.* (2001) encontraron algunas discrepancias entre la filogenia de Heie y sus resultados filogenéticos obtenidos a partir de los genes que codifican el 16S rRNA y la subunidad β de la ATPasa-F, en un mejor muestreo de endosimbiontes de 8 subfamilias de pulgones. No obstante, estos resultados filogenéticos no eran incompatibles con las filogenias moleculares obtenidas por estos mismos autores para las respectivas especies de áfidos, apoyando por tanto la hipótesis de la coevolución.

Las filogenias moleculares obtenidas hasta la fecha, tanto para los pulgones como para sus endosimbiontes primarios, no permiten realmente realizar una comparación exhaustiva de las relaciones entre los principales grupos de ambos organismos, debido a la falta de estructura filogenética en los nodos más profundos de los árboles obtenidos en estos estudios. Las reconstrucciones obtenidas en el presente trabajo han permitido avanzar en el conocimiento de las relaciones de parentesco evolutivo entre las subfamilias de pulgones, pero es aún necesario llevar a cabo nuevas investigaciones acerca de la filogenia de la bacteria *Buchnera* para poder realizar una comparación completa de las relaciones filogenéticas en ambos grupos. La reciente secuenciación de los genomas completos de *Buchnera* de las especies

Acyrtosiphon pisum (Aphidinae) (Shigenobu *et al.*, 2000), *Baizongia pistaciae* (Eriosomatinae) (van Ham *et al.*, 2003), *Cinara cedri* (Lachninae) (Perez-Brocal *et al.*, 2006) y *Schizaphis graminum* (Aphidinae) (Tamas *et al.*, 2002), pertenecientes a tres subfamilias distintas de pulgones, puede ser muy útil para la búsqueda de secuencias de DNA con un nivel de variabilidad adecuado para abordar de nuevo la inferencia de las relaciones filogenéticas entre los endosimbiontes primarios de los principales grupos de pulgones.

A pesar de la mencionada falta de resolución, existen algunas relaciones coincidentes entre los resultados mostrados en el presente estudio para las relaciones filogenéticas entre pulgones y las topologías obtenidas en estudios previos para la filogenia de *Buchnera*. Por ejemplo, tanto Martínez-Torres *et al.* (2001) (ver figura 1.3) como Fares *et al.* (2002) hallaron un elevado apoyo estadístico para la relación entre los endosimbiontes primarios de las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae, una relación fuertemente apoyada también por los datos presentados en este capítulo para los pulgones de estas subfamilias. Las reconstrucciones realizadas a partir del gen 16S rDNA de *Buchnera* (Martínez-Torres *et al.*, 2001) (figura 1.3) también apoyaron otras relaciones concordantes con las mostradas en el presente estudio, como la monofilia de los endosimbiontes primarios de la tribu Fordini, o la cercana relación filogenética entre las subfamilias Calaphidinae y Chaitophorinae. Existen sin embargo algunas relaciones, fuertemente apoyadas por valores estadísticos, que son discrepantes con las relaciones halladas para sus respectivos insectos hospedadores. Por ejemplo, las reconstrucciones obtenidas a partir de la secuencia del gen que codifica la chaperona GroEL (Fares *et al.*, 2002) dieron lugar a una relación filogenética estrecha entre las especies *Tetraneura caerulea* (Eriosomatinae) y *Chaitophorus leucomelas* (Chaitophorinae) y entre las especies *Tuberolachnus salignus* (Lachninae) y *Thelaxes suberi* (Thelaxinae). Estas relaciones son muy discrepantes con las halladas para estas subfamilias en el presente estudio, lo cual sugiere la necesidad de investigar la razón por la que las secuencias del gen que codifica la proteína GroEL dan lugar a un apoyo estadístico tan elevado para las relaciones mencionadas. La existencia de una fuerte selección positiva sobre

esta secuencia, detectada por estos autores (Fares *et al.*, 2002; Fares *et al.*, 2005) podría ser en parte responsable de esos resultados.

La relación filogenética más destacable, coincidente en varias de las reconstrucciones filogenéticas obtenidas para ambos organismos, es la posición basal de las especies de la subfamilia Lachninae. Los endosimbiontes primarios de las especies representadas de esta subfamilia han ocupado la posición basal de la filogenia en algunas reconstrucciones realizadas a partir de las secuencias del gen *atpD* (Moya *et al.*, 2002) o del 16S rDNA (Gil *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos por Martínez-Torres *et al.* (2001) también mostraron esta relación, apoyada por un bootstrap de 61% en el análisis del gen 16S rDNA (figura 1.3) o hasta un 91% en la reconstrucción obtenida a partir de las secuencias de aminoácidos del gen que codifica la subunidad β de la ATPasa-F. La posición basal de las secuencias de *Buchnera* de la subfamilia Lachninae en el árbol filogenético de los endosimbiontes primarios de los pulgones es concordante con los resultados obtenidos en este capítulo a partir de secuencias pertenecientes a los insectos, hecho que apoyaría la existencia de una estricta coevolución y coespeciación entre ambos grupos de organismos desde la infección ocurrida en el ancestro de los pulgones actuales.

La comparación de las secuencias de los genomas de *Buchnera* en las cuatro especies anteriormente mencionadas reveló la existencia de una extremada conservación del orden génico para aquellos genes que aún comparten (van Ham *et al.*, 2003; Perez-Brocal *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2006). Esta estabilidad cromosómica contrasta sin embargo con la variabilidad en la posición y el orden de los genes que codifican los enzimas limitantes de las rutas de biosíntesis de los aminoácidos leucina y triptófano. En el caso de la leucina, se han hallado al menos 4 plásmidos distintos y 4 localizaciones cromosómicas diferentes para el grupo de genes *leuA*, *leuB*, *leuC* y *leuD* en las especies estudiadas en diversos trabajos, representantes de 5 subfamilias de pulgones (figura 1.37). En los primeros estudios sobre este tema, se halló que estos genes se hallaban localizados en el cromosoma en algunas especies de la subfamilia Eriosomatinae, las cuales presentaban además un plásmido críptico con los genes *repA1* y/o *repA2*, presentes en el plásmido de la leucina

en otras subfamilias (van Ham *et al.*, 1997; van Ham *et al.*, 2000). Estos hechos, unidos a que en *E. coli* estos genes se hallan también en el cromosoma, y apoyándose en la basalidad de la subfamilia Eriosomatinae en la filogenia propuesta por Heie, llevó a los autores a proponer que el ancestro común de *Buchnera* presentaba los genes de la síntesis de leucina en el cromosoma, y que la transferencia del operón a plásmidos habría ocurrido en algunas subfamilias (van Ham *et al.*, 1997). Sin embargo, con posterioridad se halló que algunas especies de la subfamilia Lachninae presentaban los genes de la síntesis de leucina localizados en un plásmido, y que la reconstrucción filogenética a partir de los mismos daba lugar a topologías con las especies de Lachninae en posición basal (van Ham *et al.*, 2000). A partir de estos descubrimientos, los autores se decantaron por la hipótesis de que la

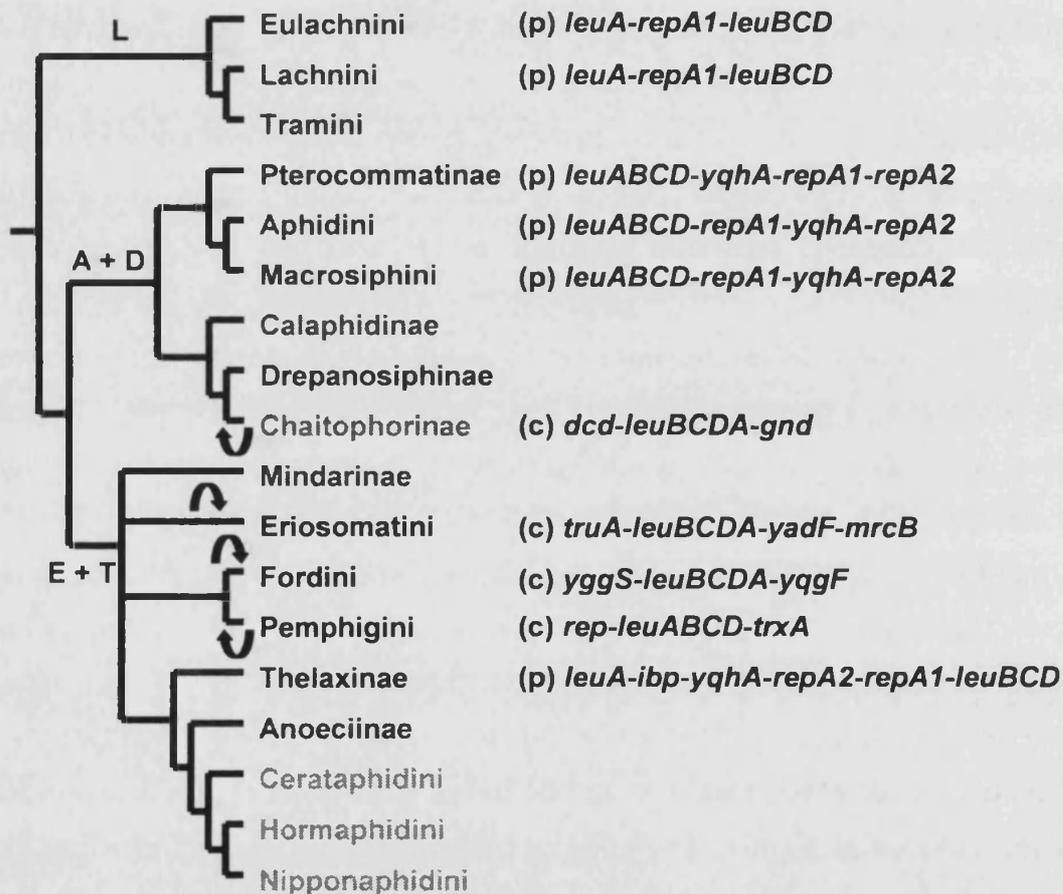


Figura 1.37. Estructura del grupo de genes de la biosíntesis de la leucina hallados en distintas cepas de *Buchnera* en especies de pulgones pertenecientes a diversas subfamilias. Se muestra la composición y el orden génico de los plásmidos (p) y el orden génico en el caso de localización cromosómica (c), junto con los genes adyacentes. Se marcan con una flecha aquellas tribus o subfamilias para las que se hipotetiza que los genes de la síntesis de la leucina habrían vuelto a una localización cromosómica. Información sobre genes de síntesis de leucina obtenida a partir de Latorre *et al.* (2005).

transferencia del operón al plásmido ocurrió en el ancestro común de *Buchnera*, y que la transferencia de vuelta al cromosoma debió de ocurrir más tarde en 4 ocasiones (1 subfamilia y 3 tribus) (Sabater-Muñoz *et al.*, 2002; Sabater-Muñoz *et al.*, 2004; Latorre *et al.*, 2005). La posición basal que las especies de la subfamilia Lachninae han ocupado en las reconstrucciones filogenéticas obtenidas en el presente estudio apoya esta última hipótesis. El ancestro común de *Buchnera* podría haber presentado ya un plásmido en el que se hallaran los genes de la síntesis de la leucina, los cuales habrían vuelto al cromosoma en los linajes de las subfamilias Chaitophorinae y Eriosomatinae (ver figura 1.37). Pese a que en las especies analizadas de las tres tribus de la subfamilia Eriosomatinae estos genes se hallan localizados en el cromosoma, esta circunstancia no puede emplearse para apoyar la monofilia de esta subfamilia. En las especies analizadas de cada una de las tres tribus, este grupo de genes se presenta en una localización distinta, flanqueados por parejas de genes diferentes: *truA* y *mrcB* en *Tetraneura caerulea* (Eriosomatini), *yggS* y *yqgF* en *Baizongia pistaciae* (Fordini) y *rep* y *trxA* en *Pemphigus spyrothecae* (Pemphigini). La localización es además distinta en la especie *Chaitophorus populeti*, perteneciente a la subfamilia Chaitophorinae. Dada la extremada conservación del orden génico en *Buchnera*, este hecho aboga por la existencia de una transferencia de vuelta al cromosoma independiente para cada tribu (Latorre *et al.*, 2005). De hecho, las únicas reorganizaciones cromosómicas halladas entre las cuatro cepas de *Buchnera* cuyo genoma se ha secuenciado conciernen a los genes de la síntesis de leucina y de triptófano (Sabater-Muñoz *et al.*, 2004; Latorre *et al.*, 2005). En las cepas secuenciadas en las que estos genes no están situados en el cromosoma las parejas de genes anteriormente mencionadas son adyacentes (Latorre *et al.*, 2005)

Las relaciones filogenéticas entre especies de pulgones halladas en este estudio inducen a plantear nuevas investigaciones acerca de la evolución de la localización y el orden génico de los genes de la síntesis de leucina. La caracterización molecular de este grupo de genes en las subfamilias Anoeciinae, Calaphidinae, Drepanosiphinae y Hormaphidinae puede ser de gran utilidad para esclarecer este asunto. El estudio sobre la evolución de estos

genes es importante para el conocimiento preciso de la implicación de *Buchnera* en la simbiosis con los pulgones. La amplificación de los genes de la síntesis de leucina y triptófano por su presencia en plásmidos se aportó como indicio de que *Buchnera* proporcionaba estos nutrientes a los áfidos (Bracho *et al.*, 1995; van Ham *et al.*, 1997; van Ham *et al.*, 1999). No obstante, el descubrimiento de que el cromosoma de esta bacteria está presente en varias copias por célula, y de que las proporciones entre número de plásmidos y número de copias cromosómicas es variable tanto dentro como entre especies, pone en duda el hecho de que la localización en plásmidos represente un modo de sobreproducir estos aminoácidos (Latorre *et al.*, 2005). Sin embargo, si se tiene en cuenta que la transferencia de estos genes a plásmidos ocurrió cuando el genoma de *Buchnera* presentaba elementos reguladores, de los que actualmente carece, esta transferencia podría haber sido un modo de escapar a la regulación genómica, permitiendo el aporte continuo de estos nutrientes al pulgón (Sabater-Muñoz *et al.*, 2004; Latorre *et al.*, 2005). Esta circunstancia pudo haber sido crucial para la exitosa adaptación del ancestro de los pulgones actuales a la dieta desequilibrada de la alimentación a partir de las plantas. Posteriormente, tras la pérdida de los elementos reguladores del genoma de *Buchnera* y la aparición de la poliploidía, en cada linaje de pulgones pudo producirse un nuevo ajuste a las necesidades de síntesis de aminoácidos, ocurriendo un retorno a la localización cromosómica en algunas de las subfamilias.

Por último, los estudios sobre la localización y el orden de los genes de la síntesis de la leucina aporta un dato más que apoya de nuevo la monofilia de la subfamilia Aphidinae y su separación de los miembros de la subfamilia Pterocommatinae. El orden genético de los plásmidos de la leucina es idéntico en las especies *Rhopalosiphum padi* y *Schizaphis graminum*, de la tribu Aphidini, y en *Acyrtosiphon pisum* y *Diuraphis noxia*, de la tribu Macrosiphini, ambas tribus componentes de la subfamilia Aphidinae. Sin embargo, este orden es diferente en *Pterocomma populeum*, miembro de la subfamilia Pterocommatinae (ver figura 1.37) (Silva *et al.*, 1998; Latorre *et al.*, 2005).

CAPÍTULO 2

Filogenia molecular y taxonomía de las especies ibéricas de pulgones de la tribu Fordini

1. Introducción

Las clasificaciones más recientes de pulgones coinciden en dividir la subfamilia Eriosomatinae en tres tribus: Eriosomatini, Pemphigini y Fordini (tabla 2.1) (Blackman y Eastop, 1994; Remaudière y Remaudière, 1997; Nieto Nafria *et al.*, 2003; Blackman y Eastop, 2006). Una de las características más llamativas de esta subfamilia es su capacidad de inducir la formación de agallas en sus hospedadores primarios, como las que inducen las especies *Pemphigus populi* (tribu Pemphigini) sobre *Populus nigra* o *Tetraneura ulmi* (tribu Eriosomatini) sobre *Ulmus minor* (figura 2.1). El ciclo típico de la subfamilia es alternante o dioico, con una fase radicícola en el hospedador secundario y con retorno al hospedador primario por medio de sexúparas, que paren en éste tanto a los machos como a las hembras sexuadas. Los individuos sexuados son enanos y ápteros, como ocurre en las subfamilias Mindarinae y Anoeciinae, pero además carecen de rostro y no llegan a alimentarse. Otras características distintivas de las especies de la subfamilia Eriosomatinae son la presencia de cera en la superficie corporal en todas las formas del ciclo, y la reducción, salvo algunas excepciones, de los ojos a sólo el triomatidio en las hembras vivíparas ápteras (Castresana, 1998; Pérez Hidalgo y Nieto Nafria, 2003).

Además de estas características comunes a los miembros de la subfamilia Eriosomatinae, las especies de la tribu Fordini presentan algunos caracteres particulares importantes. Uno de los más destacados es la ausencia de cornículos en todas las formas de sus ciclos. Por otro lado, es también característico que sus antenas presenten 5 o 6 artejos, con sensores secundarios circulares u ovalados, que la vena media de las alas anteriores normalmente no se ramifique, y que las alas posteriores muestren dos venas

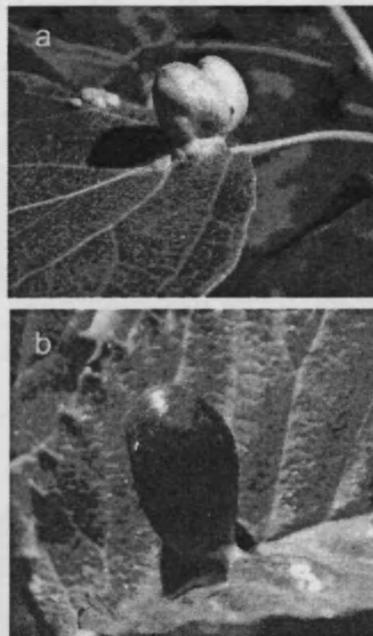


Figura 2.1. Agallas inducidas por *Pemphigus populi* sobre *Populus nigra* (a) y por *Tetraneura ulmi* sobre *Ulmus minor* (b).

oblicuas. El carácter posiblemente más llamativo es, sin embargo, su ciclo biológico: las especies alternantes de esta tribu desarrollan un ciclo que se completa en dos años, a diferencia del ciclo anual típico de la familia Aphididae (Moran, 1989; Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003; Zhang y Qiao, 2007).

Algunas clasificaciones de pulgones han subdividido la tribu Fordini en dos subtribus: Fordina y Melaphidina (Heie, 1980; Blackman y Eastop, 1994). El nivel taxonómico de estos dos grupos ha sido diferente en función del nivel



Figura 2.2. Agallas de *Smynthuroides betae* sobre *Pistacia atlantica* (a), *Aploneura lentisci* sobre *Pistacia lentiscus* (b), y de *Geoica utricularia* (c,1) y *Baizongia pistaciae* (c,2) sobre *Pistacia terebinthus*.

taxonómico asignado a la tribu Fordini en cada una de estas clasificaciones, denominándose por ejemplo Fordini y Melaphidini en la clasificación utilizada por Heie (1980), en la que se agrupaban en la subfamilia Fordinae. Recientemente, se han aportado datos moleculares que apoyan esta subdivisión del grupo. Las especies analizadas de estas subtribus se agruparon en dos clados independientes en las reconstrucciones filogenéticas moleculares obtenidas a partir de secuencias correspondientes al gen nuclear del factor de elongación 1 α y el gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo oxidasa (Zhang y Qiao, 2007). La subtribu Melaphidina engloba especies de pulgones que se distribuyen fundamentalmente en Asia, con un género presente en Norteamérica. Las especies de este grupo utilizan como hospedador primario especies del género *Rhus* (Anacardiaceae), sobre las que inducen agallas características, y como hospedadores secundarios especies de musgos (Moran, 1989; Blackman y Eastop, 1994; Zhang y Qiao, 2007). Por su parte, la subtribu Fordina presenta una distribución holártica

y sobre todo mediterránea, y es la única de las dos subtribus de Fordini que se presenta en la Península Ibérica y las Islas Canarias. Las especies de esta subtribu utilizan como hospedadores primarios especies del género *Pistacia*,

también perteneciente a la familia de las anacardiáceas. Sobre éstas, los pulgones de la subtribu Fordina inducen la formación de vistosas agallas (figura 2.2), que afectan a parte o a toda la hoja. Los hospedadores secundarios de estas especies son en la mayor parte de los casos gramíneas (familia Gramineae), aunque existen excepciones como la de *Smynthurodes betae*, que usa especies vegetales pertenecientes a varias familias. En los hospedadores secundarios, las formas correspondientes del ciclo habitan en las raíces (Blackman y Eastop, 1994; Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003).

Los géneros *Forda* y *Paracletus* pertenecen a la subtribu Fordina, y algunas de sus especies se hallan en la Península Ibérica. Las especies de estos dos géneros pueden distinguirse por el número de setas que presentan en el primer artejo de los tarsos de las virginógenas aladas y las sexúparas, así como por la morfología de las coxas del tercer par de patas. En las especies del género *Paracletus*, estas coxas son más alargadas, subcilíndricas y con el margen externo más desarrollado que en *Forda* (figura 2.3) (Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003). Las especies de estos dos géneros suelen distinguirse fácilmente también por la morfología de las agallas que inducen en las especies del género *Pistacia* que utilizan como hospedador primario.

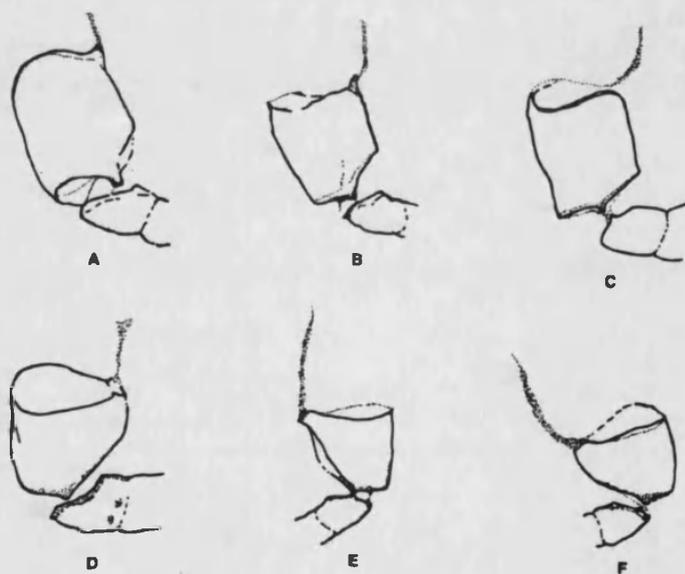


Figura 2.3. Coxas del tercer par de patas de: fundatrígenas aladas de *P. cimiciformis* (A) y *F. formicaria* (D), sexúparas de *P. donisthorpei* (B) y *F. formicaria* (E) y virginógenas ápteras de *P. cimiciformis* (C) y *F. formicaria* (F). Dibujo original: Nicolás Pérez Hidalgo (Vol. 19 Serie Fauna Ibérica, MNCN, CSIC; Pérez Hidalgo *et al.*, 2003).

Tabla 2.1. Distintas clasificaciones de la subfamilia Eriosomatinae.

Autor y fecha	Taxón equivalente ^{a)}	Clasificación interna ^{b)}	
Baker (1920)	Subfamilia Eriosomatinae	Tribu Eriosomatini Tribu Fordini Tribu Melaphidini Tribu Pemphigini Tribu Prociphilini	
Börner y Heinze (1957)	Familia Pemphigidae	Subfamilia Schizoneurinae Subfamilia Pemphiginae Subfamilia Fordinae	Tribu Schizoneurini Tribu Byrsocryptini Tribu Pachypappini Tribu Pemphigini Tribu Fordini Tribu Baizongiini
Heie (1980)	Familia Pemphigidae	Subfamilia Eriosomatinae Subfamilia Fordinae Subfamilia Pemphiginae	Tribu Eriosomatini Tribu Tetraneurini Tribu Fordini Tribu Melaphidini Tribu Prociphilini Tribu Pemphigini Subtribu Baizongiina Subtribu Geocina Subtribu Fordina
Blackman y Eastop (1994)	Subfamilia Pemphiginae	Tribu Eriosomatini Tribu Fordini Tribu Pemphigini	Subtribu Fordina Subtribu Melaphidina Subtribu Pemphigina Subtribu Prociphilina
Remaudière, Stroyan y Quednau (1984, 1988, 1994)	Subfamilia Pemphiginae	Tribu Eriosomatini Tribu Fordini Tribu Pemphigini	

a) Para cada clasificación se muestra el taxón equivalente a la subfamilia Pemphiginae de la clasificación de Remaudière, Stroyan y Quednau (1984, 1988, 1994) (mostrada en la fila inferior), denominada en este estudio subfamilia Eriosomatinae siguiendo las modificaciones realizadas por Nieto Nafria *et al.* (1997). b) Se muestra resaltado en negrita, para cada clasificación, el taxón equivalente a la tribu Fordini de la clasificación de Remaudière, Stroyan y Quednau (1984, 1988, 1994).

La figura 2.4 muestra un esquema del ciclo biológico que desarrollan las especies ibéricas de la tribu Fordini, todas ellas pertenecientes a la subtribu Fordina. El huevo eclosiona en primavera dando lugar a una hembra partenogenética vivípara denominada fundadora. Esta hembra induce la formación de una agalla en el hospedador primario. En la Península Ibérica y las Islas Canarias la mayoría de las especies de la tribu Fordini utiliza como

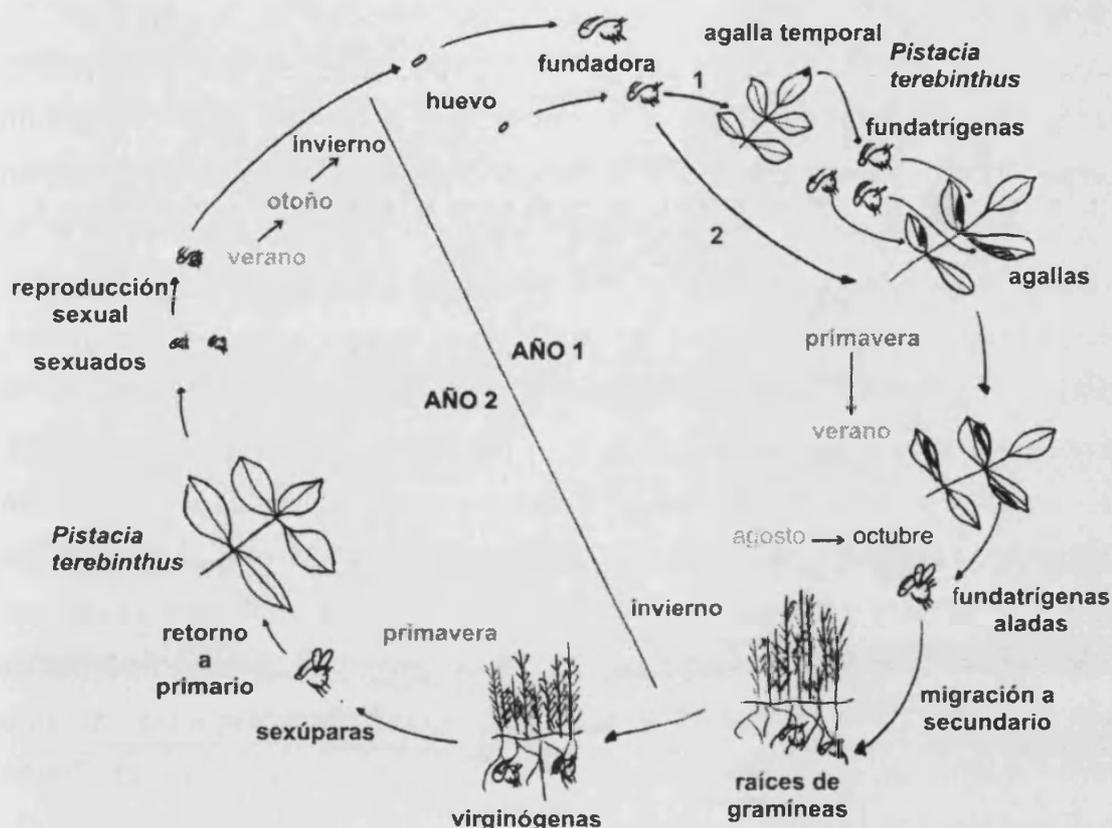


Figura 2.4. Ciclo biológico general de las especies ibéricas de la tribu Fordini. Tras la eclosión del huevo, la fundadora de las especies del género *Forda* y de *Smynthurodes betae* induce la formación de una agalla temporal, previa a las agallas definitivas de las fundatrigenas (1). En el resto de especies de la tribu, la fundadora induce directamente la formación de la agalla definitiva (2). Ver texto para más detalles.

hospedador primario *Pistacia terebinthus*, a excepción de *Aploneura lentisci*, que se desarrolla sobre *P. lentiscus*, y de *F. riccobonii* y *Smynthurodes betae*, que viven sobre *P. atlantica*. Esta última especie vegetal se presenta de forma natural en las Islas Canarias, pero no en la Península. Dentro de la agalla, se suceden a partir de la fundadora varias generaciones de hembras partenogenéticas denominadas fundatrigenas, al tiempo que la agalla madura, hasta finales del verano o principios del otoño. En las especies del género

Forda y la especie *Smynthuroides betae* la fundadora induce primero la formación de una agalla pequeña, no completamente cerrada, generalmente en el ápice del foliolo impar de la hoja en crecimiento, denominada agalla temporal. Allí da lugar a su descendencia, las fundatrígenas, que se mueven posteriormente hacia el resto de foliolos en los que inducen la formación de las agallas definitivas. En el resto de especies de la subtribu Fordina, la fundadora induce directamente la aparición de la agalla definitiva (ver figura 2.4).

La última generación de fundatrígenas, a diferencia de las predecesoras, es alada, y entre el final del verano y el principio del otoño sale de las agallas en busca de los hospedadores secundarios, generalmente plantas gramíneas. En éstas, las fundatrígenas migrantes dan lugar a la primera de una serie de generaciones partenogenéticas ápteras, denominadas virginógenas o exiliadas. Esta forma supera el invierno en las raíces del hospedador secundario, apareciendo ocasionalmente formas virginógenas aladas encargadas de la dispersión. En la primavera siguiente aparece la forma denominada sexúpara, encargada del vuelo de retorno al hospedador primario y que lleva en su interior los individuos sexuados. En este hospedador la sexúpara pare los machos y las hembras sexuadas, única generación de reproducción sexual del ciclo. Las hembras sexuales producen un único huevo, que queda en su interior tras su muerte. El huevo permanece en estado de diapausa durante prácticamente un año, hasta su eclosión en la primavera siguiente (Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003; Inbar *et al.*, 2004; Zhang y Qiao, 2007).

El ciclo biológico general que presentan las especies de la subtribu Fordina representa una interesante variación del ciclo típico de la familia Aphididae. La bianualidad del ciclo conlleva importantes diferencias respecto al de las especies de otros grupos. Mientras que en el ciclo típico de la familia Aphididae el invierno es siempre superado en la fase del huevo sexual de resistencia, en el ciclo de los Fordina un invierno es superado en fase de huevo sobre el hospedador primario y el siguiente transcurre en la fase de virginógenas en las raíces del secundario. Por otro lado, la mayoría de formas se encuentra lógicamente desplazada en el tiempo respecto a las formas homólogas del ciclo típico, y la respuesta a las señales ambientales que desembocan en la aparición de determinadas fases debe de hallarse asimismo alterada. En

particular, en el ciclo típico de la familia Aphididae, el acortamiento de los días y la bajada de temperaturas comunes al final del verano induce en los pulgones la aparición de la fase sexual y el retorno al hospedador primario. En el ciclo típico de los Fordina, en esta época las fundatrígenas aladas salen de las agallas y migran al hospedador secundario en uno de los años, o el huevo permanece en diapausa en el otro. En el ciclo típico de la familia Aphididae, la eclosión de los huevos ocurre durante la primavera. En el ciclo de los Fordina, esto también ocurre en uno de los años, pero en la primavera del siguiente se induce la aparición de la fase sexual y el retorno al hospedador primario, aunque las señales ambientales concretas que inducen este fenómeno no se conocen. Sin duda el mecanismo de recepción de la señal luminosa debe de hallarse notablemente alterado en estas especies ya que, además de lo recientemente mencionado, la mayor parte de la fase del ciclo acontece en entornos donde la intensidad lumínica se halla sensiblemente reducida: las agallas y las raíces. Por otro lado, las hembras vivíparas ápteras que viven en estos ambientes tienen los ojos reducidos a sólo el triomatidio, característica común a casi todas las especies de la subfamilia Eriosomatinae.

La mayoría de especies de la subtribu Fordina desarrolla el ciclo bianual presentado. Sin embargo, existen algunas especies de las que se sabe o se sospecha que desarrollan un ciclo anholocíclico sobre hospedadores secundarios, en el que no se producen las formas sexuales. Por ejemplo, hasta la fecha, *F. rotunda* es considerada una especie anholocíclica, ya que sólo se conocen descripciones de sus formas virginógenas. Por otro lado, se conocen paraciclos anholocíclicos en otras especies como *F. riccobonii* y *P. cimiciformis* (Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003), y es posible que la existencia de este tipo de ciclos ocurra de forma general en las especies de Fordina allí donde las condiciones lo permitan.

La taxonomía del género *Forda* es compleja y presenta aún muchos problemas. La dificultad de su taxonomía es resultado, en gran parte, de la complejidad de los ciclos biológicos de sus especies. Las distintas formas presentes en los ciclos de las especies tanto del género *Forda* como del género *Paracletus* muestran una elevada variabilidad morfológica, lo cual hace muy difícil asociar las distintas formas a una misma especie. Además, en muchas

ocasiones no se conocen todas las formas y algunas especies se han descrito a partir de sólo una de ellas. Se suele utilizar la expresión “el ciclo de la especie no está cerrado” para hacer referencia a la falta de conocimiento de una o más formas de una especie, hecho frecuente en las especies de estos géneros. Lógicamente, esta dificultad ha provocado la aparición en este grupo de un elevado número de sinonimias debidas a la descripción como especies diferentes de lo que en realidad son formas distintas del ciclo de una misma especie. La elevada diferenciación morfológica de las distintas formas del ciclo es una característica general de los pulgones, por lo que este tipo de dificultades taxonómicas pueden considerarse una generalidad en toda la familia Aphididae. La obtención de datos moleculares y su análisis filogenético constituyen herramientas de gran ayuda para la resolución de problemas taxonómicos de esta clase. La sospecha de que dos especies descritas a partir de formas distintas son sinónimas puede comprobarse con facilidad mediante el análisis de secuencias de DNA. Por ejemplo, el uso de dos secuencias mitocondriales, correspondientes a los genes de las subunidades I y II de la citocromo oxidasa, permitió el establecimiento de varias sinonimias y el cierre de los ciclos de varias especies de la tribu Cerataphidini (subfamilia Hormaphidinae), en la que las formas de hospedador secundario muestran una morfología muy variada (Stern *et al.*, 1997).

Este tipo de dificultades taxonómicas condujeron a Remaudière (1999), por ejemplo, a formar el grupo de especies “marginata”, en el que incluyó 4 especies, que podrían llegar a ser 6 en función de la validez de algunas sinonimias: *F. marginata*, *F. riccobonii*, *F. pawlowae* (?=*hirsuta*) y *F. orientalis* (?=*kaussari*). En la Península Ibérica y las Islas Canarias sólo existen dos de estas especies: *F. marginata* y *F. riccobonii*. La primera de ellas utiliza, en esta zona geográfica, *P. terebinthus* como hospedador primario, en el que induce la formación de una agalla pequeña en el margen de los foliolos, de sección más o menos circular y un color rojo fuerte en su madurez (figura 2.5). Históricamente se ha asumido que la forma fundadora de esta especie induce además la formación de una agalla temporal previa a las agallas definitivas de su descendencia (Inbar *et al.*, 2004). Sin embargo, esta asunción parece haberse realizado por comparación de algunos aspectos de la biología de esta

especie con la de otras en la que existe agalla temporal, no por observación real de la propia agalla, y pueden plantearse dudas razonables sobre su existencia (N. Pérez Hidalgo, comunicación personal). A principios del otoño, *F. marginata* migra desde las agallas a las raíces de algunas especies de gramíneas, como es común en la subtribu Fordina. Por su parte, *F. riccobonii* tiene como hospedador primario a *P. atlantica*, especie que se encuentra de forma natural en las Islas Canarias y que se cultiva como ornamental en algunos lugares de la Península Ibérica. Las fundadoras de *F. riccobonii* inducen la formación de una agalla temporal en el foliolo apical de las hojas, donde se reproducen. Su descendencia, las fundatrígenas, se mueve hacia otros foliolos en los que producen una agalla mayor que la de *F. marginata* y además fuertemente lobulada (ver la figura 2.5). Las formas de hospedador secundario de esta especie son muy poco conocidas (Pérez Hidalgo y Nieto Nafria, 2003).

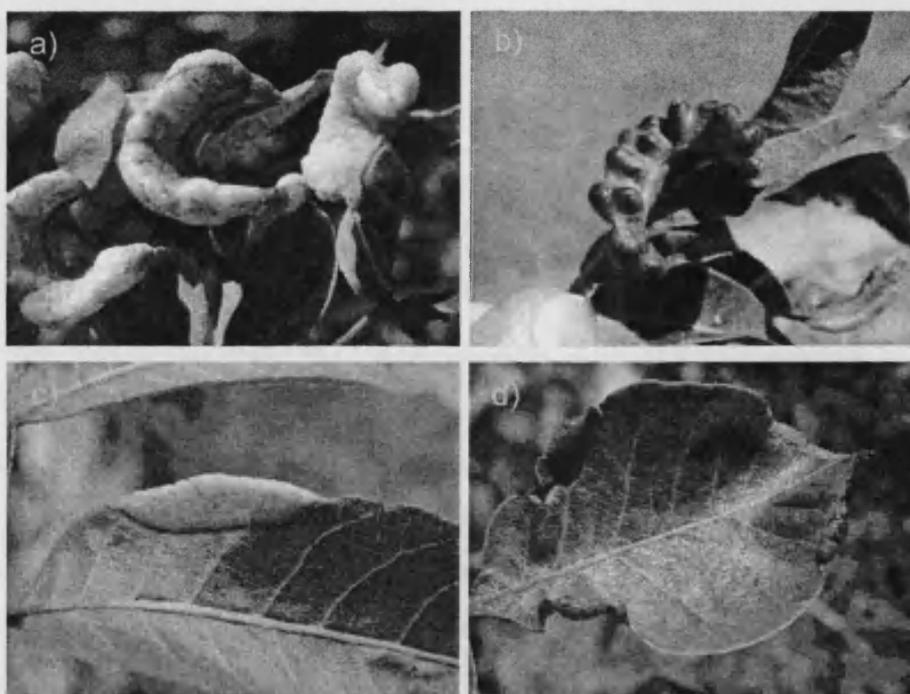


Figura 2.5. Agallas inducidas por especies de los géneros *Forda* y *Paracletus* sobre especies del género *Pistacia* en la Península Ibérica y las Islas Canarias. a) *F. formicaria*; b) *F. riccobonii*; c) *P. cimiciformis* y d) *F. marginata*. Fotografías: Nicolás Pérez Hidalgo (Vol. 19, Serie Fauna Ibérica, MNCN, CSIC; Pérez Hidalgo *et al.*, 2003).

Las formas de hospedador primario (fundadora y fundatrigenas ápteras y aladas) de *F. marginata* y *F. riccobonii* son morfológicamente muy similares. Las formas virginógenas de estas especies pueden obtenerse y analizarse mediante los denominados experimentos de transferencia, en los que hembras fundatrigenas aladas obtenidas a partir de agallas se depositan en el laboratorio sobre su hospedador secundario, permitiendo su reproducción. El análisis de las formas virginógenas ápteras de *F. marginata* y *F. riccobonii* obtenidas mediante estos experimentos revela que son morfológicamente indistinguibles. Asimismo, existe una elevada similitud entre las formas virginógenas aladas y las sexúparas de ambas especies (Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003). Esta semejanza entre las diversas formas de los ciclos biológicos de estas dos especies justifica su agrupación en el grupo de especies "marginata" y abre la puerta a la posibilidad de la existencia de una sinonimia entre ambas. El principal carácter discriminatorio entre estos dos taxones es la formación de agallas morfológicamente diferentes en dos especies distintas del género *Pistacia*. Sin embargo, cabría la posibilidad de que una misma especie provocase la inducción de dos agallas distintas en función de la planta sobre la que se desarrolle.

Según Remaudière (1999) existen entre 9 y 11 especies incluidas en el género *Forda*. Las especies más abundantes en la Península Ibérica son la mencionada *F. marginata* y *F. formicaria*. Ésta última vive también sobre *P. terebinthus*, planta en la que induce la formación de una agalla lobulada y mayor que la de *F. marginata* (ver figura 2.5). Como ya se ha mencionado, *F. riccobonii* aparece en las Islas Canarias, donde se encuentra de forma natural su hospedador primario, pero se ha recolectado también sobre *P. atlantica* en Alicante y Murcia. Existen también citas de la existencia de *F. rotunda* en varias provincias españolas, una especie considerada como anholocíclica. Además de estas especies, se han citado también las especies *F. longicornis* y *F. hirsuta*, pero sus citas son muy escasas y/o dudosas en su identificación (Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003).

La taxonomía del género *Paracletus* ha sido mucho menos cuestionada que la del género *Forda*. En la Península Ibérica aparecen dos de las cuatro especies de este género: *P. cimiciformis* y *P. donisthorpei* (Remaudière y

Remaudière, 1997; Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003). *P. cimiciformis* induce la formación de una agalla verde y aplanada en el margen de un foliolo de *P. terebinthus* (ver figura 2.5). Como la mayoría de especies de la subtribu Fordina, su hospedador secundario lo forman especies de gramíneas. Las descripciones de la especie *P. donisthorpei* corresponden a virginógenas ápteras y sexúparas, y no se conocen las formas ni las agallas del hospedador primario. Por este motivo, pese a que sus formas sexúparas están bien descritas, el ciclo de esta especie no está cerrado. Ambas especies se han distinguido tradicionalmente mediante los siguientes caracteres. Las virginógenas ápteras de *P. cimiciformis* presentan antenas de 6 artejos, por los 5 presentes en las antenas de la misma forma en *P. donisthorpei*. Por otro lado, las sexúparas de *P. cimiciformis* muestran una cutícula dorsal reticulada y su antenómero IV es más corto que el III, mientras que en las sexúparas de *P. donisthorpei* la cutícula dorsal es estriada y el antenómero IV es más largo que el III (figura 2.6) (Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003).

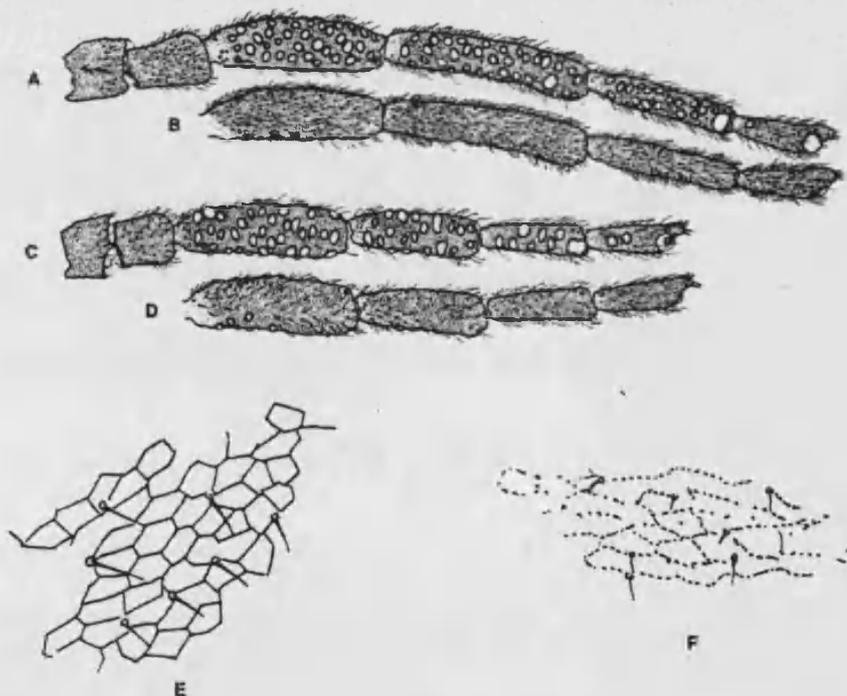


Figura 2.6. Morfología distintiva de las sexúparas de las especies ibéricas del género *Paracletus*. Antenas de *P. donisthorpei* (A y B) y *P. cimiciformis* (C y D) en vistas ventral (A y C) y dorsal (B y D). Cutícula dorsoabdominal de *P. cimiciformis* (E) y *P. donisthorpei* (F). Dibujo original: Nicolás Pérez Hidalgo (Vol. 19, Serie Fauna Ibérica, MNCN, CSIC; Pérez Hidalgo *et al.*, 2003).

Roberti (1983; 1993) cuestionó, no obstante, algunos aspectos de la taxonomía de este género. Estudiando las formas de hospedador secundario de la especie *P. cimiciformis*, observó la existencia de dos formas de virginógenas ápteras, que denominó A y B. La forma A presentaría un cuerpo redondeado, 5 artejos antenales, tibia posterior recta y ojos formados únicamente por el triomatidio. La forma B tendría el cuerpo aplanado, 6 artejos antenales, tibia posterior curvada y ojos formados por el triomatidio y varios ocelos. Esta forma B se correspondería con lo que clásicamente se ha aceptado como forma virginógena áptera de *P. cimiciformis*, aunque Roberti la calificó como una forma intermedia entre lo que consideró la verdadera áptera (su forma A) y la alada, una forma pseudoáptera que además parecía tener una relación más directa con las hormigas. Por otro lado, para Roberti, la forma A presentaba unas características que se correspondían con las descritas para la especie *F. rotunda*, lo que le llevó a proponer la sinonimia entre ambas. Sin embargo, sus propuestas no llegaron a ser atendidas y hoy en día se sigue aceptando la validez de *F. rotunda*. (Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003).

2. Objetivos

En este capítulo se pretende aportar datos moleculares útiles para afrontar los siguientes objetivos:

1. Determinar las relaciones filogenéticas globales entre la mayoría de especies de la tribu Fordini presentes en la Península Ibérica y las Islas Canarias.
2. Comprobar si *F. marginata* y *F. riccobonii* son realmente dos especies distintas, con una elevada similitud entre sus formas homólogas, o una misma especie capaz de inducir la formación de agallas morfológicamente distintas según la especie vegetal que utilice como hospedador primario.
3. Determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de los géneros *Forda* y *Paracletus* presentes en la Península Ibérica y las Islas Canarias con especial atención a la estructura interna del género *Paracletus* y sus especies *P. cimiciformis* y *P. donisthorpei*.

3. Material y métodos

3.1. Muestras y especies analizadas

En la tabla 2.2 se recogen los listados de las especies y las muestras que se analizaron en este trabajo. Para desarrollar el objetivo de la determinación de las relaciones filogenéticas entre las especies de la tribu Fordini, se obtuvieron muestras de casi todas las especies de este grupo presentes en la Península Ibérica (todas ellas pertenecientes a la subtribu Fordina). No fue posible obtener muestras de algunas especies del género *Forda* con citas muy escasas o descritas en citas dudosas (ver Introducción) ni de la especie *Rectinasus buxtoni*, también muy escasa en esta zona geográfica (Pérez Hidalgo y Nieto Nafra, 2003). Para el análisis filogenético de la tribu Fordini se emplearon las especies *Pemphigus populi* y *Thecabius sp.*, pertenecientes a la tribu hermana Pemphigini, como especies externas o "outgroups". Para los objetivos relacionados con el análisis filogenético y taxonómico de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paraclletus* se analizó un total de 64 muestras de las especies *F. riccobonii*, *F. marginata*, *F. formicaria*, *P. camiciformis* y *P. donisthorpei*. Para algunas de las reconstrucciones relacionadas con este objetivo se emplearon como especies externas las especies *Baizongia pistaciae* y *Geoica utricularia*, ambas pertenecientes también a la subtribu Fordina.

La mayoría de las muestras de este estudio fueron identificadas y proporcionadas por D. Nicolás Pérez Hidalgo, investigador del Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental de la Universidad de León. El muestreo se realizó en diversas regiones de la geografía de la Península Ibérica entre 1999 y 2007. Se incluyeron dos muestras de la especie *F. riccobonii* provenientes de las Islas Canarias y Malta. Los individuos analizados correspondieron a diversas fases de los ciclos biológicos de las especies (ver tabla 2.2). Las fundatrigenas analizadas provinieron en todos los casos del interior de las agallas recogidas en el campo. Las virginógenas analizadas provinieron de recolecciones en el campo o de experimentos de transferencia realizados por Nicolás Pérez Hidalgo. Como ya se ha mencionado, los experimentos de transferencia consistían en la colocación de las fundatrigenas

aladas en brotes de gramíneas (mayoritariamente trigo), sobre los cuales estas hembras daban lugar a las virginógenas ápteras, las cuales se analizaban posteriormente desde el punto de vista morfológico así como molecular. Todas las sexúparas fueron recogidas en trampas. La obtención de las secuencias de los tres genes utilizados en el análisis molecular no fue posible para todas las muestras debido probablemente a problemas en la conservación de las mismas.

3.2. Secuencias utilizadas

Los datos moleculares empleados correspondieron a dos genes nucleares y un fragmento del DNA mitocondrial. Por un lado, se obtuvieron secuencias de los genes nucleares de la opsina de longitud de onda larga (*lwrh*) y el factor de elongación de la traducción 1 α (*ef1 α*). Por otro, se llevó a cabo la secuenciación de un fragmento mitocondrial que contiene los genes de las subunidades 6 y 8 de la ATPasa-F (*atp6* y *atp8*). Las tres secuencias se emplearon para el análisis de las relaciones filogenéticas entre las especies ibéricas de la tribu Fordini. La secuencia del gen *ef1 α* sólo se obtuvo para la especie *F. marginata* entre las especies de este género. El análisis filogenético y taxonómico de las muestras de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus* se llevó a cabo mediante la secuenciación del gen *lwrh* y el fragmento mitocondrial. Los niveles de variabilidad previamente estimados para la secuencia del gen *atp6* y para los intrones y las terceras posiciones de codón del gen *lwrh* (ver capítulo 1, tabla 1.3) eran adecuados para el abordaje de los objetivos planteados para este grupo de muestras, pertenecientes a los niveles intraespecífico e intragenérico. Por otro lado, la utilización de una secuencia nuclear y otra mitocondrial es especialmente útil en este tipo de estudios, con una parte poblacional o intraespecífica. La utilización simultánea de marcadores nucleares y mitocondriales permite la detección de sucesos de hibridación o introgresión. Este tipo de sucesos no es descartable dada la proximidad, *a priori*, de algunos de los taxones analizados.

Tabla 2.2. Datos relativos a las muestras analizadas en este estudio y secuencias obtenidas con sus respectivos códigos de acceso en la base de datos del EMBL.

Especie ^{a)}	Código ^{b)}	Fuente ^{c)}	Lugar de recolección original ^{d)}	Fecha	Forma ^{e)}	Secuencias obtenidas ^{f)}		
						<i>lwrh</i>	mtDNA	<i>ef1a</i>
<i>Forda formicaria</i>	O5555	Pt	Desfiladero Beyos, Asturias, Esp	11/9/05	fg+vg*	AM996865	AM996890	
	Le6667	Pt	Villavieja, León, Esp	28/9/01	vg*	AM996864		
	Por6666	Pt	Miranda do Douro, Bragança, Por	13/9/01	fg	AM996864	AM996887	
	O5543	Pt	Desfiladero Beyos, Asturias, Esp	10/9/04	vg*	AM996864	AM996890	
	Sg5542	Pt	Hoces del Duratón, Segovia, Esp	25/9/05	vg*	AM996864	AM996887	
	Le5548	H	Correcillas, León, Esp	14/6/05	vg	AM996865	AM996887	
	Val1001	Pt	Bugarra, Valencia, Esp	18/7/95	fg	AM996863	AM996888	
	Val1002	Pt	Chulilla, Valencia, Esp	13/7/03	fg	AM996863	AM996889	
	<i>Forda marginata</i>	Le5541	Pt	Villavieja, León, Esp	15/9/05	vg*	AM996869	AM996893
Le6668		Pt	Villavieja, León, Esp	28/9/01	fg	AM996867/70	AM996893	
Le6672		Pt	Villavieja, León, Esp	17/9/99	vg*	AM996866		
Le9996		Pt	Villavieja, León, Esp	4/8/04	fg	AM996866/72	AM996893	
O5540		Pt	Desfiladero Beyos, Asturias, Esp	11/9/05	fg+vg*	AM996871	AM996894	
Val1003		Pt	Chulilla, Valencia, Esp	8/8/04	fg	AM996868/69	AM996895	
<i>Forda riccobonii</i>		A5549	Pa	St. Vicent Raspeig, Alicante, Esp	15/10/05	vg*	AM996874	AM996891
	A6669	Pa	St. Vicent Raspeig, Alicante, Esp	18/10/00	fg	AM996874	AM996892	
	A75	Pa	St. Vicent Raspeig, Alicante, Esp	8/10/99	fg		AM996891	
	A5550	Pa	St. Vicent Raspeig, Alicante, Esp	15/10/05	fg		AM996891	
	Mt2	Pa	Valetta, Malta, Malta	4/9/05	fg	AM996874	AM996891	
	Ic9999	Pa	Tenerife, Islas Canarias, Esp	2/2/00	vg*	AM996873	AM996891	
<i>Paractetus cimiciformis</i>	Le9960	H	Villavieja, León, Esp	17/4/05	vg	AM996857	AM996884	FM163597
	Le6670	Pt	Villavieja, León, Esp	10/9/01	fg	AM996857	AM996883	
	Por9997	Pt	Miranda do Douro, Bragança, Por	16/9/02	vg*	AM996856/57	AM996883	

<i>Paracletus cimiciformis</i>	Por9998	Pt	Miranda do Douro, Bragança, Por	12/9/04	vg*	AM996856	AM996880	
	Le9999	Pt	Villavieja, León, Esp	4/8/04	fg	AM996858/62	AM996885	
	Bu9948	T	Abajas, Burgos, Esp	12/6/01	sx	AM996859/60		
	Bu5041	T	Talamillo, Burgos, Esp	15/7/05	sx		AM996886	
	Bu5042	T	Talamillo, Burgos, Esp	15/7/05	sx	AM996859	AM996886	
	Bu5048	T	Pesadas, Burgos, Esp	8/7/05	sx	AM996859	AM996886	
	Co9947	H	Fuencaliente, Córdoba, Esp	23/5/04	vg	AM996862	AM996883	
	Le6671	Pt	Villavieja, León, Esp	10/9/01	vg*	AM996862		
	J292	H	Valdepeñas, Jaén, Esp	6/4/03	vg		AM996883	
	Por5001	Pt	Miranda do Douro, Bragança, Por	23/8/05	fg	AM996857		
	Por5002	Pt	Miranda do Douro, Bragança, Por	23/8/05	fg	AM996857		
	Por5003	Pt	Miranda do Douro, Bragança, Por	23/8/05	fg	AM996857		
	Por5004	Pt	Miranda do Douro, Bragança, Por	23/8/05	fg	AM996858/62		
	Por5005	Pt	Miranda do Douro, Bragança, Por	23/8/05	fg	AM996857	AM996883	
	Por5006	Pt	Miranda do Douro, Bragança, Por	23/8/05	fg	AM996857/ 61		
	Por5008	Pt	Miranda do Douro, Bragança, Por	23/8/05	fg	AM996857 62		
	Por5009	Pt	Miranda do Douro, Bragança, Por	23/8/05	fg	AM996857	AM996883	
	Le6017	G	S. Martín del Agostedo, León, Esp	25/3/07	vg	AM996857	AM996885	
	Le6019	G	S. Martín del Agostedo, León, Esp	25/3/07	vg	AM996857	AM996885	
	Le5010	Pt	Borrenes, León, Esp	1/9/05	fg	AM996862		
	Le5011	Pt	Borrenes, León, Esp	1/9/05	fg	AM996856		
	Le5014	Pt	Borrenes, León, Esp	1/9/05	fg	AM996857/61		
	Le5016	Pt	Borrenes, León, Esp	1/9/05	fg	AM996856	AM996881	
	Le5018	Pt	Borrenes, León, Esp	1/9/05	fg	AM996857		
	Le5019	Pt	Borrenes, León, Esp	1/9/05	fg	AM996857	AM996883	
	Le5020	Pt	Borrenes, León, Esp	1/9/05	fg	AM996857		
	Le5552	Pt	Villavieja, León, Esp	15/9/05	fg+vg*	AM996857	AM996883	
	Le5554	Pt	Villavieja, León, Esp	15/9/05	fg+vg*	AM996857	AM996883	
	Le5062	Pt	Villavieja, León, Esp	12/4/06	vg	AM996857	AM996883	

Filogenia y taxonomía de la tribu Fordini

	Sg5022	Pt	Hoces del Duratón, Segovia, Esp	25/9/05	fg	AM996862	AM996883	
	Sg5025	Pt	Hoces del Duratón, Segovia, Esp	25/9/05	fg	AM996856	AM996882	
	Sg5026	Pt	Hoces del Duratón, Segovia, Esp	25/9/05	fg	AM996856		
	Sg5027	Pt	Hoces del Duratón, Segovia, Esp	25/9/05	fg	AM996858/62		
	Sg5028	Pt	Hoces del Duratón, Segovia, Esp	25/9/05	fg	AM996856		
	Sg5030	Pt	Hoces del Duratón, Segovia, Esp	25/9/05	fg	AM996856		
	Sg5547	Pt	Hoces del Duratón, Segovia, Esp	25/9/05	fg	AM996856	AM996881	
	Val1004	Pt	Chulilla, Valencia, Esp	12/8/07	fg	AM996856/57	AM996882	
<i>Paracletus donisthorpei</i>	Bu5032	T	Llanillo, Burgos, Esp	27/5/03	sx	AM996856	AM996879	
	Bu99	T	Prádanos, Burgos, Esp	23/6/04	sx	AM996856	AM996879	
	Bu101	T	La Riba, Burgos, Esp	15/7/04	sx	AM996856	AM996881	
	Le7001	T	Valle de las Casas, León, Esp	4/6/07	sx	AM996856	AM996882	
<i>Aploneura lentisci</i>	-	Pl	Potries, Valencia, Esp	9/10/00	fg	AJ489289	AJ298663	FM163601
<i>Baizongia pistaciae</i>	-	Pt	Hoces del Duratón, Esp	25/9/05	fg	AM996875	AM996896	FM163599
<i>Geoica utricularia</i>	-	G	Borrenes, León, Esp	12/9/05	vg	AM996876	AM996897	FM163600
<i>Geoica setulosa</i>	-	G	Villavieja, León, Esp	2/4/06	vg		AM996900	
<i>Smynthuroides betae</i>	-	H	Villaobispo, León, Esp	12/3/06	vg	AM996877	AM996898	FM163598
<i>Pemphigus populi</i>	-	Pn	Chulilla, Valencia, Esp	21/6/04	fg	AJ489288	AJ547793	FM163603
<i>Thecabius sp.</i>	-	Pn	Chulilla, Valencia, Esp	13/7/03	fg	AM996878	AM996899	FM163602

a) Nomenclatura de las especies según Remaudière y Remaudière (1997) y Pérez Hidalgo y Nieto Nafría (2003). b) Código empleado para las distintas muestras analizadas pertenecientes a los géneros *Forda* y *Paracletus*. Las muestras y especies utilizadas para el análisis filogenético global de la tribu Fordini aparecen sombreadas. c) Indica la fuente original de la recolección para la muestra correspondiente: Pt, *Pistacia terebinthus*; Pa, *Pistacia atlantica*; Pl, *Pistacia lentiscus*; Pn, *Populus nigra*; H, hormiguero; T, trampa amarilla; G, gramínea (no identificada). d) Esp: España; Por: Portugal. e) fg: fundatrigena; vg: virginógena proveniente de experimentos de transferencia (*) o recogida directamente en el campo. f) Para algunas muestras se indican dos códigos de acceso para el gen *lwrh*, correspondientes a dos alelos obtenidos.

3.3. Obtención de las secuencias

a) Extracción de DNA

Todas las extracciones de DNA se realizaron a partir de un único individuo, siguiendo el mismo protocolo descrito en el capítulo 1, apartado 3.3.a (Martínez *et al.*, 1992). Las muestras utilizadas provenían, en su mayoría, de material almacenado en etanol absoluto (en algunas ocasiones, en etanol al 70%). El DNA se resuspendió en 50 µl de tampón LTE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0'1 mM, pH 8).

b) Amplificación de los fragmentos génicos

Las secuencias de los genes nucleares *lwrh* y *ef1α* analizadas para la inferencia de las relaciones filogenéticas entre las especies ibéricas de la tribu Fordini se obtuvieron con los mismos cebadores y condiciones especificados en el capítulo 1, apartado 3.3.b. La secuencia del gen *lwrh* se obtuvo, en concreto, con el conjunto de cebadores OPSET (ver tabla 1.2).

Para la obtención de la secuencia del gen *lwrh* en las muestras de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus* se siguió la siguiente estrategia. El uso de los cebadores OPSAFF1, OPSAFF2 y OPSR4 (ver tabla 1.2) permitió la amplificación y secuenciación de este gen en las siguientes muestras: *F. marginata* Val1003, *F. riccobonii* A6669, *F. formicaria* Le6667 y *P. cimiciformis* Le6671 (ver tabla 2.2). El alineamiento de estas secuencias permitió el diseño de un conjunto de cebadores específicos para la amplificación de la secuencia en las especies de estos géneros (tabla 2.3). Una única reacción de PCR fue suficiente para amplificar el fragmento de aproximadamente 1050 pb en un gran número de muestras. Las reacciones se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). En un volumen total de 50 µl, las reacciones se componían de 1-3 µl de la extracción de DNA (aproximadamente 50 ng), 5 µl de tampón de PCR 10X, 1 µl de una disolución 10 mM de cada dNTP (Eppendorf), 3 µl de cada una de las disoluciones 10 µM de los cebadores OPSFORF1 y OPSFORR1 y 1'5 unidades de polimerasa *Taq* (Eppendorf), a los que se añadía agua miliQ

hasta completar el volumen final. Las condiciones de las reacciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 3 min. a 94 °C; 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 60 s a 50 °C y 90 s a 68 °C; y una extensión final de 7 min. a 68 °C.

Para una parte de las muestras, sin embargo, fue necesaria una segunda reacción de PCR, anidada respecto a la primera. La composición de esta segunda reacción fue idéntica a la de la primera, salvo por el uso como molde de 2 µl de la primera reacción y la utilización de 1 y 2 µl, respectivamente, de las disoluciones 10 µM de los cebadores OPSFORF2 y OPSFORR2 (ver tabla 2.3). Las condiciones de las reacciones fueron también similares a las de las reacciones de PCR primarias, con el único cambio del aumento de la temperatura de hibridación a 52 °C.

Tabla 2.3. Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen *lwrh* en las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus*.

Nombre	Uso ^{a)}	Secuencia
OPSFORF1	PCR1	5' GGCRTCACSATTTTCTTCTTGGGCGT 3'
OPSFORF2	PCR2/sec	5' CTTCTTGGGCGTGCTCGCGGTCG 3'
OPSFORF3	sec	5' CGCGGTCGTCGGTAACGGACTGG 3'
OPSFORF4	sec	5' TTCAGGGATTGTCTGCAAACCG 3'
OPSFORF5	sec	5' TCAATATGGACAATGGTRTTCATAGC 3'
OPSFORR1	PCR1	5' AATAACGGGTCCATAGTGAGYAAATG 3'
OPSFORR2	PCR2/sec	5' CCATAGTGAGYAAATGRAATATTCAG 3'
OPSFORR3	sec	5' AATATTCCAGAAAAGTTTATAACC 3'
OPSFORR4	sec	5' GGGGCTAAGGTCCAGAAAAGTCCG 3'
OPSFORR5	sec	5' GCCTTCACAATGAAATAATACGCG 3'

a) Se indica el uso concreto de cada cebador: PCR1, empleado en la primera amplificación; PCR2, empleado en la PCR anidada; sec., empleado en la secuenciación.

El fragmento mitocondrial que contiene los genes *atp6* y *atp8* se amplificó con los mismos cebadores y condiciones detallados en el capítulo 1, apartado 3.3.b. La mayoría de muestras necesitaron sólo de una reacción de PCR para la obtención del amplificado, utilizando los cebadores CO2AF y CO3WWRD. Para algunas muestras, no obstante, fue necesaria una reacción de PCR secundaria, parcialmente anidada, mediante el uso de los cebadores tRNALysAF2 y CO3WWRD (ver tabla 1.3).

La separación y la visualización de los fragmentos de PCR se realizaron tal y como se detalla en el capítulo 1, apartado 3.3.b, donde se describe asimismo

el protocolo de precipitación seguido para la purificación de los fragmentos amplificados.

c) Clonación, secuenciación y análisis de cromatogramas

Todos los amplificados mitocondriales y los correspondientes al gen *ef1a* se secuenciaron directamente a partir de los precipitados de los productos amplificados con los cebadores presentes en la tabla 2.3. Todos los fragmentos del gen *lwrh* se secuenciaron también directamente, pero un número reducido de ellos tuvo que ser además clonado debido a la existencia de más de una posición polimórfica, hecho que obligaba a la clonación para la resolución de las secuencias concretas de cada uno de los alelos. Para estos casos, se emplearon 1-2 µl del fragmento amplificado (equivalentes a 30-50 ng de DNA) para las reacciones de ligación y las consiguientes transformaciones, de manera idéntica a como se detalla en el capítulo 1, apartado 3.3.c. Se utilizaron generalmente 3 µl de la extracción plasmídica en la posterior secuenciación. La secuenciación, su lectura y los análisis de los cromatogramas se realizaron de manera idéntica a como se detalla en el capítulo 1, apartado 3.3.d.

3.4. Alineamiento de las secuencias

El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo en todos los casos mediante el programa Clustal X v1.81 (Thompson *et al.*, 1997), utilizando los parámetros de penalización por apertura y extensión de gap que aparecen por defecto, y con una posterior revisión manual del resultado del programa. Los primeros alineamientos se realizaron utilizando el modo de alineamiento múltiple (Multiple Alignment Mode). Posteriormente, se analizaron en algunos casos los alineamientos mediante la adición de nuevas secuencias a alineamientos previos empleando el modo de alineamiento con perfil (Profile Alignment Mode). Para los alineamientos de los genes nucleares *ef1a* y *lwrh*, los límites de los diferentes exones e intrones se dedujeron por comparación con los alineamientos realizados previamente para estos mismos genes en el capítulo 1. En el caso de los alineamientos del gen *lwrh* en las muestras de las

especies de los géneros *Forda* y *Paracletus* el alineamiento de los intrones reveló un elevado número de inserciones y deleciones (gaps). El análisis filogenético de las secuencias nucleares con intrones se realizó mediante dos aproximaciones distintas. En una de ellas se analizaron las regiones exónicas junto con las regiones pertenecientes a intrones que pudieron ser alineadas de manera fiable y sin presencia de gaps entre las mencionadas muestras. La otra aproximación implicó el uso del mismo alineamiento con exones y regiones intrónicas alineadas al que se añadió una codificación numérica de los distintos gaps y sus estados. Un gap completo o partes de un gap se establecieron como caracteres, asignando un número para cada estado distinto que apareció en las secuencias. En total, se añadieron 21 caracteres con estados entre 0 y 4. Este alineamiento se analizó mediante máxima parsimonia con el programa PAUP* v4.0b10 (Swofford, 2002) (ver apartado 3.7.b).

El programa MEGA v3.1 (Kumar *et al.*, 2004) se utilizó para el cálculo de distancias inter e intraespecíficas a partir de los alineamientos obtenidos, así como para el cálculo de posiciones variables e informativas y para la conversión de los ficheros de salida del programa ClustalX a formato Nexus para la entrada en el programa PAUP*.

Para las reconstrucciones filogenéticas basadas en máxima verosimilitud el modelo de sustitución nucleotídica a emplear se seleccionó en base al resultado obtenido con el programa Modeltest v3.7 (Posada y Crandall, 1998). El alineamiento de cada secuencia se utilizó como fichero de entrada de este programa, en combinación con el programa PAUP*, para la obtención del modelo y los parámetros de mejor ajuste (para más detalle ver capítulo 1, apartado 3.4).

3.5. Caracterización de las secuencias

El programa MEGA v3.1 (Kumar *et al.*, 2004) se utilizó para obtener la composición nucleotídica de las regiones codificantes de cada una de las secuencias empleadas. Por otro lado, los alineamientos obtenidos para cada uno de los genes en el apartado de la filogenia molecular de la tribu Fordini se utilizaron como ficheros de entrada en el programa TREE-PUZZLE v5.2

(Schmidt *et al.*, 2002). Mediante este programa se realizó un test χ^2 con el objetivo de analizar la homogeneidad de las secuencias obtenidas.

3.6. Test de tasas relativas

Los alineamientos de cada gen obtenidos para las especies ibéricas de la tribu Fordini se emplearon también para analizar la posible existencia de especies con tasas de sustitución aceleradas. En primer lugar, se empleó el programa RRTree (Robinson-Rechavi y Huchon, 2000) sobre los alineamientos de nucleótidos y tratando las secuencias como no codificantes. Posteriormente se llevó a cabo el análisis de tasas de sustitución relativas mediante el programa PHYLTEST utilizando la corrección de Kimura-2-parámetros (ver capítulo 1, apartado 3.6, para mayor detalle sobre el funcionamiento de los programas).

3.7. Reconstrucción filogenética molecular

a) Filogenia molecular de las especies ibéricas de la tribu Fordini

Las secuencias de los genes nucleares *lwrh* y *ef1a* y del fragmento mitocondrial que contiene los genes *atp6* y *atp8* se emplearon para realizar reconstrucciones filogenéticas de las especies de la tribu Fordini presentes en la Península Ibérica. Para el análisis de cada gen se realizó una búsqueda por máxima verosimilitud con el programa PAUP*. Las búsquedas se realizaron con 100 réplicas de adición de secuencias al azar y el algoritmo TBR (TBR branch swapping), limitando el número de reorganizaciones en cada réplica a 3000. La confianza estadística de los nodos se evaluó mediante el método de bootstrap (Felsenstein, 1985), con 300 pseudorréplicas, cada una de ellas con algoritmo TBR, una sola adición de secuencias al azar y un límite de 3000 para las reorganizaciones de cada réplica. Para cada especie de los géneros *Forda* y *Paracletus* se utilizó una única muestra de entre todas las obtenidas (ver tabla 2.2).

b) Filogenia molecular y taxonomía de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus*

El alineamiento de las secuencias obtenidas para las muestras pertenecientes a las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus* reveló un elevado número de inserciones y deleciones (gaps) en las regiones intrónicas. Parte de estas regiones pudo ser alineada con fiabilidad entre todas las muestras de ambos géneros pero no con las secuencias correspondientes a otros géneros cercanos dentro de la subtribu Fordina. Por este motivo, una vez comprobada la condición de géneros hermanos dentro esta subtribu, los análisis de las muestras se llevaron a cabo sin la inclusión de secuencias que actuasen como outgroup, con el objetivo de aumentar el número de posiciones variables útiles para el análisis. El alineamiento que contenía las secuencias correspondientes a los exones y a la parte de los intrones que pudo ser alineada fiablemente se analizó mediante máxima verosimilitud tal y como se implementa en el programa PAUP*. La búsqueda heurística del árbol máximo verosímil se realizó con el algoritmo TBR, 100 réplicas de adición de secuencias al azar y un límite de 3000 reorganizaciones para cada réplica. La confianza sobre los nodos se estimó mediante el método de bootstrap, con 300 pseudorréplicas y las mismas condiciones que la búsqueda heurística salvo por la aplicación de una única réplica de adición de secuencias al azar en cada pseudorréplica. El alineamiento que incluía además 21 caracteres en los que se codificaron los gaps (ver apartado 3.4 de este capítulo) se analizó mediante máxima parsimonia con los parámetros por defecto de PAUP*. La búsqueda heurística se realizó mediante el algoritmo TBR, con 5000 réplicas de adición de secuencias al azar. Se realizaron asimismo 2000 pseudorréplicas de bootstrap, cada una con una sola adición de secuencias al azar y algoritmo TBR.

4. Resultados

4.1. Caracterización de las secuencias

Gen de la opsina sensible a longitud de onda larga

En el alineamiento correspondiente a las especies de la tribu Fordini (que incluía las dos especies de la tribu Pemphigini utilizadas como outgroup), las secuencias de este gen variaron en longitud desde los 867 nucleótidos de *Thecabius sp.* a los 946 nucleótidos de *Aploneura lentisci*. La variación correspondió en su totalidad a inserciones o deleciones en alguno de los cuatro intrones presentes en el fragmento amplificado del gen. Una vez eliminadas las secuencias intrónicas, que no pudieron ser alineadas de manera fiable, el alineamiento de los exones tuvo una longitud de 602 nucleótidos. Un total de 143 posiciones de este alineamiento fueron variables y 110 de ellas parsimónicamente informativas. De éstas últimas, 84 correspondieron a terceras posiciones de codón, por lo que la información filogenética presente en primeras y segundas posiciones fue muy limitada, lo que también ocurrió con las secuencias inferidas de aminoácidos.

El test de homogeneidad en la composición nucleotídica del gen *lwrh* fue significativo únicamente para las dos especies empleadas como especies externas en los análisis, *Pemphigus populi* y *Thecabius sp.* Esta significatividad se observó cuando se consideraron todas las posiciones nucleotídicas, y no cuando los test se realizaron sobre las dos primeras posiciones de codón. No obstante, es importante destacar que estas diferencias se deben realmente a un sesgo de las secuencias correspondientes a las especies de la tribu Fordini, que fueron las que mostraron diferencias significativas en el análisis de composición realizado en el Capítulo 1. El sesgo observado fue hacia un mayor contenido en G+C en los representantes de la tribu Fordini, mucho más destacado en las terceras posiciones de codón. Es interesante también resaltar el hecho de que el sesgo es menos acusado en la especie *Smynthuodes betae* que en el resto de componentes de la tribu Fordini que se han analizado en este estudio (ver tablas Anexo III.1, Anexo III.3, Anexo III.21 y Anexo III.22 en CD adjunto).

Para el análisis detallado de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus* se obtuvo un total de 76 secuencias del gen *lwrh* a partir de 60 muestras. En 4 de las muestras se obtuvo la secuencia (tanto del gen *lwrh* como del fragmento mitocondrial) para las fundatrigenas extraídas de las agallas y también para las virginógenas descendientes de éstas y obtenidas en experimentos de transferencia realizados por Nicolás Pérez Hidalgo. En todos los casos las secuencias obtenidas a partir de las virginógenas fueron idénticas a las de sus respectivas fundatrigenas, demostrando que no existió contaminación entre muestras distintas durante estos experimentos. Por otro lado, en los experimentos de transferencia de algunas muestras de la especie *P. cimiciformis* se obtuvieron dos tipos de virginógenas ápteras. La forma mayoritaria presentó el cuerpo redondeado, 5 antenómeros, tibias posteriores rectas, ojos formados únicamente por un triomatidio y la forma de la coxa del tercer par de patas relativamente más corta. Las medidas morfométricas de esta forma fueron, además, idénticas a las descritas para la forma virginógena áptera de la especie *F. rotunda* (Nicolás Pérez Hidalgo, comunicación personal). La segunda forma, menos frecuente, presentó el cuerpo aplanado, 6 antenómeros, tibias posteriores curvadas, ojos formados por varios omatidios además del triomatidio y la coxa del tercer par de patas relativamente más alargada. Esta forma se corresponde con la descripción realizada por von Heyden para la forma virginógena áptera de *P. cimiciformis*, y que clásicamente ha sido reconocida como tal. Este resultado se obtuvo, por ejemplo, en el experimento de transferencia de la muestra *P. cimiciformis* Le5062. Para esta muestra, se obtuvo la secuencia del gen *lwrh* en individuos de cada una de las dos formas. Las secuencias obtenidas fueron idénticas, demostrando que no existió contaminación durante los experimentos y que ambas formas pertenecían a la misma muestra. Tanto en este caso como en aquéllos en los que se obtuvieron secuencias a partir de fundatrigenas y de sus respectivas virginógenas (ver más arriba), sólo se utilizó una de las secuencias de cada muestra, quedando así un total de 72 secuencias para este gen. Debido a problemas metodológicos en la secuenciación, las secuencias de las muestras *P. cimiciformis* Co9947 y *P. donisthorpei* Bu101 presentaron una longitud de aproximadamente 70 nucleótidos menor en el extremo 5'. La comparación de

los resultados filogenéticos a partir de los alineamientos con y sin estas secuencias no reveló diferencias relevantes, por lo que se decidió incluirlas en el análisis. Una vez determinado el inicio del alineamiento en función de estas secuencias, éste varió en longitud entre los 807 nucleótidos de las muestras *F. formicaria* O5555 y *F. formicaria* Le5548 y los 853 nucleótidos de *F. marginata* O5540. Las secuencias de las muestras *P. cimiciformis* Co9947 y *P. donisthorpei* Bu101 tenían una longitud de 844 nucleótidos. La variación correspondió de nuevo en su totalidad a variaciones en la longitud de los cuatro intrones presentes. A partir de este alineamiento inicial se obtuvieron dos alineamientos para su uso en los análisis filogenéticos (ver apartado 3.4 para más detalle). El primer alineamiento estaba compuesto por los exones y la parte de los intrones que se pudo alinear de manera fiable. Este alineamiento presentó una longitud de 769 nucleótidos, con 63 posiciones variables, 61 de ellas parsimónicamente informativas. De éstas, 31 pertenecieron a los exones y 30 a los intrones, lo que refleja la importancia de la adición de las regiones intrónicas en el análisis de este tipo de muestras, correspondientes a niveles taxonómicos intragenéricos e intraespecíficos. El segundo alineamiento creado fue idéntico al primero con la adición de 21 caracteres en los que se codificó la variabilidad de los gaps de los intrones existentes en las muestras. Este alineamiento tuvo 84 posiciones variables, 82 parsimónicamente informativas en total. La traducción de los exones reveló la existencia de sólo 4 posiciones variables e informativas en el alineamiento de los aminoácidos inferidos.

Gen del factor de elongación 1 α

El alineamiento de las secuencias del gen *ef1 α* de las especies de la tribu Fordini varió en longitud entre los 1055 nucleótidos de la secuencia de *Smynthurodes betae* y los 1102 de la correspondiente a *Baizongia pistaciae*. El alineamiento incluyó además una secuencia más corta, de sólo 873 nucleótidos, correspondiente a la secuencia de cDNA de *Pemphigus populi*, usada como especie externa. La variación en longitud era debida en su totalidad a los tres intrones presentes en el fragmento amplificado. Debido a la imposibilidad de alinear las regiones intrónicas entre los distintos géneros, el análisis filogenético se realizó sobre el alineamiento de la secuencia de exones,

que presentó una longitud de 873 nucleótidos, con 141 posiciones variables, 82 de ellas parsimónicamente informativas. La mayoría de posiciones útiles para la reconstrucción filogenética se hallaban en terceras posiciones de codón, de las cuales 128 eran variables y 80 informativas. Las primeras y segundas posiciones de codón tenían, por tanto, muy escasa utilidad filogenética por sí solas, así como las secuencias aminoacídicas, en las que sólo se halló 8 posiciones variables, 2 de ellas informativas.

Ninguna de las especies analizadas mostró diferencias significativas en la composición nucleotídica de las secuencias del gen *ef1 α* , aunque en el análisis de la composición realizado en el capítulo 1 sí mostró diferencias significativas la especie *Baizongia pistaciae*.

Fragmento mitocondrial

El análisis de las especies ibéricas de la tribu Fordini a partir de las secuencias mitocondriales se realizó, por un lado, con sólo la secuencia del gen *atp6*, debido a que el resto de la secuencia del fragmento mitocondrial no estaba disponible para la especie *Aploneura lentisci*. Por otro lado, se realizó el análisis con todo el fragmento mitocondrial eliminando esta especie. El alineamiento de las secuencias del gen *atp6* tuvo una longitud de 654 nucleótidos, con 277 posiciones variables, 191 de ellas parsimónicamente informativas. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes tuvo una longitud de 218 posiciones, 87 de ellas variables y 59 informativas. Por su lado, el alineamiento de las secuencias nucleotídicas completas del fragmento mitocondrial, sin *A. lentisci*, contenía 920 posiciones, 380 de ellas variables y 266 parsimónicamente informativas.

Los test de homogeneidad en la composición nucleotídica no mostraron diferencias significativas para ninguna de las especies, tanto cuando se analizó todo el fragmento mitocondrial como cuando se limitó el análisis al gen *atp6*. No obstante, es importante destacar que, aunque no aparezcan diferencias significativas, la composición de la tercera posición de codón del gen *atp6* resultó ser variable entre las especies de la tribu Fordini. En esta posición, pudo apreciarse un mayor contenido en A+T en las especies de los géneros *Forda* y *Paracletus* y *Smynthuodes*, y hacia G+C en las especies de los

géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica*. En el análisis realizado en el capítulo 1 ninguna de las especies mostró tampoco diferencias significativas, aunque la variabilidad en la composición de la tercera posición de codón era también evidente (ver Anexo III en CD adjunto).

Para el análisis detallado de las muestras correspondientes a los géneros *Forda* y *Paracletus* se utilizó la mayor parte del fragmento amplificado en las reacciones de PCR, obteniendo un total de 45 secuencias. La limitación de la secuencia empleada vino impuesta por la limitación de la secuenciación de los extremos en las reacciones de secuenciación directa del fragmento. El alineamiento presentó en último término 939 posiciones nucleotídicas, pertenecientes al extremo 3' del gen del tRNA^{Lys}, las secuencias completas de los genes *atp8* y *atp6* y el extremo 5' del gen *colll*. Presentaba además 201 posiciones variables, de las cuales 199 eran parsimónicamente informativas.

4.2. Test de tasas relativas

Las pruebas estadísticas realizadas con los programas RRTree y PHYLTEST para el estudio de las tasas relativas de sustitución nucleotídica no mostraron aceleración de tasas en ninguna especie en el análisis del gen *ef1α*. Sin embargo, cuando se emplearon las secuencias correspondientes al gen *lwrh*, estos programas mostraron la existencia de tasas aceleradas en la especie *Smynthurodes betae* y en el clado formado por las especies de los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica*. En ambos casos, la aceleración se detectó únicamente cuando se comparaban con el grupo formado por las especies de los géneros *Forda* y *Paracletus*. En el análisis de las tasas relativas de sustitución del gen *atp6*, ambos programas permitieron detectar la aceleración de tasas en el grupo formado por las especies de los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica* cuando se comparó con el grupo de las especies de los géneros *Forda* y *Paracletus*.

4.3. Reconstrucción filogenética molecular

a) Filogenia molecular de las especies ibéricas de la tribu Fordini

La figura 2.7 muestra los árboles máximo verosímiles resultantes de los análisis de los genes nucleares *lwrh* y *ef1 α* en las especies ibéricas de la tribu Fordini. Los resultados permitieron agrupar las especies analizadas en dos grupos claros. El primer grupo quedó formado por las especies *Aploneura lentisci*, *Baizongia pistaciae* y *Geoica utricularia*, clado apoyado por valores de bootstrap elevados en las reconstrucciones de ambos genes. En los análisis de ambas secuencias se pudo observar, además, una relación más cercana entre las especies *B. pistaciae* y *G. utricularia*, aunque siempre con un apoyo estadístico bajo. El segundo grupo estaba formado por las especies pertenecientes a los géneros *Forda* y *Paracletus*. Ambos géneros agruparon juntos en el árbol correspondiente al gen *lwrh*, aunque con un apoyo estadístico menor del 50%. Sin embargo, el apoyo a este nodo llegó a ser del 90% en el árbol correspondiente al gen *ef1 α* . Además, la elevada similitud en la secuencia de los intrones de ambos genes en las especies de estos géneros demostró claramente su condición de géneros hermanos. Por otro lado, la posición de la especie *Smynthurodes betae* fue incongruente entre las topologías obtenidas con ambas secuencias nucleares. Esta especie apareció como un tercer grupo, en la posición basal de la tribu, en la reconstrucción obtenida en el análisis del gen *lwrh*, posición apoyada por un valor de bootstrap de 98%. En el análisis del gen *ef1 α* , sin embargo, esta especie quedó agrupada junto a los géneros *Forda* y *Paracletus*, también con un valor de bootstrap asociado muy elevado (97%).

El análisis de las secuencias mitocondriales confirmó las dos agrupaciones definidas anteriormente (figura 2.8). En el árbol máximo verosímil obtenido a partir de las secuencias del gen *atp6* las especies de los géneros *Forda* y *Paracletus* no agruparon en un mismo clado. No obstante, la eliminación de la especie *Aploneura lentisci*, y la inclusión de todo el fragmento mitocondrial amplificado, dieron lugar a la agrupación de los géneros *Forda* y *Paracletus*, apoyada por un valor de bootstrap de 74%. En la reconstrucción obtenida a partir de las secuencias del gen *atp6* apareció de nuevo el grupo formado por

las especies de los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica* (98% de bootstrap). Además, de nuevo, se observó una relación más estrecha entre las especies de los géneros *Baizongia* y *Geoica*, apoyada por un valor estadístico moderado (73%). Por otro lado, los resultados confirmaron la estrecha relación de las dos especies del género *Geoica* incluidas en el análisis del fragmento mitocondrial. La posición de la especie *S. betae* en estas reconstrucciones fue diferente a la que ocupó en las reconstrucciones realizadas con ambos genes nucleares, al quedar agrupada junto al clado formado por los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica*. Esta posición se vio apoyada por un valor de bootstrap de 78% en el árbol máximo verosímil obtenido para el gen *atp6*. Es importante destacar que, cuando se eliminaron las terceras posiciones de codón del gen *atp6* en el análisis del fragmento mitocondrial completo, *S. betae* se colocó en la posición basal del árbol filogenético, aunque sin un apoyo estadístico notable.

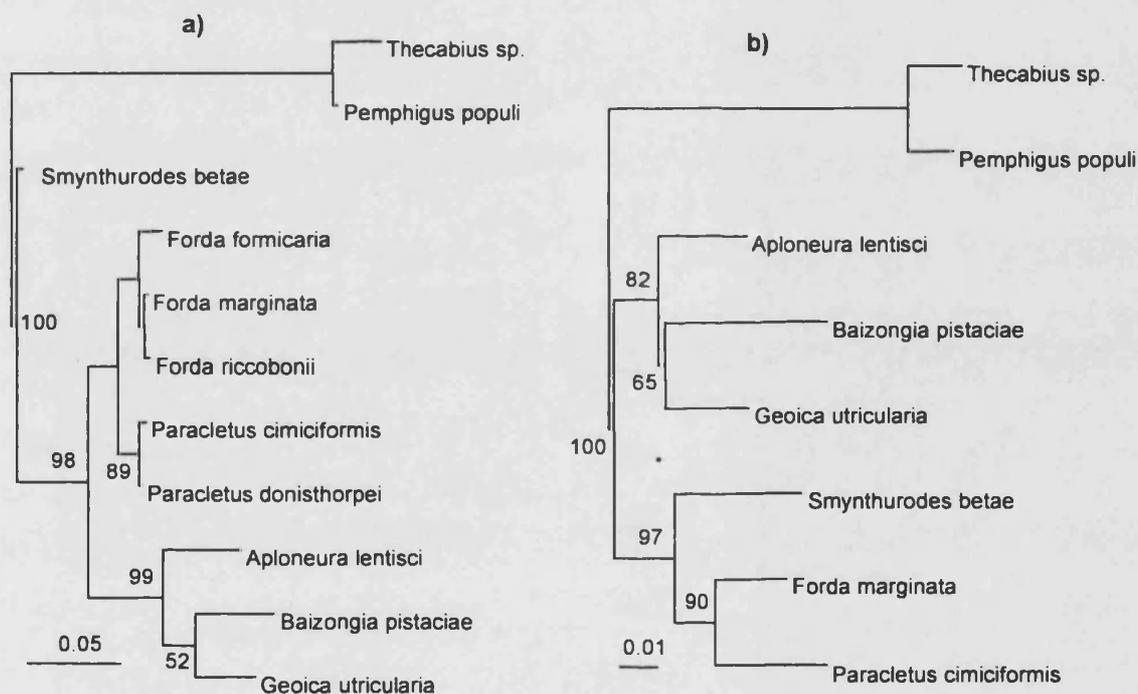


Figura 2.7. Árboles máximo verosímiles obtenidos a partir del análisis de las secuencias de los genes nucleares *lwrh* (a) y *ef1a* (b) para las especies ibéricas de la subtribu Fordina. En ambos casos se utilizaron las estimas medias ponderadas de los modelos de sustitución considerados en el programa Modeltest (ver Capítulo 1, apartado 3.7.a) con valores de $\alpha=0.7412$ y $\alpha=0.5921$, respectivamente (modelos de mejor ajuste: (a) HKY+G, (b) SYM+I+G). Se muestran los valores de bootstrap mayores que 50% de un total de 300 pseudorreplicas. Las barras situadas junto a los árboles indican la longitud de rama que se corresponde con una distancia de 0.05 y 0.01 sustituciones por sitio nucleotídico, respectivamente.

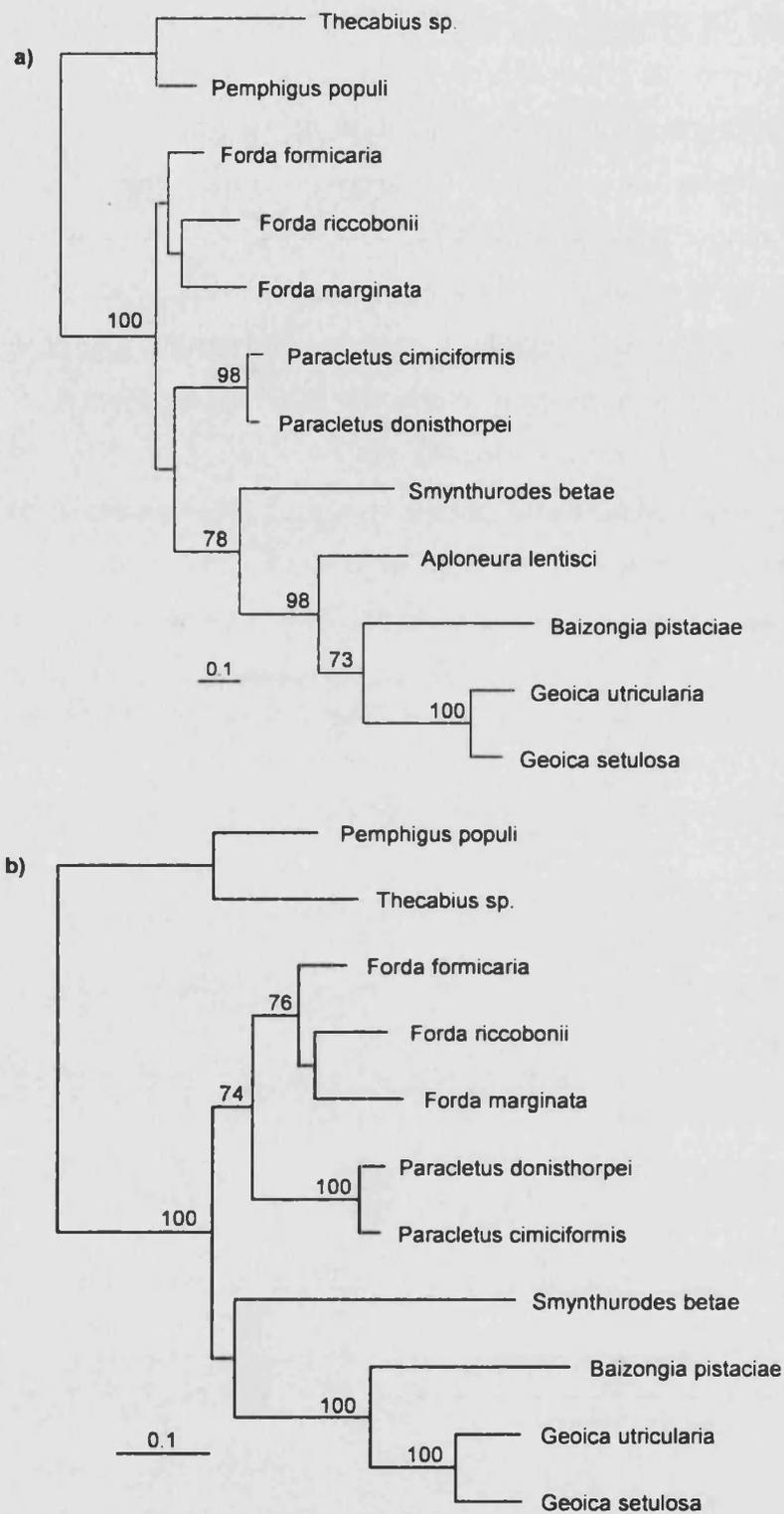


Figura 2.8. Árboles máximo verosímiles obtenidos a partir del análisis de las secuencias del gen mitocondrial *atp6* (a) y del fragmento mitocondrial completo (b) de las especies ibéricas de la subtribu Fordina, utilizando las estimas medias de los modelos de sustitución y $\alpha=0'7888$ y $\alpha=0'8690$, respectivamente (modelos de mejor ajuste: (a) TIM+I+G, (b) TrN+I+G). Se muestran los valores de bootstrap mayores de 50%.

b) Filogenia molecular y taxonomía de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus*

Además de aparecer como géneros hermanos, en las figuras 2.7 y 2.8 puede comprobarse que *Forda* y *Paracletus* son géneros claramente monofiléticos, a tenor de los elevados valores de bootstrap que apoyaron, en general, las agrupaciones de sus especies respectivas. La eliminación del resto de géneros de la tribu en los alineamientos permitió el uso de una mayor parte de las secuencias obtenidas, tanto en el caso del gen *lwrh*, en el que se pudo utilizar las regiones intrónicas, como del fragmento mitocondrial, del cual pudo emplearse gran parte de las regiones adyacentes al gen *atp6*. Los resultados de los análisis filogenéticos correspondientes se muestran en las figuras 2.9 a 2.12. Dentro del género *Forda* es importante destacar dos resultados relevantes. Primero, las muestras correspondientes a las especies *F. marginata* y *F. riccobonii* formaron en los árboles filogenéticos dos clados independientes y respectivamente monofiléticos. Este resultado apoya la hipótesis de la validez del estatus de especie para ambos taxones. Además, los resultados no sugirieron siquiera una separación muy reciente de ambos linajes, dada la longitud considerable de las ramas que condujeron a cada una de las especies en cada reconstrucción (ver distancias en el apartado 4.4). Por otro lado, las relaciones entre las tres especies del género *Forda* se resolvieron en todas las reconstrucciones con una relación más estrecha entre *F. marginata* y *F. riccobonii*, dejando a *F. formicaria* en la posición basal del género. El valor de bootstrap de esta relación fue bajo en el árbol obtenido a partir del gen *lwrh* sin la codificación de los gaps de sus intrones (66% en la figura 2.9), pero fue mayor al usar esta codificación en el análisis por máxima parsimonia (77% en la figura 2.10) y en el resultado del análisis del fragmento mitocondrial (71% en la figura 2.12). El resultado es acorde con la taxonomía del grupo, en la que las dos primeras especies han sido incluidas en el grupo de especies "marginata" (Remaudière, 1999). Existen, además, otros datos que apoyan las relaciones observadas. Uno de ellos es el hecho de que el uso exclusivamente de los exones del gen *lwrh* para realizar la reconstrucción filogenética no resultó en la separación en dos clados de las muestras de ambas especies. El resultado de

este análisis, que aparece en la figura 2.11, fue la presencia de un clado formado por las muestras de *F. riccobonii*, apoyado por un valor estadístico de 69%, dentro de un clado mayor donde se incluyeron también las muestras correspondientes a *F. marginata*. Esta región del gen, sin embargo, sí permitió la separación de este grupo respecto a las muestras de la especie *F. formicaria*. Por otro lado, la observación del alineamiento de los intrones de este mismo gen reveló que los estados de la mayor parte de los gaps eran iguales entre *F. marginata* y *F. riccobonii*, y diferentes en *F. formicaria*. Las características morfológicas de las especies apoyan también esta relación. Es destacable, por último, que, pese a no estar apoyadas por elevados valores de bootstrap, estas relaciones entre las tres especies del género *Forda* aparecieron también en las reconstrucciones correspondientes a las especies ibéricas de la tribu Fordini descritas anteriormente (ver figuras 2.8 y 2.9).

Las muestras analizadas pertenecientes al género *Paracletus* se agruparon, tanto en las reconstrucciones obtenidas a partir del gen *lwrh* como en las correspondientes al fragmento mitocondrial, en dos grupos apoyados por valores de bootstrap entre moderados y elevados (ver figuras 2.9 a 2.12). Contrariamente a lo esperado, los dos grupos obtenidos no se correspondieron con las dos especies estudiadas, por lo cual se decidió denominar estas dos agrupaciones como linaje 1 y linaje 2. Mientras que todas las muestras pertenecientes a la especie *P. donisthorpei* se agruparon dentro del linaje 1, las muestras correspondientes a *P. cimiciformis* aparecieron en ambos linajes, aunque mayoritariamente en el linaje 2 (75% aproximadamente). En la reconstrucción filogenética obtenida a partir de las secuencias del fragmento mitocondrial se pudo apreciar además, dentro del linaje 2, un pequeño subgrupo, apoyado por un valor estadístico de 100% (ver figura 2.12). Este grupo está formado por todas las secuencias correspondientes a las muestras provenientes de la provincia de Burgos e identificadas como *P. cimiciformis*. Para las secuencias mitocondriales no existió mayor subestructuración dentro del linaje 2, ni tampoco en el linaje 1, donde todas las secuencias obtenidas difirieron entre sí por un número muy reducido de cambios puntuales.

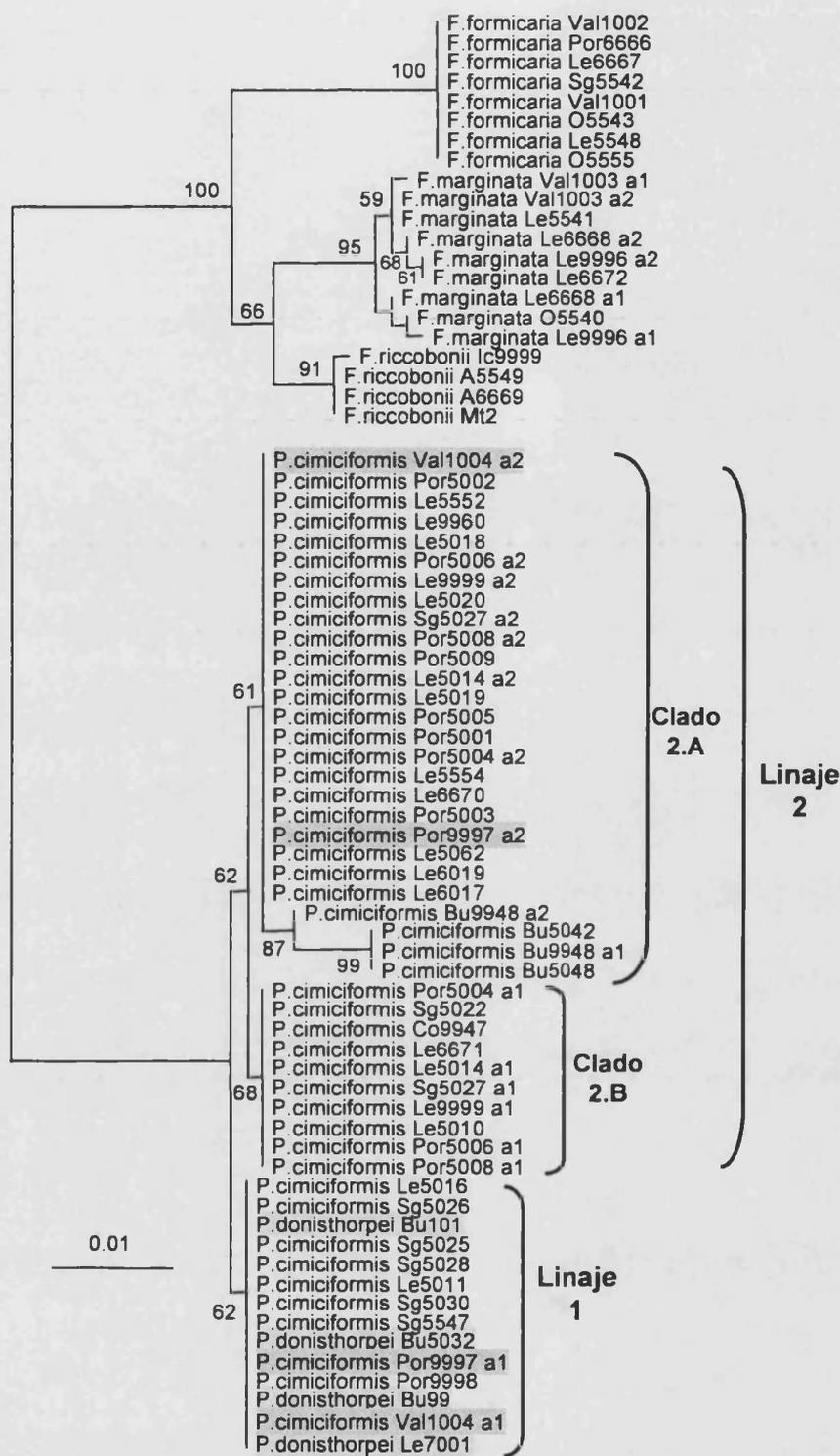


Figura 2.9. Filogenia de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus*. Árbol máximo verosímil a partir de las secuencias del *lwrh* utilizando las estimas medias de los modelos y $\alpha=0.2617$ (modelo de mejor ajuste: HKY+I). Se muestran los valores de bootstrap mayores que 50% junto a los nodos correspondientes. a1: alelo 1; a2: alelo 2. Las muestras pertenecientes a la especie *P. donisthorpei* aparecen resaltadas en amarillo para facilitar su localización. Las muestras de la especie *P. camiciformis* con alelos en los dos linajes se muestran resaltadas en color verde.

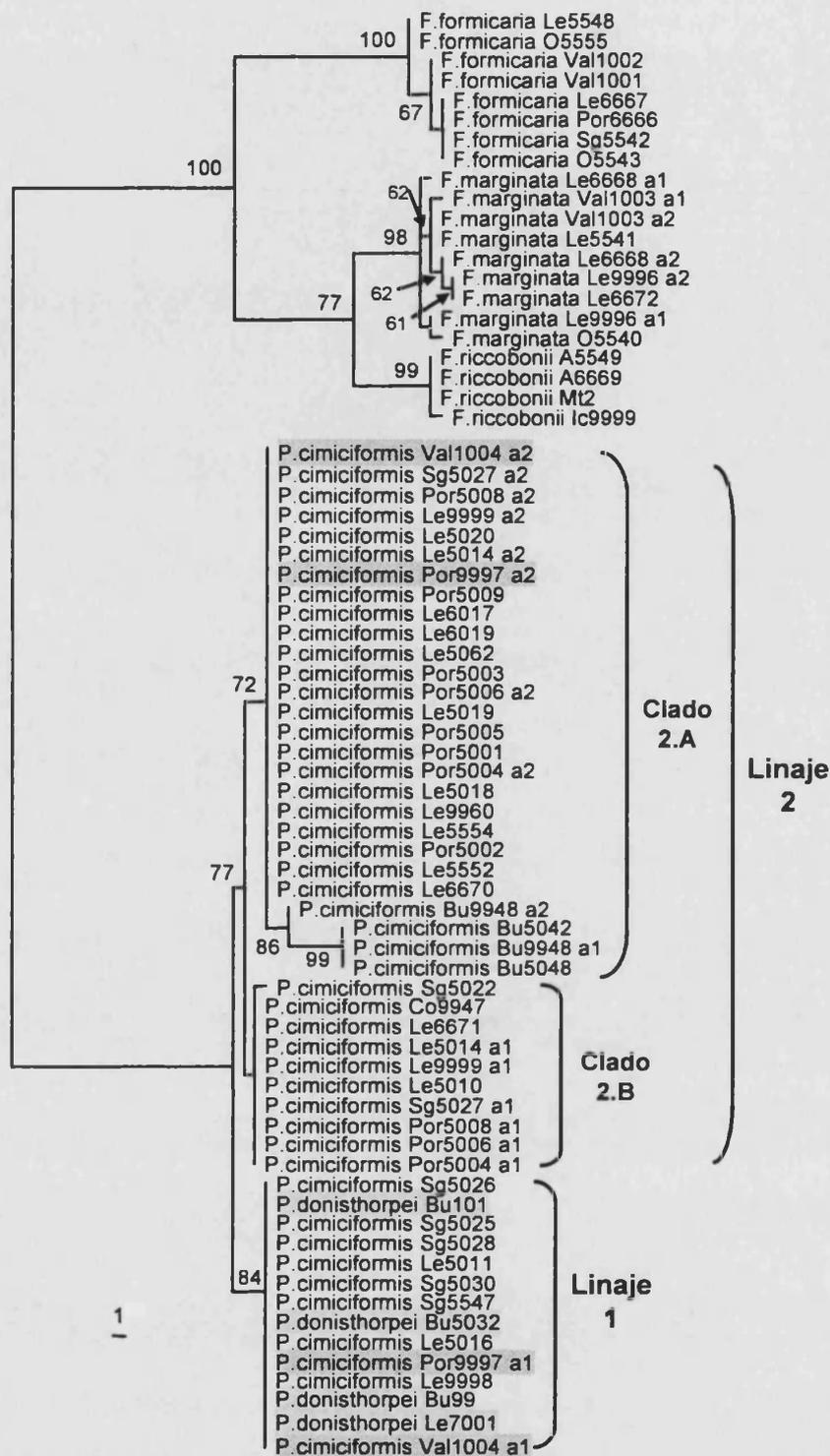


Figura 2.10. Filogenia de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus*. Se muestra uno de los 112 árboles máximo parsimónicos obtenidos a partir de las secuencias del gen *lwrh* incluyendo la codificación de los gaps. Se muestran los valores de bootstrap mayores que 50% de un total de 2000 pseudorréplicas. a1: alelo 1; a2: alelo 2.

En las reconstrucciones obtenidas a partir del gen *lwrh* la identidad entre las secuencias pertenecientes al linaje 1 llegó a ser completa. El linaje 2, sin embargo, presentó una subestructura mayor que la existente en la reconstrucción correspondiente al fragmento mitocondrial. Inicialmente este grupo se dividió en dos clados, que se denominaron 2.A y 2.B. El clado 2.A incluyó un mayor número de secuencias y en él, a su vez, apareció otro pequeño grupo formado por las secuencias de Burgos de la especie *P. cimiciformis*. La composición de muestras de este pequeño grupo fue idéntica a la descrita anteriormente en el árbol obtenido a partir de las secuencias mitocondriales. Las secuencias del gen *lwrh* del resto de muestras del clado 2.A eran totalmente idénticas. También lo eran entre sí todas las secuencias agrupadas en el clado denominado 2.B, a excepción de la correspondiente a la muestra *P. cimiciformis* Sg5022 (ver figura 2.10). Para varias muestras se obtuvieron 2 alelos del gen *lwrh*, uno de cada clado. La inclusión de las regiones intrónicas con gaps en el análisis por máxima parsimonia aumentó en general los apoyos de bootstrap de los grupos descritos. Los apoyos en general bajos de éstos en el análisis sin gaps (ver la figura 2.9) pasaron a ser moderados en el análisis con gaps (ver figura 2.10). Igualmente, la existencia de un gap con estado diferente en el clado 2.A aumentó su apoyo estadístico de bootstrap de 61% a 72%. El único clado que no vio aumentado su apoyo de bootstrap en este análisis fue el clado 2.B, cuyo apoyo fue menor de 50.

Existe una correspondencia casi total en la composición de los linajes 1 y 2 entre los árboles obtenidos para el gen nuclear y el fragmento mitocondrial. Para aquellas muestras para las que fue posible obtener ambas secuencias, las dos se agruparon en el mismo linaje en las respectivas reconstrucciones filogenéticas. Las únicas excepciones ocurrieron con las muestras de *P. cimiciformis* Por9997 y Val1004. Para cada una de estas muestras se obtuvieron dos alelos para el gen *lwrh*, agrupándose cada uno de ellos en uno de los dos linajes que aparecen en las reconstrucciones. Sin embargo, sólo se obtuvo una secuencia del fragmento mitocondrial para cada una de las muestras. La secuencia mitocondrial de la muestra Por9997 agrupó en el linaje 1 y la correspondiente a la muestra Val1004 lo hizo en el linaje 2 (figura 2.12).

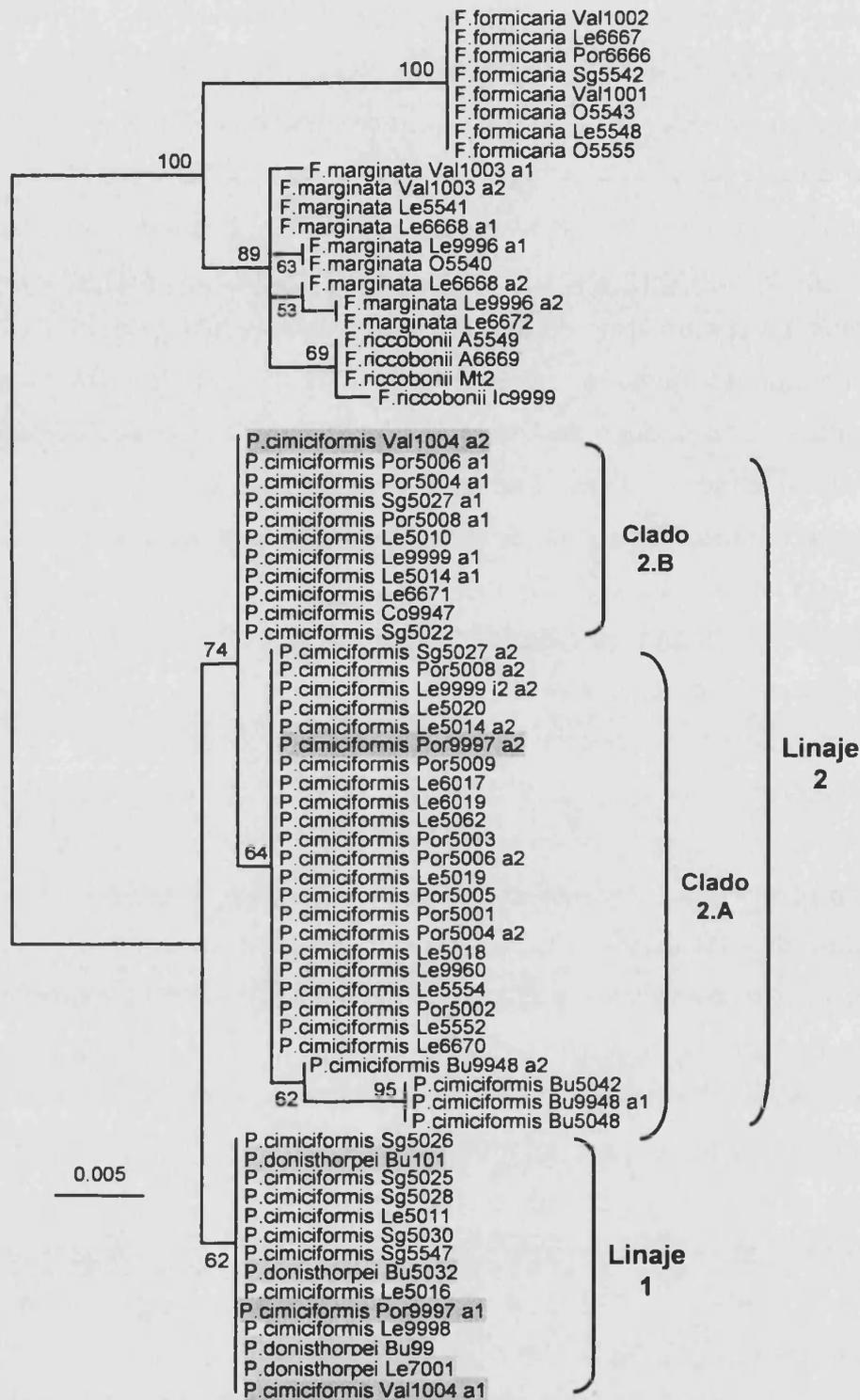


Figura 2.11. Filogenia de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus*. Árbol máximo verosímil a partir de las secuencias de los exones del gen *lwrh* utilizando las estimas medias de los modelos y $\alpha=3'1585$ (modelo de mejor ajuste: TrN). Se muestran los valores de bootstrap mayores que 50%. a1: alelo 1; a2: alelo 2.

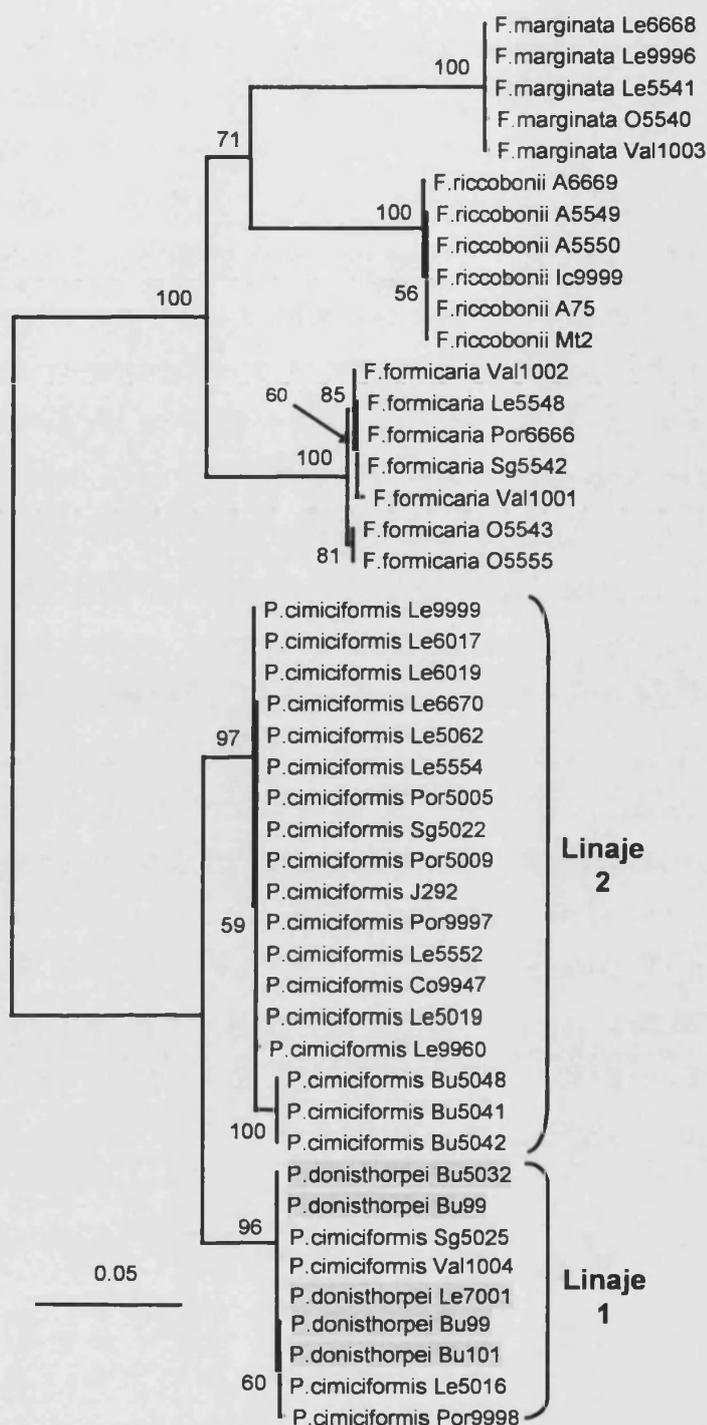


Figura 2.12. Filogenia de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus*. Árbol máximo verosímil a partir de las secuencias del fragmento mitocondrial con estimas medias de los modelos y $\alpha=3'0704$ (modelo de mejor ajuste: TrN+I). Se muestran los valores de bootstrap mayores que 50%.

4.4. Estimaciones de divergencias genéticas intra e interespecíficas

En la tabla 2.4 pueden observarse las estimaciones de las distancias genéticas entre las especies ibéricas de la tribu Fordini de los tres genes empleados en las reconstrucciones filogenéticas. Todas las distancias se calcularon utilizando la corrección de Kimura-2-parámetros (Kimura, 1980), e incluyendo únicamente las regiones codificantes de los tres genes, con el objetivo de proporcionar estimaciones de distancias que puedan ser comparadas con otras estimaciones para estos genes, en otros grupos de pulgones o en taxones más alejados. Se eliminaron por tanto las secuencias de los intrones de los genes nucleares y, en el caso del fragmento mitocondrial, sólo se utilizó la secuencia correspondiente al gen *atp6*. Se muestran en la tabla también las distancias calculadas entre las especies de la tribu Fordini y las dos especies utilizadas como grupos externos, pertenecientes a la tribu Pemphigini. Las estimaciones calculadas entre las especies pertenecientes a los géneros *Forda* y *Paracletus* pueden proporcionar información valiosa para la discusión sobre su validez taxonómica. Estos datos aparecen destacados con fondo gris en la tabla 2.4. No obstante, los datos provienen de estimaciones realizadas con una sola secuencia por cada una de estas especies, utilizando los alineamientos de las reconstrucciones filogenéticas de la tribu Fordini. La tabla 2.5 muestra las estimaciones de distancias genéticas entre las especies de los géneros *Forda* y *Paracletus* realizadas utilizando todas las secuencias obtenidas de las muestras de estas especies.

Tabla 2.4. Distancias genéticas entre especies de la tribu Fordini^a.

	<i>Bp</i>	<i>Gu</i>	<i>Al</i>	<i>Fm</i>	<i>Fr</i>	<i>Ff</i>	<i>Pc</i>	<i>Pd</i>	<i>Sb</i>	<i>Ts</i>	<i>Pp</i>
<i>Bp</i>	-	0.191	0.177	0.223	0.198	0.208	0.215	0.229	0.227	0.225	0.227
<i>Gu</i>	0.065/0.054	-	0.203	0.242	0.206	0.221	0.203	0.215	0.243	0.269	0.250
<i>Al</i>	0.082/0.059	0.074/0.041	-	0.192	0.193	0.200	0.181	0.193	0.201	0.233	0.259
<i>Fm</i>	0.098/0.072	0.093/0.067	0.093/0.068	-	0.116	0.120	0.147	0.149	0.213	0.204	0.179
<i>Fr</i>	0.096	0.095	0.091	0.005	-	0.105	0.141	0.143	0.205	0.208	0.173
<i>Ff</i>	0.104	0.101	0.097	0.017	0.019	-	0.138	0.136	0.199	0.219	0.179
<i>Pc</i>	0.080/0.075	0.087/0.068	0.089/0.072	0.029/0.044	0.031	0.036	-	0.044	0.207	0.237	0.214
<i>Pd</i>	0.082	0.086	0.088	0.027	0.029	0.034	0.005	-	0.215	0.233	0.206
<i>Sb</i>	0.102/0.08	0.102/0.063	0.096/0.064	0.052/0.053	0.047	0.059	0.061/0.062	0.056	-	0.242	0.229
<i>Ts</i>	0.185/0.100	0.207/0.084	0.190/0.076	0.146/0.091	0.144	0.150	0.165/0.099	0.159	0.121/0.091	-	0.145
<i>Pp</i>	0.181/0.103	0.191/0.088	0.176/0.078	0.142/0.089	0.140	0.146	0.163/0.089	0.157	0.113/0.094	0.026/0.026	-

a) Distancias genéticas (con corrección Kimura-2-parámetros) entre las especies de las tribus Fordini y Pemphigini. Hemimatriz superior: gen *atp6*; hemimatriz inferior: gen *lwrh* / gen *ef1a*. Algunas de las distancias para el gen *ef1a* no aparecen por la ausencia de algunas de las especies en los análisis de esta secuencia. Los nombres de las especies aparecen abreviados con las primeras letras de los nombres genérico y específico (ver tabla 2.2).

Tabla 2.5. Distancias inter e intraespecíficas en los géneros *Forda* y *Paraclsetus*.

	a) Distancias interespecíficas					b) Distancias intraespecíficas		
	<i>Ff</i>	<i>Fm</i>	<i>Fr</i>	<i>PI1</i>	<i>PI2</i>	<i>lwrh</i>	<i>atp6</i>	
<i>Ff</i>	-	0.1189	0.1038	0.1348	0.1383	0.0000	0.0032	<i>Ff</i>
<i>Fm</i>	0.0189	-	0.1167	0.1498	0.1447	0.0028	0.0012	<i>Fm</i>
<i>Fr</i>	0.0216	0.0051	-	0.1441	0.1393	0.0009	0.0005	<i>Fr</i>
<i>PI1</i>	0.0370	0.0289	0.0316	-	0.0447	0.0000	0.0018	<i>PI1</i>
<i>PI2</i>	0.0391	0.0310	0.0337	0.0058	-	0.0021	0.0033	<i>PI2</i>

a) Distancias interespecíficas entre las especies del género *Forda* y los dos linajes del género *Paraclsetus*. Hemimatriz inferior: gen *lwrh*; hemimatriz superior: gen *atp6*. b) Distancias intraespecíficas (o intralíneaje). Los nombres de las especies aparecen abreviados con las primeras letras de los nombres genérico y específico. *PI1*: *Paraclsetus* linaje 1; *PI2*: *Paraclsetus* linaje2. Distancias calculadas con la corrección de Kimura 2 parámetros.

5. Discusión

5.1. Filogenia molecular de las especies ibéricas de la tribu Fordini

El primer apartado de este capítulo ha abordado el estudio de las relaciones filogenéticas entre los representantes ibéricos de la tribu Fordini, todos ellos pertenecientes a la subtribu Fordina, mediante el análisis de las secuencias de los genes nucleares de la opsina sensible a longitud de onda larga (*lwrh*) y el factor de elongación de la traducción 1 α (*ef1 α*) y de un fragmento mitocondrial que contiene el gen de la subunidad 6 de la ATPasa-F (*atp6*). Los resultados filogenéticos obtenidos en este trabajo sugirieron que estas especies forman dos grupos claros. Un primer grupo quedaría formado por las especies pertenecientes a los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica* (ver figuras 2.7 y 2.8), en el cual los dos últimos géneros presentarían una relación más estrecha. El segundo grupo lo formarían las especies de los géneros *Forda* y *Paracletus*. La posición de la especie *Smynthurodes betae* varió en los resultados obtenidos a partir de los tres genes utilizados. No obstante, la reconstrucción filogenética obtenida en el análisis del gen *ef1 α* , que a diferencia de las otras dos secuencias empleadas no mostró sesgos en la composición ni tasas de sustitución aceleradas en ninguna de las especies incluidas en el análisis, apoyó fuertemente la inclusión de *S. betae* en el mismo grupo de los géneros *Forda* y *Paracletus*. Los resultados obtenidos concuerdan en gran medida con algunas clasificaciones basadas en caracteres morfológicos. Por ejemplo, Bodenheimer y Swirski (1957) dividieron su subfamilia Fordinae (equiparable a la tribu Fordini de la clasificación utilizada en este estudio pero sin incluir las especies de la subtribu Melaphidina) en dos tribus: Fordini y Baizongiini. En la tribu Baizongiini incluyeron, entre otras, las especies de los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica*, coincidiendo con una de las agrupaciones resultantes de los análisis filogenéticos moleculares presentados en este trabajo. En la tribu Fordini, estos autores incluyeron las especies de los géneros *Forda*, *Paracletus* y *Smynthurodes*, agrupación que coincide con el resultado comentado anteriormente en el análisis del gen *ef1 α* . Börner y Heinze (Börner y Heinze, 1957; Ilharco y van Harten, 1987) realizaron subdivisiones similares a las planteadas por Bodenheimer y Swirski. Las

relaciones obtenidas en este trabajo son algo menos concordantes con la clasificación utilizada por Heie (1980), basada en la revisión de clasificaciones anteriores, para el estudio taxonómico de los pulgones de la subfamilia Eriosomatinae presentes en Fenoscandia y Dinamarca. En la clasificación empleada por este autor se divide inicialmente la subfamilia Fordinae (también equiparable a la tribu Fordini de la clasificación empleada en el presente estudio; ver tabla 2.1) en las tribus Fordini y Melaphidini. En la tribu Fordini, Heie propuso la existencia de tres subtribus: Baizongiina, Geoicina y Fordina. Los géneros *Forda* y *Paracletus* quedaron incluidos en la subtribu Fordina junto con *S. betae*. Dos especies del género *Geoica* formaron la subtribu Geoicina, mientras que *Aploneura lentisci* y *Baizongia pistaciae* fueron incluidas en la subtribu Baizongiina. La inclusión de estas dos especies en una misma subtribu no es congruente con los resultados obtenidos en este estudio. En los árboles filogenéticos obtenidos para los tres genes analizados las relaciones filogenéticas entre estos tres géneros se resolvieron siempre con una relación más estrecha entre las especies de los géneros *Baizongia* y *Geoica*. Los valores de bootstrap de esta relación fueron generalmente moderados, aunque llegaron a un 73% en la reconstrucción obtenida a partir del gen mitocondrial *atp6* (ver la figura 2.8). El empleo de las secuencias del gen nuclear *ef1 α* y del gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo oxidasa por parte de Zhang y Qiao (2007) dio lugar a resultados similares. En el árbol filogenético presentado por estos autores las especies *Baizongia pistaciae* y *Geoica wertheimae* mostraron una relación más estrecha, quedando *Aploneura lentisci* como especie hermana de las dos primeras. Los resultados obtenidos por Inbar *et al.* (2004) tras el análisis de los genes mitocondriales de las subunidades I y II de la citocromo oxidasa también fueron similares. Estos autores propusieron la existencia de un grupo en el que se incluían, entre otras, las especies de los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica* (con una relación más cercana entre los dos últimos) y otro en que aparecían los géneros *Forda* y *Paracletus*. La especie *S. betae* ocupó la posición basal en el árbol filogenético presentado por estos autores, hecho que les condujo a sugerir la creación de un nuevo grupo para incluir este género.

Como se ha comentado anteriormente, la posición de la especie *S. betae* resultó totalmente incongruente entre los resultados obtenidos a partir de las tres secuencias nucleotídicas empleadas en este estudio. Esta especie ocupó la posición basal del árbol de los Fordina en la reconstrucción obtenida a partir de la secuencia del gen *lwrh*, posición apoyada además por un valor muy elevado de bootstrap (98%; figura 2.7). Sin embargo, el análisis del gen *ef1 α* dio lugar a la agrupación de esta especie junto con el grupo formado por las especies de los géneros *Forda* y *Paracletus*, también con un apoyo estadístico muy alto (97%; figura 2.7). Por último, las reconstrucciones realizadas a partir del fragmento mitocondrial dieron lugar en general a la agrupación de *S. betae* junto las especies de los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica*, apoyada por un valor de 78% de bootstrap en la reconstrucción obtenida utilizando sólo la secuencia del gen *atp6* (ver figura 2.8). Algunas de las características de las tres secuencias analizadas pueden ser útiles para dar mayor o menor credibilidad a alguno de estos resultados. El análisis de la secuencia del gen *lwrh* en estas especies reveló un sesgo nucleotídico hacia un mayor contenido en G+C, así como tasas de sustitución aceleradas en algunas de las especies, entre las que se incluyó *S. betae*. Estas características pueden dar lugar a la aparición de resultados filogenéticos aberrantes, aunque la posición de *S. betae* en la filogenia obtenida a partir de este gen se vio apoyada por un valor de bootstrap realmente elevado. En el análisis del gen *atp6* no se observaron diferencias significativas en la composición nucleotídica, pero sí la existencia, de nuevo, de tasas de sustitución aceleradas en el grupo formado por las especies de los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica*. En el análisis del gen *ef1 α* , por el contrario, no se observó ni la existencia de sesgos en la composición nucleotídica ni la de tasas aceleradas de sustitución para ninguna de las especies estudiadas. Este hecho podría utilizarse como argumento para dar mayor credibilidad al resultado de la reconstrucción obtenida a partir de esta secuencia, en el que la especie *S. betae* se agrupó con los géneros *Forda* y *Paracletus*. Como se ha comentado anteriormente, este resultado coincidiría además con las clasificaciones basadas en caracteres morfológicos propuestas por Bodenheimer y Swirski (Bodenheimer y Swirski, 1957; Inbar *et al.*, 2004), Börner y Heinze (Börner y Heinze, 1957; Ilharco y van Harten, 1987) y Heie

(1980). Existe un rasgo muy importante compartido por *S. betae* y algunas de las especies del clado formado por los géneros *Forda* y *Paracletus*, que podría apoyar su inclusión en un mismo taxón. Las fundadoras de *S. betae* y de las especies del género *Forda* inducen en el hospedador primario la formación de una agalla temporal, previa a la agalla definitiva producida por sus hijas. Esta característica no aparece en ninguna otra especie de la subtribu Fordina. Queda por dilucidar, no obstante, si este rasgo es un carácter ancestral o derivado en la subtribu, lo cual puede ser determinante en la discusión sobre la posición filogenética de *S. betae*. El análisis de nuevos datos moleculares carentes de sesgos en composición o de diferencias en las tasas de sustitución nucleotídica entre las distintas especies puede ser de gran ayuda para la resolución de la posición filogenética de esta especie en la filogenia de la subtribu Fordina. Asimismo, sería interesante incluir en nuevos estudios moleculares algunas especies pertenecientes a esta subtribu no analizadas en este estudio, como las pertenecientes a los géneros *Asiphonella*, *Rectinasus* o *Slavum*, lo cual puede ser muy útil también para determinar la posición filogenética de *S. betae*.

Las agrupaciones descritas para las especies ibéricas de la tribu Fordini no muestran una clara correlación con la especialización de hospedador primario que presentan. Tal y como propusieron Inbar *et al.* (2004), el cambio de hospedador primario puede haber sido una fuerza conductora durante la evolución de este grupo. No obstante, teniendo en cuenta además que las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Pistacia* (y sus frecuentes híbridos) no se conocen con precisión (Parfitt y Badenes, 1997; Yi *et al.*, 2008), proponer un escenario evolutivo sobre cómo han ocurrido estos cambios de hospedador resultaría especulativo. A pesar de ello, los resultados filogenéticos presentados en este capítulo apoyan, al menos, la transferencia de hospedador primario en dos de las especies analizadas. La especie *F. riccobonii* tiene como hospedador primario *P. atlantica*, mientras que las otras dos especies estudiadas de este género, *F. formicaria* y *F. marginata*, viven sobre *P. terebinthus*. Por otro lado, *A. lentisci* es la única especie de su grupo que utiliza como hospedador primario *P. lentiscus* y no *P. terebinthus*, especie sobre la que se desarrollan *B. pistaciae* y las dos especies analizadas del género

Filogenia y taxonomía de la tribu Fordini

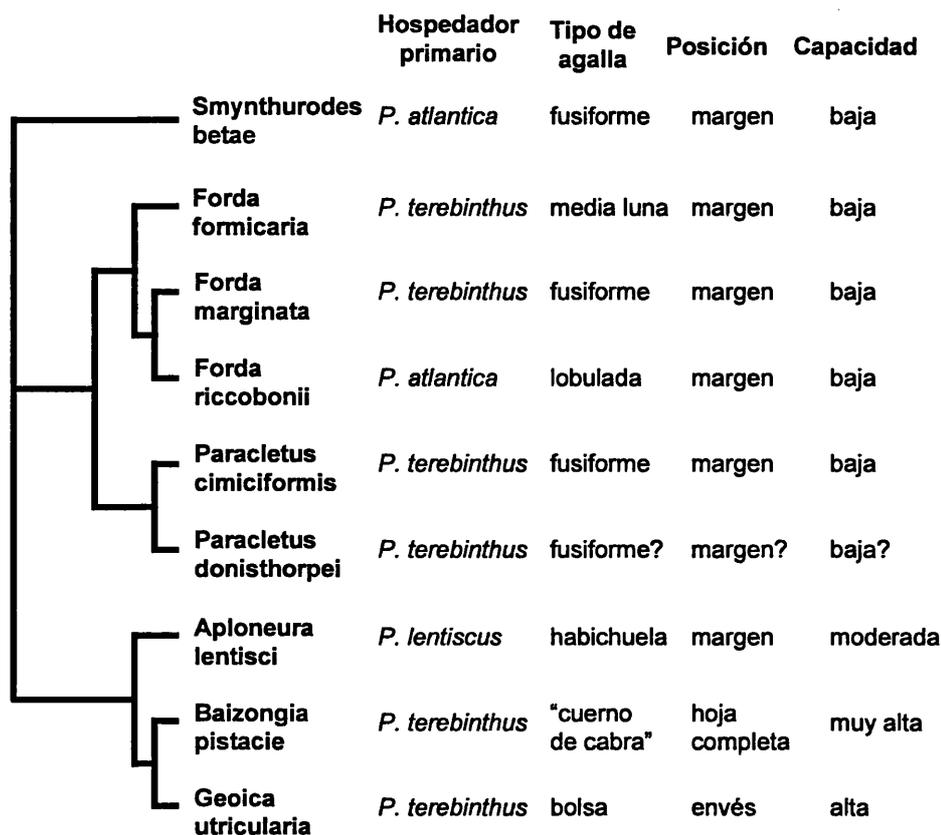


Figura 2.13. Hospedador primario y características de las agallas inducidas por las especies de pulgones de la tribu Fordini utilizadas en este estudio. Se muestra la topología obtenida en el análisis del gen *lwrh* y del fragmento mitocondrial, mostrando las relaciones entre los dos grupos descritos y la especie *Smynthurodes betae* como una tricotomía. Se indica la posición de la agalla inducida en el foliolo, salvo para *B. pistaciae* que ocupa la hoja entera. La capacidad de las agallas se clasifica en baja (menos de 100 pulgones por agalla), moderada (cientos de pulgones por agalla), alta (hasta 1000 pulgones) y muy alta (hasta 10000 pulgones por agalla). Información recopilada a partir de Pérez Hidalgo y Nieto Nafra, 2003 e Inbar *et al.*, 2004.

Geoica. Algunas características de las agallas, sin embargo, pueden correlacionarse fácilmente en el árbol filogenético de las especies de la subtribu Fordina, algo ya apuntado con anterioridad por Inbar *et al.* (2004) y Zhang y Qiao (2007) (figura 2.13). Por ejemplo, la capacidad de la agalla definitiva, un carácter fuertemente ligado a la morfología de la agalla y al éxito reproductivo de los pulgones (Inbar *et al.*, 2004), concuerda perfectamente con los resultados filogenéticos presentados. Los detalles concretos sobre cómo evolucionaron estos caracteres pueden verse afectados por la posición de S.

betae. Si esta especie forma realmente un grupo monofilético con las especies de los géneros *Forda* y *Paracletus*, como sugieren los resultados del presente estudio, la concordancia con las características de las agallas sería completa, ya que las especies de estos tres géneros inducen agallas marginales de baja capacidad (menos de 100 pulgones por agalla). Por su parte, las especies incluidas en el grupo formado por los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica* parecen haber evolucionado hacia la producción de agallas con mayor capacidad, desde moderada (unos 300 individuos por agalla en *A. lentisci*) a muy elevada (miles de pulgones por agalla en *B. pistaciae*).

5.2. Filogenia molecular y taxonomía de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus*

Los datos moleculares obtenidos para el análisis de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus* mostraron la existencia de dos grupos monofiléticos en los que se agruparon, respectivamente, las especies de cada uno de estos taxones (ver las figuras 2.7 a 2.12). Además, las reconstrucciones filogenéticas realizadas permiten apoyar la relación de géneros hermanos de estos dos taxones dentro de la tribu Fordini. Las tres secuencias utilizadas en este estudio apoyan esta relación con mayor o menor grado de confianza estadística. Por otro lado, las distancias genéticas medias estimadas para las secuencias entre ambos géneros son bastante bajas (0'033 para el gen *lwrh*, 0'046 para el gen *ef1 α* y 0'142 para el gen *atp6*) en comparación con las distancias existentes entre otros géneros próximos dentro de la familia Aphididae. No obstante, existen casos de géneros próximos con valores similares o incluso menores. Por ejemplo, la distancia para el gen *lwrh* es menor que 0'033 entre las especies *Chromaphis juglandicola* y *Panaphis juglandis*, *Pemphigus populi* y *Thecabius sp.*, y *Acyrtosiphon pisum* y *Megoura viciae* (distancias calculadas a partir de las secuencias obtenidas para estas especies en el capítulo 1). Asimismo, la distancia para el gen *atp6* es menor que 0'142 entre la mayoría de géneros de la subfamilia Aphidinae analizados en el capítulo 1, así como entre *Chromaphis juglandicola* y *Panaphis juglandis*, y *Eulachnus sp.* y *Schizolachnus pineti*. Por último, la distancia genética

estimada en este capítulo para las secuencias del gen *ef1 α* entre las especies *Forda marginata* y *Paracletus cimiciformis* (0'046) es mayor que varias de las distancias para la misma secuencia entre los géneros de Aphidinae utilizados en el capítulo 1. Este valor es mayor, además, que las distancias para este gen, obtenidas en el Capítulo 1, entre las especies *Chromaphis juglandicola* y *Panaphis juglandis*, *Protrama flavescens* y *Trama rara*, *Essigella fusca* y *Eulachnus rileyi*, *Nipponaphis distyliicola* y *Sinonipponaphis monzeni*, *Pemphigus populi* y *Thecabius sp.*, y *Geoica utricularia* y *Aploneura lentisci*. Por ello, tanto la separación de los géneros *Forda* y *Paracletus* en las reconstrucciones como la comparación de las distancias genéticas existentes entre ellos con las correspondientes a otros géneros cercanos apoyan su separación como géneros diferentes.

Existen citas de la existencia de seis especies de pulgones del género *Forda* en la Península Ibérica y las Islas Canarias (Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003). Para algunas de ellas, sin embargo, las citas son muy escasas y en ocasiones dudosas, existiendo tres especies de abundancia considerable: *F. formicaria*, *F. marginata* y *F. riccobonii*. Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas en este capítulo apoyan una relación más estrecha entre las especies *F. marginata* y *F. riccobonii* (figuras 2.9 a 2.12). Este resultado es coherente con la elevada similitud morfológica que existe entre las distintas formas homólogas de sus ciclos, hecho que sugirió la agrupación de ambas en el grupo de especies "marginata" por Remaudière (1999). Este elevado grado de similitud condujo también a la hipótesis, planteada en este trabajo de tesis doctoral, de que ambos taxones sean en realidad una única especie, con diferencias en la forma de la agalla inducida en función de la especie vegetal que use como hospedador primario. La similitud entre las diversas formas es también elevada entre estas dos especies y *F. formicaria*, pero entre *F. marginata* y *F. riccobonii* el parecido llega hasta el punto de que las virginógenas ápteras, obtenidas a partir de experimentos de transferencia de ambas especies, son indistinguibles (Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003). La mayor proximidad filogenética entre *F. marginata* y *F. riccobonii* se ve también fuertemente apoyada por el hecho de que ambas comparten el mismo estado en la mayoría de los gaps hallados en los intrones del gen *lwrh*, siendo éste

diferente del estado presente en *F. formicaria*. De hecho, el empleo de los gaps en el análisis filogenético (ver figura 2.10) aumentó el apoyo estadístico de la asociación entre *F. marginata* y *F. riccobonii*. Es también destacable el hecho de que el uso exclusivamente de los exones del gen *lwrh* no permitió separar en dos grupos independientes las muestras de estas dos especies, pero sí permitió separarlas del clado de *F. formicaria* (ver figura 2.11). Esta circunstancia podría inicialmente sugerir la validez de la hipótesis de la sinonimia entre estos dos taxones. Sin embargo, las reconstrucciones obtenidas a partir del fragmento mitocondrial (figura 2.12) y del gen *lwrh* incluyendo sus intrones (figuras 2.9 y 2.10) no ofrecen lugar a dudas sobre la validez del estatus de especie de cada uno de ellos. Además, no se detectó a nivel molecular la existencia de híbridos entre estas dos especies. Los valores de bootstrap de los clados en los que se agruparon las muestras de cada una de las especies fueron en todas las reconstrucciones superiores al 95% (exceptuando los análisis de los exones de *lwrh*). Además, las longitudes de las ramas que preceden a cada una de las especies en los árboles obtenidos indican que la separación entre ambas especies no es muy reciente (con la misma excepción anterior). La distancia genética entre ambas para el gen *atp6* es de 0'1167, valor que supera incluso la distancia para esta misma secuencia entre *F. formicaria* y *F. riccobonii* (0'1038). La distancia entre *F. marginata* y *F. riccobonii* para los exones del gen *lwrh* es, sin embargo, muy pequeña (0'0051), incluso menor que la distancia entre los dos linajes hallados para el género *Paracletus* (0'0058). No obstante, pese a esta elevada similitud entre las regiones exónicas de ambas especies, el tiempo de separación entre ellas sí ha permitido acumular mayor divergencia en los intrones. La divergencia en los intrones sí supera la existente entre los intrones de los linajes de *Paracletus*, como puede observarse al comparar las longitudes de las ramas de estos clados en las reconstrucciones obtenidas considerando estas regiones (ver figura 2.10).

Los datos moleculares obtenidos no permiten dudar de la validez como especies de *F. marginata* y *F. riccobonii*, sino que afirman esta condición. No obstante, un estudio con mayor representación de muestras, provenientes de todo el rango geográfico de estas especies, sería útil para confirmar los

resultados obtenidos y para comprobar o descartar la existencia de hibridaciones entre ellas. Las muestras analizadas pertenecen, por tanto, a dos especies que inducen la formación de agallas diferentes en sus respectivos hospedadores primarios, filogenéticamente cercanos, abundando en la idea de que la morfología de las agallas depende fundamentalmente de la especie de pulgón que las induce, y en mucha menor medida de la planta donde son inducidas (Stern, 1995).

El análisis de las muestras pertenecientes a las especies ibéricas del género *Paracletus* dio lugar a resultados sorprendentes y muy relevantes para la taxonomía de este género. Las reconstrucciones obtenidas a partir del gen nuclear *lwrh* y el fragmento mitocondrial que contiene el gen *atp6* revelaron la existencia de dos linajes principales con un grado de divergencia genética considerable. Sin embargo, estos dos linajes no se correspondieron *a priori* con las dos especies analizadas, *P. cimiciformis* y *P. donisthorpei*. Todas las muestras correspondientes a *P. donisthorpei* se agruparon en el clado que se denominó linaje 1. Sin embargo, las muestras identificadas como *P. cimiciformis* se incluyeron en los dos linajes. La mayoría de muestras de esta especie se agrupó en el linaje 2, mientras que aproximadamente el 25% de ellas se agruparon en el linaje 1 junto a las muestras de *P. donisthorpei*. El número de muestras analizadas de esta última especie fue muy bajo, por lo que no puede descartarse completamente que nuevas muestras agrupasen también en el linaje 2. El bajo muestreo se debe, en principio, a la poca abundancia de esta especie y a que las formas descritas provienen del hospedador secundario, por lo que es difícil de encontrar y generalmente sólo se obtienen sexúparas que se cazan con trampas.

Los marcadores moleculares utilizados en el presente estudio no revelaron en el linaje 1 la existencia de una estructura interna destacable, pero sí lo hicieron en el linaje 2 (ver figuras 2.9 a 2.12). Este linaje se dividió en dos grupos en el análisis de las secuencias del gen *lwrh*, los cuales se denominaron clado 2.A y clado 2.B (figura 2.9). Esta subdivisión en dos cladogramas no apareció, sin embargo, en las reconstrucciones realizadas a partir del fragmento mitocondrial (figura 2.12). Además, es importante destacar que algunas de las posiciones variables de las secuencias del gen *lwrh* fueron

iguales entre las secuencias del clado 2.B y las correspondientes al linaje 1, y la situación en la secuencia de estas posiciones sugiere además la posibilidad de un suceso de recombinación. Estos resultados pueden explicarse como la consecuencia de una antigua hibridación entre los linajes 1 y 2 por medio del cruce entre un macho del linaje 1 y una hembra del linaje 2. Este cruce daría lugar a una descendencia con un genoma mitocondrial único, perteneciente al linaje 2, que sería coherente con la falta de mayor estructura en el linaje 2 resultante en el análisis del fragmento mitocondrial (ver figura 2.12). En el genoma nuclear, sin embargo, la descendencia presentaría un alelo de cada linaje. La recombinación entre estos alelos y una posterior divergencia podrían explicar la existencia de las secuencias del clado 2.B, que muestran posiciones específicas tanto del linaje 1 como del linaje 2, además de algunas posiciones variables propias (ver alineamiento 20 del Anexo I en CD adjunto).

La existencia de hibridación reciente entre los linajes 1 y 2 se demostró, además, tras el análisis de las muestras *P. cimiciformis* Por9997 y *P. cimiciformis* Val1004. Ambas muestras resultaron ser heterocigotas para el gen nuclear, presentando secuencias del gen *lwrh* pertenecientes a ambos linajes (ver la figura 2.9). Sin embargo, sus secuencias mitocondriales agruparon en sólo uno de los dos linajes: la secuencia de *P. cimiciformis* Por9997 en el linaje 2 y la correspondiente a *P. cimiciformis* Val1004 en el linaje 1 (ver la figura 2.12). De nuevo, la existencia de la muestra *P. cimiciformis* Por9997 apunta a la hibridación, ocurrida quizá hace pocas generaciones, entre un macho del linaje 1 y una hembra del linaje 2, cuya descendencia poseería secuencias mitocondriales pertenecientes únicamente al linaje 2 pero secuencias nucleares de ambos linajes, como ocurre en esta muestra. Por su parte, la muestra *P. cimiciformis* Val1004 implicaría una hibridación ocurrida entre un macho perteneciente al linaje 2 y una hembra del linaje 1, la cual dejaría una descendencia híbrida para el genoma nuclear, pero con secuencias correspondientes al linaje 1 en el genoma mitocondrial, como es el caso de esta muestra. La figura 2.14 ilustra la posible introgresión de secuencias nucleares entre linajes por medio de machos, que daría lugar a la situación observada.

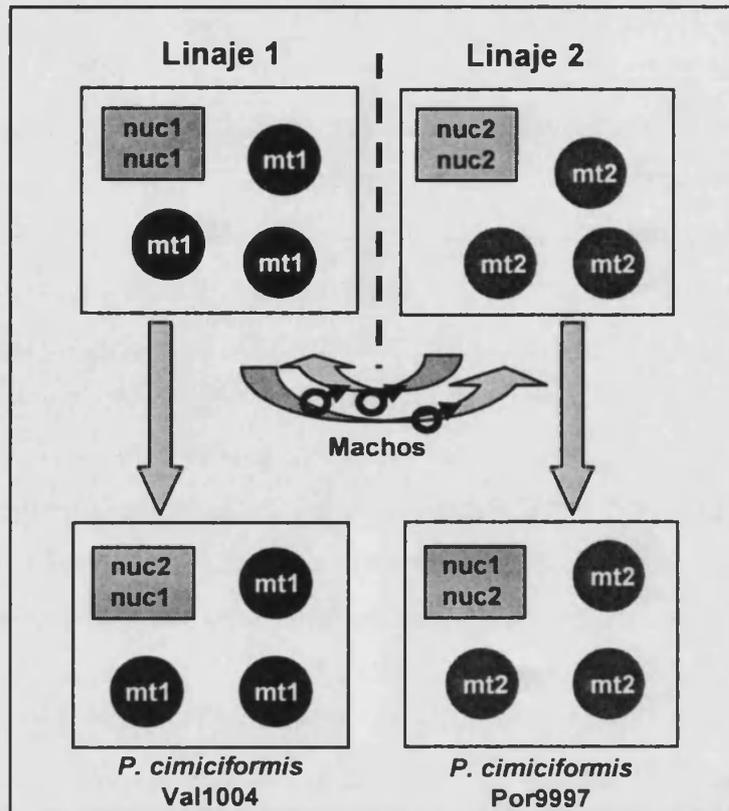


Figura 2.14. Esquema de una posible introgresión de genes nucleares entre linajes en el género *Paracletus*, que explicaría la aparición de híbridos como los detectados en las muestras Por9997 y Val1004. Abreviaturas: nuc1 y nuc2, alelos nucleares de los linajes 1 y 2, respectivamente; mt1 y mt2, alelos mitocondriales de los linajes 1 y 2, respectivamente.

Por último, tanto con el marcador nuclear como con el mitocondrial se detectó la existencia de un pequeño grupo formado por todas las muestras de la especie *P. cimiciformis* recolectadas en la provincia de Burgos dentro del linaje 2 (ver las figuras 2.9 a 2.12). Este grupo podría representar una población con un pequeño grado de divergencia acumulada por aislamiento geográfico.

Las distancias genéticas calculadas entre los dos linajes hallados del género *Paracletus* sugieren que podrían realmente corresponder a dos especies. La distancia obtenida entre los dos linajes para la región codificante del gen nuclear *lwrh* (0'0058; ver tabla 2.5) es ligeramente superior a la calculada para la misma región entre las especies *F. marginata* y *F. riccobonii* (0'0051). Por el contrario, la distancia para el gen mitocondrial *atp6* entre los dos linajes de *Paracletus* (0'0447) es bastante menor que la existente para el mismo gen entre las dos especies mencionadas del género *Forda* (0'1167). No

obstante, este valor de divergencia entre los dos linajes de *Paracletus* (0'0447) es de una magnitud similar a la hallada para otra secuencia mitocondrial, el gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa, entre las especies *Hyalopterus pruni* y *H. amygdali* (subfamilia Aphidinae) (Lozier *et al.*, 2007). Cabe destacar que estas dos especies son prácticamente indistinguibles morfológicamente, y su distinción se realiza en función del hospedador primario sobre el que viven, una situación que podría ser muy similar en los dos linajes detectados del género *Paracletus*. Por otro lado, el valor de divergencia de 0'0447 entre estos dos linajes es superior al que existe entre los linajes holocíclicos y anholocíclicos de la especie *Rhopalosiphum padi* (subfamilia Aphidinae) para la misma secuencia (0'015; David Martínez Torres, comunicación personal).

En este contexto, una explicación de los resultados obtenidos para las muestras del género *Paracletus* sería que el linaje 2 correspondiera con lo que se conoce como *P. cemiciformis* y el linaje 1 con lo que se conoce como *P. donisthorpei*. Esta hipótesis implicaría aceptar que existe un cierto grado de confusión en el conocimiento de la biología de estas dos especies, y que las descripciones y los caracteres diagnóstico utilizados para distinguirlos no son del todo correctos, lo que conduciría a una identificación incorrecta de algunas de las muestras. Por ejemplo, aunque no se conocen las agallas de *P. donisthorpei*, su forma sexúpara está bien descrita (Blackman y Eastop, 1994; Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003). Las secuencias obtenidas a partir de las formas sexúparas de esta especie en el presente estudio han agrupado en el linaje 1 junto con otras secuencias totalmente idénticas obtenidas a partir de formas gallícolas identificadas como *P. cemiciformis*. A la luz de este resultado, esto podría interpretarse como que las sexúparas de *P. donisthorpei* son realmente capaces de dar lugar en el hospedador primario a los individuos sexuales y éstos pueden reproducirse en el hospedador primario. Del huevo resultante podría entonces nacer una fundadora que sería capaz de inducir la formación de una agalla y por tanto de completar el ciclo de esta especie. Esta agalla sería morfológicamente muy similar a la inducida por la especie *P. cemiciformis*. Consecuentemente, la identificación automática como *P. cemiciformis* de las formas obtenidas a partir de agallas verdes y aplanadas recogidas en *Pistacia terebinthus* podría no ser siempre correcta. El hecho de

que la especie *P. donisthorpei* es menos abundante (Nieto Nafría y de Benito Dorrego, 1978; Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003) contribuiría a minimizar la identificación incorrecta en función de la morfología de la agalla, y explicaría también por qué un menor número de muestras de *P. cimiciformis* se agruparon en el linaje 1 (aproximadamente un 25%). Cabe destacar que todas las muestras analizadas que podrían haber estado mal identificadas provienen directa o indirectamente de formas extraídas de las agallas, bien fundatrígenas, bien virginógenas provenientes de experimentos de transferencia. Sin embargo, las muestras identificadas como *P. donisthorpei* corresponden siempre a formas sexúparas, cuya distinción de las formas homólogas de *P. cimiciformis* parece bien establecida (Pérez Hidalgo y Nieto Nafría, 2003). Pese a que la morfología de la agalla es generalmente muy característica en cada especie gallígena de pulgón, existen algunas especies próximas que producen agallas indistinguibles, como ocurre por ejemplo entre las especies *Geoica utricularia* y *G. setulosa* (Pérez Hidalgo *et al.*, 2007).

Una explicación alternativa implicaría aceptar que los dos linajes hallados en el análisis de las muestras de las especies ibéricas del género *Paracletus* pertenecen en realidad a una sola especie. En este contexto, dado que el linaje 1 está formado por un número menor de secuencias y además menos diversas que las agrupadas en el linaje 2, el linaje 1 podría haberse introducido recientemente en la Península Ibérica o representar un linaje parcialmente anholocíclico. Esta falta de diversidad se observó anteriormente en los linajes anholocíclicos de *R. padi* (Simon *et al.*, 1996). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la divergencia genética entre los dos linajes hallados en las muestras de las especies del género *Paracletus* es mucho mayor que la existente, por ejemplo, entre los linajes holocíclicos y anholocíclicos de *R. padi*. Otra explicación para la existencia de los dos linajes podría ser la diferenciación por motivos de aislamiento geográfico. No obstante, las muestras procedentes de cada una de las distintas regiones se han agrupado por igual en ambos linajes (ver figuras 2.9 a 2.12). La divergencia o especiación por una alocronía resultante del ciclo bianual también es descartable, ya que en ambos linajes se agruparon muestras de formas fundatrígenas obtenidas tanto en años pares como impares. No obstante, sería interesante realizar un estudio

enfocado a este aspecto con el objetivo de determinar la influencia de los ciclos bianuales en la composición de las poblaciones existentes en cada año.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la necesidad de una revisión de la taxonomía del género *Paracletus*. Esta circunstancia se ve apoyada además por algunos resultados de los experimentos de transferencia realizados por Nicolás Pérez Hidalgo, de la Universidad de León, que han sido parte de una colaboración para el desarrollo de este estudio. Los experimentos de transferencia realizados a partir de las fundatrigenas obtenidas de agallas identificadas como pertenecientes a la especie *P. cimiciformis* han dado lugar a resultados sorprendentes. En estos experimentos se produjeron dos tipos diferentes de virginógenas ápteras en la descendencia de las fundatrigenas. La forma mayoritaria, y que fue siempre la primera en aparecer en cada transferencia, presentó un cuerpo redondeado, 5 artejos antenales, tibias posteriores rectas, ojos compuestos formados únicamente por el triomatidio y la coxa del tercer par de patas relativamente más corta. Esta forma no coincide con la forma clásicamente descrita como virginógena áptera de *P. cimiciformis*. Por el contrario, estas características, así como una serie de medidas morfométricas de esta forma, coinciden con las características descritas para la especie *F. rotunda* (Nicolás Pérez Hidalgo, comunicación personal). Estos resultados, por tanto, implican que *F. rotunda* debe ser considerado como un nuevo sinónimo de la especie *P. cimiciformis*. En algunos experimentos de transferencia (por ejemplo, el correspondiente a la muestra Le5062) apareció posteriormente otra forma de virginógena áptera, con un cuerpo aplanado, 6 artejos antenales, tibias posteriores curvadas, ojos compuestos formados por un triomatidio y varios ocelos y la forma de la coxa del tercer par de patas relativamente más alargada. Esta forma sí coincide con la forma clásicamente descrita como virginógena áptera de *P. cimiciformis*. Esta forma dio lugar posteriormente tanto a la forma de 5 artejos antenales como a la forma de 6. Como se mencionó anteriormente (apartado 4.1), dado que ambas formas presentaron secuencias idénticas tanto para el gen *lwrt* como para el fragmento mitocondrial, se pudo descartar la posibilidad de contaminación por otra especie. Estos resultados confirmarían las sospechas de Roberti (1983; 1993), quien propuso que en la especie *P. cimiciformis*

existían dos formas, A y B, de virginógenas ápteras. Roberti ya sugirió que su forma A, coincidente con la primera forma aparecida en los experimentos de transferencia, era idéntica a *F. rotunda*. Asimismo, su forma B correspondía a la segunda forma descrita y a la que clásicamente se ha reconocido como verdadera virginógena áptera de *P. cimiciformis*. Queda por esclarecer si estas dos formas de virginógenas tienen alguna función particular en el ciclo de esta especie. Por otro lado, el hecho de que ambas formas de la especie *P. cimiciformis* presenten los dos estados de la forma de la coxa del tercer par de patas, utilizados como carácter diagnóstico para diferenciar las especies de los género *Forda* y *Paracletus* (ver Introducción), invalida este carácter para tal fin.

Son necesarios nuevos estudios y experimentos para comprobar definitivamente si los dos linajes hallados en el análisis de las muestras ibéricas del género *Paracletus* corresponden o no a dos especies distintas. Por un lado, se requieren nuevos experimentos de transferencia a partir de un amplio muestreo de agallas, paralelos a un análisis molecular de las muestras, para el estudio de las virginógenas resultantes y la búsqueda de caracteres morfológicos que sirvan para distinguir a los individuos de cada linaje (o especie). Estos estudios podrían también permitir detectar diferencias en la morfología de las agallas pertenecientes a cada linaje. Además, sería de gran interés plantear experimentos destinados a inducir la aparición de la fase sexual a partir de las virginógenas de estos linajes, a partir de los cuales podría estudiarse la forma sexúpara (aparentemente bien diferenciada entre *P. cimiciformis* y *P. donisthorpei*), así como la posibilidad de la inducción de la formación de la agalla por las formas fundadoras. Se trate o no de dos especies, los datos moleculares han revelado la existencia de hibridación entre ambos linajes, en la actualidad y posiblemente en el pasado. Un muestreo más amplio podría permitir determinar cual es nivel de real de flujo genético entre estos dos grupos.

DISCUSIÓN GENERAL

La utilidad de las herramientas filogenético-moleculares para el estudio de la biología de los pulgones

La reconstrucción filogenética basada en datos moleculares tiene una aplicación muy especial en el estudio de la biología y la taxonomía de los pulgones. La elevada diferenciación morfológica de las distintas formas o morfos existentes en los ciclos biológicos de algunas especies de áfidos hace muy difícil la clasificación de todas estas formas como pertenecientes a una misma especie. Este elevado polifenismo ha conducido a la existencia de un gran número de sinonimias, al haberse clasificado como especies diferentes lo que, en realidad, son formas distintas de la misma especie. La obtención de secuencias de DNA de las distintas formas, y su uso en la reconstrucción filogenética molecular, pueden permitir comprobar su pertenencia o no a una misma especie. Este hecho fue ya demostrado en varios estudios por Stern mediante la secuenciación de un fragmento corto del gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo oxidasa, que permitió comprobar la existencia de sinonimias y el cierre de varios ciclos en especies de pulgones de la tribu Cerataphidini (Stern, 1994; Stern, 1995; Stern y Foster, 1996; Stern *et al.*, 1997; Stern, 1998). Tras estos primeros estudios, la inferencia filogenética a partir de datos moleculares se ha empleado para estudiar aspectos variados de la biología de los pulgones. Algunos de estos aspectos, ya mencionados en la Introducción del Capítulo 1 de esta tesis doctoral, incluyen la radiación adaptativa del género *Uroleucon* (Moran *et al.*, 1999), el inquilinismo de agalla en el género *Tamalia* (Miller III y Crespi, 2003), la especiación alocrónica en el género *Pemphigus* (Abbot y Withgott, 2004) o la biogeografía de la tribu Hormaphidini (von Dohlen *et al.*, 2002). Con anterioridad al presente trabajo, se realizaron también dos estudios que abordaron las relaciones filogenéticas generales en la familia Aphididae, ambos basados en secuencias mitocondriales (von Dohlen y Moran, 2000; Martínez-Torres *et al.*, 2001).

En el presente estudio se han empleado secuencias de DNA de pulgones para la reconstrucción filogenética en varios niveles taxonómicos de la familia Aphididae. Estos datos moleculares provinieron de dos secuencias nucleares, el gen de la opsina sensible a longitud de onda larga (*lwrh*) y el gen del factor

Discusión general

de elongación de la traducción 1 α (*ef1 α*), y de dos secuencias mitocondriales, el gen de la subunidad 6 de la ATPasa-F (*atp6*) y el gen de la subunidad II de la citocromo oxidasa (*coll*). Estas secuencias se han utilizado inicialmente para abordar la inferencia de la filogenia global de la familia Aphididae (Capítulo 1), pasando posteriormente al detalle de las relaciones filogenéticas en uno de sus grupos, la tribu Fordini (Capítulo 2), y terminando con un análisis a nivel inter e intraespecífico de los géneros *Forda* y *Paraclotus* (Capítulo 2). Los resultados obtenidos a partir del análisis de estos datos moleculares han demostrado su utilidad para resolver cuestiones fundamentales sobre la filogenia y la taxonomía de los pulgones.

La falta de estructura para los nodos más antiguos de la filogenia de la familia Aphididae, detectada en los primeros estudios moleculares (von Dohlen y Moran, 2000; Martínez-Torres *et al.*, 2001), se observó también en varios de los análisis independientes de los genes empleados en el primer capítulo del presente trabajo. La rápida radiación adaptativa ocurrida en el origen de la diversidad actual de este grupo de insectos es probablemente una de las causas de la dificultad a la hora de resolver sus relaciones filogenéticas más antiguas. No obstante, esta incapacidad de resolución de los análisis independientes puede deberse también, en parte, a las tasas de sustitución nucleotídica particulares de los genes utilizados. Por ejemplo, los análisis realizados a partir de las secuencias mitocondriales de los genes *atp6* y *coll* se caracterizaron por el bajo número de taxones de pulgones que recibieron un apoyo estadístico alto. Las elevadas tasas de sustitución que caracterizan, en general, a las secuencias mitocondriales pueden hacer que éstas no sean ideales para resolver relaciones tan antiguas. Este mismo problema pudo ser responsable, en parte, de la falta de estructura a nivel profundo de los estudios previos, también basados en secuencias mitocondriales. Sin embargo, las secuencias del gen nuclear *lwrh* dieron lugar en el presente trabajo a reconstrucciones filogenéticas en las que aparecieron apoyos elevados para algunas relaciones entre subfamilias de pulgones. En particular, y principalmente cuando la especie externa no se incluyó en los análisis, las secuencias de este gen apoyaron la existencia de tres grandes linajes en los que se agruparon las subfamilias analizadas. El primer linaje se denominó en

este estudio **A+D**, y quedó formado por las especies pertenecientes a las subfamilias Aphidinae, Calaphidinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae y Pterocommatinae. En el segundo linaje, que se denominó **E+T**, se incluyeron los representantes de las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae, Hormaphidinae, Mindarinae y Thelaxinae. El tercer gran linaje, que se denominó en este trabajo como **L**, quedó formado únicamente por las especies de la subfamilia Lachninae. Este resultado supone un avance muy importante en el conocimiento de la filogenia de los pulgones respecto a los estudios previos basados en datos morfológicos y moleculares. Pese a la falta de resolución hallada en algunos de los análisis independientes, la combinación de los datos moleculares de los 4 genes apoyó, en general, las topologías resultantes del análisis del gen *lwrh*, dando un mayor apoyo estadístico a muchos de los nodos. El análisis combinado mostró otras relaciones importantes, también presentes en algunos análisis independientes, como la estrecha relación entre las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae, entre Chaitophorinae y Drepanosiphinae, o un clado formado por los representantes de las subfamilias Anoeciinae, Hormaphidinae y Thelaxinae. Además, en algunos de los análisis independientes, así como en el análisis combinado, las reconstrucciones realizadas apoyaron la posición basal de la subfamilia Lachninae en el árbol filogenético de los pulgones. El análisis combinado de secuencias, por tanto, puede ser muy útil para obtener en el futuro una filogenia robusta para la familia Aphididae, a pesar de los problemas en su inferencia que pueden derivarse de la rápida radiación adaptativa sufrida por este grupo a finales del periodo Cretácico.

Las secuencias de los genes nucleares *lwrh* y *ef1 α* y del gen mitocondrial *atp6* se emplearon en el Capítulo 2 para realizar un análisis con mayor profundidad de las relaciones entre los representantes ibéricos de uno de los grupos de pulgones incluidos en el primer capítulo, la tribu Fordini. En este análisis, y a diferencia de lo ocurrido en el Capítulo 1, los tres genes empleados demostraron su utilidad para resolver por separado las relaciones filogenéticas entre las especies de esta tribu, a pesar de las diferencias en sus respectivos niveles de conservación. Las reconstrucciones obtenidas a partir de cada uno de los genes apoyaron claramente la existencia de dos grupos en los que se

Discusión general

agruparon las especies analizadas. En el primero de los grupos se incluyeron las especies de los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica*, y en el segundo los géneros *Forda* y *Paracletus*. Sólo una de las especies analizadas, *Smynthurodes betae*, se situó en posiciones claramente discrepantes en los análisis de los distintos genes. No obstante, el análisis del gen *ef1 α* , que no presentó sesgos en su composición ni tasas de sustitución aceleradas en ningún grupo, apoyó la estrecha relación de esta especie con los géneros *Forda* y *Paracletus*. Este resultado discrepa con la posición basal de *S. betae* presente en el estudio previo de Inbar *et al.* (2004), que llevó a estos autores a proponer la creación de una nueva división para esta especie. Las relaciones filogenéticas halladas para las especies ibéricas de la tribu Fordini fueron, no obstante, concordantes en términos generales con los estudios previos basados en datos moleculares (Inbar *et al.*, 2004; Zhang y Qiao, 2007), así como con las clasificaciones basadas en caracteres morfológicos (Börner y Heinze, 1957; Bodenheimer y Swirski, 1957; Heie, 1980).

Por último, las secuencias de los genes *lwrh* y *atp6* se emplearon también en el Capítulo 2 para llevar a cabo un análisis con mayor detalle de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus*, ambos pertenecientes a la tribu Fordini. Los dos genes demostraron una gran utilidad para la resolución de las relaciones filogenéticas en este nivel taxonómico, probando la validez taxonómica de las especies *F. marginata* y *F. riccobonii* y mostrando, por el contrario, la necesidad de una revisión taxonómica del género *Paracletus*. Tanto a partir del gen nuclear como del fragmento mitocondrial, las reconstrucciones obtenidas mostraron la existencia de dos linajes en las muestras de este género que, sin embargo, no se correspondían *a priori* con las especies analizadas, *P. cimiciformis* y *P. donisthorpei*. Las secuencias mitocondriales, con tasas de evolución generalmente elevadas, son frecuentemente utilizadas con éxito en estudios realizados en los niveles taxonómicos inter e intraespecíficos, tal y como ha ocurrido en esta ocasión con el empleo del fragmento mitocondrial que contiene el gen *atp6*.

Las secuencias de los genes *ef1 α* , *atp6* y *coll* habían sido utilizadas con anterioridad a esta tesis doctoral en varios estudios filogenéticos de pulgones (Normark, 2000; Martínez-Torres *et al.*, 2001; von Dohlen *et al.*, 2002; von

Dohlen *et al.*, 2006). En este estudio, la secuenciación de estos genes en nuevas especies, y la recopilación de las secuencias obtenidas en trabajos anteriores, han demostrado su utilidad en la reconstrucción filogenética en distintos niveles taxonómicos de la familia Aphididae, bien en los análisis independientes o bien en los análisis combinados. El presente estudio es, por otro lado, el primero en el que se emplean secuencias correspondientes al gen *lwrh* para la inferencia filogenética en especies de pulgones. La utilización de este gen para la reconstrucción filogenética en la subfamilia Apinae (Mardulyn y Cameron, 1999) llevó a los autores de este estudio a calificarlo de prometedor para la filogenética en niveles taxonómicos elevados. En esta tesis doctoral se ha mostrado que este gen puede ser, en realidad, muy útil en rangos evolutivos muy distintos. Las posiciones de codón primera y segunda del gen, e incluso la tercera, han demostrado ser útiles para resolver relaciones filogenéticas de nodos tan antiguos como los que relacionan los grupos principales de pulgones, los cuales datan del Cretácico Superior. La secuencia codificante de este gen ha permitido, además, realizar avances en el conocimiento de la filogenia global de la familia Aphididae allí donde otros genes, nucleares y mitocondriales, no han permitido obtener una estructura filogenética estadísticamente apoyada. Por otro lado, las secuencias correspondientes a los exones del gen *lwrh*, principalmente las terceras posiciones de codón, también dieron lugar a resultados robustos en el análisis de las relaciones filogenéticas entre especies de la tribu Fordini. Finalmente, también las secuencias de los intrones de este gen son útiles para la inferencia filogenética en niveles menores, hecho que ya fue demostrado previamente en el estudio de las relaciones entre especies de lepidópteros del género *Heliconius* (Hsu *et al.*, 2001). En el presente estudio las secuencias de los intrones del gen *lwrh* han permitido obtener reconstrucciones filogenéticas con un elevado nivel de apoyo estadístico para los nodos en el estudio de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus*.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden ser tomados como punto de partida para nuevas investigaciones sobre la filogenia, la biología y la sistemática de los pulgones en distintos niveles taxonómicos. En el primer capítulo de esta tesis doctoral se ha demostrado que, pese a la falta de resolución de los estudios previos, debería ser posible recopilar suficiente información a partir de datos moleculares para la obtención de una filogenia robusta de la familia Aphididae. Una primera aproximación podría consistir en completar la secuenciación de los 4 genes empleados en este estudio, que han demostrado ser de gran utilidad en el análisis combinado, para todas las especies analizadas. La obtención de datos moleculares a partir de nuevos genes con un nivel de conservación elevado sería también interesante. Algunas secuencias candidatas para este objetivo podrían ser, por ejemplo, alguno de los genes parálogos del gen *lwrh* o el gen que codifica la cadena pesada de la miosina tipo II, el cual ha demostrado su utilidad para la reconstrucción filogenética de los animales con simetría bilateral (Ruiz-Trillo *et al.*, 2002).

Otra aproximación al estudio de la filogenia de los pulgones consistiría en la adición de representantes de tribus y subfamilias no analizadas en el presente estudio. Por ejemplo, la reciente secuenciación del gen *ef1a* de la especie *Greenidea ficicola*, perteneciente a la subfamilia Greenideinae, apunta a su pertenencia al linaje denominado en este estudio como A+D. Una subfamilia muy interesante para incluir en futuros estudios sería la subfamilia Neophyllaphidinae, la cual ha sido considerada por algunos autores como probablemente basal en la filogenia de la familia Aphididae. Conocer la posición filogenética de esta subfamilia puede ser muy importante para el estudio de la evolución de la alimentación en los pulgones, dada su primitiva asociación con plantas gimnospermas. Su inclusión en los estudios filogenéticos sería también útil para averiguar si la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie (1980), taxón en el que estaba incluido esta subfamilia en la clasificación de este autor, es realmente un grupo monofilético. La familia Drepanosiphidae *sensu* Heie se divide en la clasificación empleada en el presente estudio (Remaudière y Stroyan, 1984; Remaudière y Quednau, 1988; Quednau y Remaudière, 1994) en 14 taxones de rango subfamilia. Tres de

ellas estuvieron representadas en las reconstrucciones obtenidas en el Capítulo 1 (Calaphidinae, Chaitophorinae y Drepanosiphinae), en algunas de las cuales se apoyó su agrupación en un clado monofilético. No obstante, sería interesante incluir nuevas especies no sólo de la subfamilia Neophyllaphidinae, sino también de las otras 10 subfamilias restantes, para poder determinar definitivamente la posible monofilia de la familia Drepanosiphidae *sensu* Heie. La aplicación de las herramientas filogenéticas sobre datos moleculares puede ser de gran utilidad para ayudar también en otras discrepancias entre clasificaciones de pulgones. Por ejemplo, los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta tesis doctoral han apoyado una estrecha relación entre las subfamilias Aphidinae y Pterocommatinae, hecho que puede utilizarse como argumento para incluir ambas, de nuevo, en un único taxón, como ocurría en clasificaciones anteriores. Por último, sería interesante también poder incluir algún representante de la subfamilia Phloeomyzinae, con el objetivo de conocer su posición filogenética en el árbol de la familia Aphididae. La posición de esta subfamilia no quedó resuelta en la filogenia propuesta por Heie (1987), aunque Wojciechowski (1992) la agrupó junto a la subfamilia Thelaxinae. En general, la inclusión de nuevos grupos puede resultar muy útil, ya que se ha demostrado que la mejora del muestreo puede ayudar a aumentar el apoyo estadístico de nodos previamente no resueltos (Chang y Campbell, 2000).

La obtención de una filogenia robusta para la familia Aphididae debería considerarse como objetivo para futuras investigaciones, dada su relevancia para el estudio de características fundamentales de los pulgones como la evolución de sus ciclos biológicos y su alimentación o su asociación simbiótica con microorganismos. Por ejemplo, la comparación de la filogenia de los pulgones con la de su endosimbionte primario, *Buchnera aphidicola*, es clave para comprobar la hipótesis de la estricta coevolución entre ambos organismos. Los primeros estudios sobre la filogenia de esta bacteria y el modo estricto en que se hereda de madres a hijas dan apoyo a esta hipótesis (Moran *et al.*, 1993; Moran *et al.*, 1994; Moran *et al.*, 1995). No obstante, no existe aún una filogenia de *Buchnera* que contenga a la vez un buen muestreo de las distintas cepas de esta bacteria en las diferentes subfamilias de pulgones y un apoyo estadístico elevado para los nodos más profundos. Sería deseable, por tanto,

Discusión general

conseguir una filogenia robusta y global de *Buchnera* que permitiera su comparación con los resultados obtenidos en este estudio para la filogenia de sus hospedadores y poder ratificar así la hipótesis de la estricta coevolución.

El estudio de las relaciones filogenéticas en la tribu Fordini, abordado en el segundo capítulo del presente estudio, podría beneficiarse también tanto de la adición de nuevos datos moleculares como de nuevas especies. En particular, la obtención de secuencias de genes sin sesgos en la composición nucleotídica ni diferencias en las tasas de sustitución relativas sería de gran ayuda, especialmente para determinar la verdadera posición filogenética de la especie *Smynthuroides betae*. El estudio se vería reforzado, asimismo, mediante la inclusión de algunas especies que, debido a su escasa presencia en la Península Ibérica, no pudieron incluirse, como *Rectinasus buxtoni* o algunas especies del género *Forda*. Asimismo, el estudio podría adquirir un valor más general mediante la inclusión de especies no presentes en la zona geográfica estudiada, y, en particular, extendiéndolo a la otra subtribu de Fordini, la subtribu Melaphidina. La obtención de secuencias de DNA del endosimbionte primario de los pulgones puede tener también utilidad para corroborar las relaciones filogenéticas mostradas en el segundo capítulo del presente estudio. La concordancia entre las filogenias de las especies de la tribu Fordini y sus respectivos endosimbiontes primarios podría confirmar, asimismo, la existencia de la coevolución de ambos organismos a una menor escala evolutiva. El conocimiento preciso de las relaciones entre las especies de la tribu Fordini es fundamental para los estudios acerca de la evolución de las agallas y de las posibles transferencias ocurridas entre hospedadores primarios.

La adición de nuevas muestras y especies sería útil también para corroborar los resultados obtenidos en el análisis detallado de los géneros *Forda* y *Paracletus*. Un mayor muestreo de las especies *F. marginata* y *F. riccobonii* podría confirmar la validez de estas especies en todo su rango geográfico. En el caso de las especies del género *Paracletus*, los resultados obtenidos en este estudio podrían reforzarse mediante la inclusión de nuevas muestras de *P. donisthorpei*, la ampliación del rango geográfico de muestreo y la inclusión de las otras dos especies del género, *P. bykovi* y *P. subnudus*, no presentes en la Península Ibérica. En el presente estudio se ha planteado la

hipótesis de que los dos linajes hallados para las especies ibéricas de este género podrían corresponder realmente a las especies *P. cimiciformis* y *P. donisthorpei*. Esto implica el reconocimiento de la existencia de problemas en la identificación de estas especies mediante los criterios actuales, basados en gran medida en la morfología de la agalla. Esta hipótesis podría comprobarse mediante nuevos estudios en los que se incluyera un amplio muestreo de agallas seguido del análisis morfológico y molecular tanto de las fundatrigenas como de las virginógenas resultantes de los experimentos de transferencia. Por otro lado, los estudios podrían completarse mediante la inducción de la fase sexual a partir de las virginógenas. El éxito en la inducción daría lugar a la aparición de la forma sexúpara, la cual parece estar bien diferenciada entre las especies *P. cimiciformis* y *P. donisthorpei*. La obtención experimental de la sexúpara, por tanto, podría ser definitiva para determinar si las muestras del linaje 1 pertenecen a la especie *P. donisthorpei* y las muestras del linaje 2 a *P. cimiciformis*. Si este es el caso, podría entonces estudiarse en detalle las agallas de cada uno de los linajes, en busca de diferencias que permitiesen distinguir las correspondientes a cada especie. Esto permitiría, junto al análisis morfológico, definir nuevos criterios de identificación de estas especies. Por último, los experimentos de inducción podrían revelar detalles muy interesantes sobre las señales ambientales que provocan la aparición de la fase sexual en las especies de la tribu Fordini. La modificación del fotoperiodo y la temperatura podría no tener tanta influencia en este fenómeno como la tiene en general en las especies holocíclicas de la familia Aphididae. En su lugar, las formas virginógenas de estas especies podrían detectar los cambios estacionales a través de los cambios que ocurren en sus plantas hospedadoras.

Finalmente, sería interesante abordar el estudio de los problemas taxonómicos en los pulgones, de una manera similar a como se ha realizado en esta tesis doctoral en la tribu Fordini, a otros grupos de la familia Aphididae que presentan también este tipo de dificultades. Las secuencias de los genes empleados en el presente estudio podrían ser útiles para resolver los problemas taxonómicos existentes, por ejemplo, en los géneros *Anoecia* (subfamilia Anoeciinae) o *Aphis* (subfamilia Aphidinae).

CONCLUSIONES

1. Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas en el análisis de las secuencias de los genes nucleares de la opsina de longitud de onda larga (*lwrh*) y el factor de elongación de la traducción 1 α (*ef1 α*) y los genes mitocondriales de la subunidad 6 de la ATPasa-F (*atp6*) y la subunidad II de la citocromo oxidasa (*coll*) dieron lugar a la agrupación de las especies analizadas de la familia Aphididae en sus respectivas tribus de acuerdo con las clasificaciones. Las topologías apoyaron, además, la monofilia de las subfamilias Aphidinae, Calaphidinae, Hormaphidinae y Lachninae, pero no la de la subfamilia Eriosomatinae. Por otro lado, las reconstrucciones también apoyaron fuertemente algunas relaciones entre subfamilias, como la estrecha relación entre Aphidinae y Pterocommatinae, entre Chaitophorinae y Drepanosiphinae y un clado formado por las subfamilias Anoeciinae, Hormaphidinae y Thelaxinae.
2. Los análisis independientes de varias de las secuencias utilizadas en el Capítulo 1 mostraron una elevada falta de estructura filogenética en los nodos más antiguos. Las topologías obtenidas tanto en los análisis independientes como en los combinados mostraron en general longitudes de ramas más cortas en los niveles más profundos que en los más externos. Estos resultados son coherentes con la hipótesis de la existencia de una rápida radiación adaptativa al nivel de tribu en la familia Aphididae, ocurrida probablemente en el Cretácico Superior.
3. Los apoyos estadísticos para la agrupación de las especies en sus respectivas subfamilias y, sobre todo, tribus, fueron en general elevados en las reconstrucciones obtenidas a partir de los genes nucleares, pero menores en las correspondientes a los mitocondriales. Además, la secuencia correspondiente al gen *lwrh* demostró poseer un mayor poder de resolución filogenética que el resto de secuencias analizadas, particularmente para los nodos más profundos de la filogenia de los pulgones. Además, los resultados obtenidos en los análisis combinados del primer capítulo fueron similares a los obtenidos en el análisis independiente del gen *lwrh*, con un mayor apoyo gracias a la adición de las secuencias de los genes *ef1 α* , *atp6* y *coll*.

Conclusiones

4. Los datos moleculares obtenidos en las 11 subfamilias de pulgones analizadas sugieren la existencia de 3 grandes linajes en los que éstas pueden agruparse. El primer linaje, que se denominó en este estudio como **A+D**, incluiría los representantes de las subfamilias Aphidinae, Calaphidinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae y Pterocommatinae. El segundo linaje, que se denominó **E+T**, agruparía las especies de las subfamilias Anoeciinae, Eriosomatinae, Hormaphidinae, Mindarinae y Thelaxinae. El tercer linaje, que se denominó **L**, estaría formado por las especies de la subfamilia Lachninae
5. Las reconstrucciones filogenéticas realizadas apoyan, en general, que la subfamilia Lachninae ocupa la posición basal de la filogenia de la familia Aphididae. Esta posición es la causa principal de la discrepancia entre los resultados obtenidos y las filogenias basadas en caracteres morfológicos de Heie y Wojciechowski. A pesar de ello, los resultados son más concordantes con la propuesta del segundo autor.
6. Las topologías obtenidas para la filogenia de la familia Aphididae son coherentes con la hipótesis de que los ancestros de los pulgones desarrollaban un ciclo monoico sobre plantas gimnospermas. Además, apuntan hacia la existencia, para las subfamilias analizadas, de 3 transiciones independientes de la alimentación de gimnospermas a angiospermas (4 si se tiene en cuenta la subfamilia Neophyllaphidinae, no incluida en este estudio). Por otro lado, estas topologías sugieren la existencia de un máximo de 5 orígenes de la alternancia de hospedador, que podrían reducirse a sólo 2 en función de las verdaderas relaciones de algunos nodos que no pudieron resolverse en el presente estudio.
7. La comparación entre las filogenias obtenidas en estudios previos para *Buchnera* y las reconstrucciones realizadas en el presente trabajo para los pulgones no son discrepantes en las relaciones entre subfamilias, por lo que son coherentes con la hipótesis de la existencia de una única infección por parte de la bacteria en el ancestro de los pulgones y una estricta coevolución entre ambos. No obstante, la falta de resolución obtenida en los estudios previos sobre la filogenia de *Buchnera* impiden una comparación exhaustiva.

8. El análisis de las secuencias de los genes nucleares *lwrh* y *ef1 α* y del fragmento mitocondrial que contiene el gen *atp6*, obtenidas de las especies ibéricas de la tribu Fordini, apoyan la agrupación de éstas en dos grupos claros, formados por: i) los géneros *Aploneura*, *Baizongia* y *Geoica*; ii) los géneros *Forda* y *Paracletus*. La posición de la especie *Smynthuroides betae* fue discrepante entre los análisis de las tres secuencias, aunque el gen *ef1 α* sugiere su proximidad al grupo formado por los géneros *Forda* y *Paracletus*, concordando con algunas de las clasificaciones basadas en caracteres morfológicos.
9. Parece existir una correlación entre la filogenia de las especies ibéricas de la tribu Fordini y algunas características de las agallas que inducen sobre las distintas especies del género *Pistacia*. Las relaciones halladas sugieren que las agallas de este grupo han evolucionado hacia un mayor tamaño y un mayor número de pulgones albergados en ellas. Sin embargo, estas relaciones no presentan una concordancia con los distintos hospedadores vegetales, sugiriendo la existencia de varios cambios de hospedador durante la evolución del grupo.
10. Las reconstrucciones filogenéticas realizadas mediante el análisis de las secuencias del gen nuclear *lwrh* y el fragmento mitocondrial que contiene el gen *atp6*, obtenidas en las diversas muestras de las especies ibéricas de los géneros *Forda* y *Paracletus*, apoyan la validez taxonómica de ambos géneros, a la vez que muestran que se trata de géneros hermanos.
11. Los resultados apoyan la validez taxonómica de las especies *Forda marginata* y *Forda riccobonii*, a pesar de la elevada similitud morfológica que muestran varias de sus formas, rechazando la hipótesis de que ambas pertenezcan en realidad a una misma especie que induce agallas diferentes en función de la planta hospedadora sobre la que se desarrolle.
12. El análisis de las secuencias obtenidas en las muestras de las especies ibéricas del género *Paracletus* reveló la existencia de dos linajes principales, entre los que además existe hibridación. Los dos linajes, sin embargo, no se correspondieron *a priori* con las dos especies

Conclusiones

analizadas, *P. cimiciformis* y *P. donisthorpei*. Estos resultados indican la necesidad de una revisión de la taxonomía de este género.

13. La composición de los dos linajes obtenidos en las reconstrucciones filogenéticas del género *Paracletus* sugiere que realmente estos dos linajes se corresponden con las especies *P. cimiciformis* y *P. donisthorpei*. Esta hipótesis implicaría asumir que ambas especies presentan ciclos holocíclicos y que inducen la formación de agallas indistinguibles en *P. terebinthus*. Existirían por tanto problemas en los caracteres utilizados para distinguir estas dos especies; particularmente, la forma de la agalla no sería válida para identificarla como perteneciente a *P. cimiciformis*.
14. Las secuencias del gen *lwrh*, empleado por primera vez en este estudio para la reconstrucción filogenética en pulgones, han demostrado ser muy útiles para la resolución de las relaciones evolutivas en distintos niveles taxonómicos, desde el nivel intraespecífico hasta las relaciones entre subfamilias.

BIBLIOGRAFÍA

- Abascal, F., Zardoya, R., y Posada, D.** ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 21 (9): 2104-2105. 2005.
- Abbot, P. y Withgott, J.H.** Phylogenetic and molecular evidence for allochronic speciation in gall-forming aphids (*Pemphigus*). *Evolution Int. J. Org. Evolution*, 58 (3): 539-553. 2004.
- Baker, A.C.** Generic classification of the hemipterous family *Aphididae*. *Bull. U.S. Dept. Agr.*, 826: 1-109. 1920.
- Baker, R.H. y DeSalle, R.** Multiple sources of character information and the phylogeny of Hawaiian drosophilids. *Syst. Biol.*, 46 (4): 654-673. 1997.
- Baker, R.H., Wilkinson, G.S., y DeSalle, R.** Phylogenetic utility of different types of molecular data used to infer evolutionary relationships among stalk-eyed flies (Diopsidae). *Syst. Biol.*, 50 (1): 87-105. 2001.
- Baldauf, S.L., Palmer, J.D., y Doolittle, W.F.** The root of the universal tree and the origin of eukaryotes based on elongation factor phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93 (15): 7749-7754. 1996.
- Baumann, L. y Baumann, P.** Complete mitochondrial genome of *Daktulosphaira vitifoliae*. *Base de datos del EBI*. 2005.
- Baumann, L., Baumann, P., Moran, N.A., Sandstrom, J., y Thao, M.L.** Genetic characterization of plasmids containing genes encoding enzymes of leucine biosynthesis in endosymbionts (*Buchnera*) of aphids. *J. Mol. Evol.*, 48 (1): 77-85. 1999.
- Blackman, R.L.** Reproduction, Cytogenetics and Development. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier*. Amsterdam, 1987.
- Blackman, R.L. y Eastop, V.F.** Aphids on the World's trees: an identification and information guide. *CAB International*. Oxon, 1994.
- Blackman, R.L. y Eastop, V.F.** Aphids on the World's Crops. An identification guide. *Wiley*. Chichester, 2000.
- Blackman, R.L. y Eastop, V.F.** Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs. *Wiley*. Chichester, 2006.
- Bodenheimer, F.S. y Swirski, E.** The Aphidoidea of the Middle East. *The Weizmann Science Press*. Jerusalem, 1957.
- Börner, C.** Europae Centralis Aphides. *Mitteilungen der Thüringischen Botanischen Gessellschaft*, 4 (3): 1-484. 1952.
- Börner, C. y Heinze, K.** Aphidina-Aphidoidea. En: Handbuch der Pflanzenkrankheiten. P. Sorauer, ed. *Paul Parey*. Berlin, 1957.
- Bracho, A.M., Martínez-Torres, D., Moya, A., y Latorre, A.** Discovery and molecular characterization of a plasmid localized in *Buchnera* sp. bacterial endosymbiont of the aphid *Rhopalosiphum padi*. *J. Mol. Evol.*, 41 (1): 67-73. 1995.
- Brodie, P.B.** A history of the fossil insects in the secondary rocks of England. *J.v. Voorst*. London, 1845.
- Brynnel, E.U., Kurland, C.G., Moran, N.A., y Andersson, S.G.** Evolutionary rates for tuf genes in endosymbionts of aphids. *Mol. Biol. Evol.*, 15 (5): 574-582. 1998.
- Burset, M., Seledtsov, I.A., y Solovyev, V.V.** Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.*, 28 (21): 4364-4375. 2000.

Bibliografía

- Burset, M., Seledtsov, I.A., y Solovyev, V.V.** SpliceDB: database of canonical and non-canonical mammalian splice sites. *Nucleic Acids Res.*, 29 (1): 255-259. 2001.
- Campbell, B.C., Steffen-Campbell, J.D., Sorensen, J.T., y Gill, R.J.** Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S rDNA nucleotide sequences. *Systematic Entomology*, 20 (3): 175-194. 1995.
- Castresana, L.** Orden Homoptera. En: Entomología Agroforestal. De Liñán Vicente, C., ed. *Ediciones Agrotécnicas, S.L.* Madrid, 1998.
- Chang, B.S. y Campbell, D.L.** Bias in phylogenetic reconstruction of vertebrate rhodopsin sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 17 (8): 1220-1231. 2000.
- Chen, D.Q. y Purcell, A.H.** Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. *Curr. Microbiol.*, 34 (4): 220-225. 1997.
- Clements, K.M., Wiegmann, B.M., Sorenson, C.E., Smith, C.F., Neese, P.A., y Roe, R.M.** Genetic variation in the *Myzus persicae* complex (Homoptera: Aphididae): evidence for a single species. *Annals of the Entomological Society of America*, 93 (1): 31-46. 2000.
- Coeur d'acier, A., Jousselin, E., Martin, J.-F., y Rasplus, J.-Y.** Phylogeny of the Genus *Aphis* Linnaeus, 1758 (Homoptera: Aphididae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 42 (3): 598-611. 2006.
- Cortés, T., Tagu, D., Simon, J.C., Moya, A., y Martínez-Torres, D.** Sex versus parthenogenesis: A transcriptomic approach of photoperiod response in the model aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). *Gene*, 408 (1-2): 146-156. 2008.
- Darwin, C.R.** Instinct. En: El origen de las especies. *EDAF.* Madrid, 1859.
- Delmotte, F., Leterme, N., Bonhomme, J., Rispe, C., y Simon, J.C.** Multiple routes to asexuality in an aphid species. *Proc. Biol. Sci.*, 268: 2291-2299. 2001.
- Dixon, A.F.G.** Structure of aphid populations. *Annu. Rev. Entomol.*, 30: 155-174. 1985.
- Dixon, A.F.G.** Evolution and adaptive significance of cyclical parthenogenesis in aphids. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier.* Amsterdam, 1987a.
- Dixon, A.F.G.** Parthenogenetic reproduction and the rate of increase in aphids. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier.* Amsterdam, 1987b.
- Dixon, A.F.G.** The way of life of aphids: host specificity, speciation and distribution. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier.* Amsterdam, 1987c.
- Dixon, A.F.G.** Aphid Ecology. An Optimization Approach. *Chapman & Hall.* London, 1998.
- Eastop, V.F.** Worldwide importance of aphids as virus vectors. En: Aphids as virus vectors. Harris, K.F. y Maramorosch, K., eds. New York, San Francisco, London, 1977.
- Fares, M.A., Barrio, E., Sabater-Muñoz, B., y Moya, A.** The evolution of the heat-shock protein GroEL from *Buchnera*, the primary endosymbiont of aphids, is governed by positive selection. *Mol. Biol. Evol.*, 19 (7): 1162-1170. 2002.

- Fares, M.A., Moya, A., y Barrio, E. Adaptive evolution in GroEL from distantly related endosymbiotic bacteria of insects. *J. Evol. Biol.*, 18 (3): 651-660. 2005.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., y Bult, C. Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10: 315-319. 1995.
- Favret, C. y Voegtlin, D.J. Speciation by host-switching in pinyon *Cinara* (Insecta: Hemiptera: Aphididae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32 (1): 139-151. 2004.
- Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791. 1985.
- Forrest, J.M.S. Gallling aphids. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier*. Amsterdam, 1987.
- Fukatsu, T., Nikoh, N., Kawai, R., y Koga, R. The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (7): 2748-2758. 2000.
- Funk, D.J., Helbling, L., Wernegreen, J.J., y Moran, N.A. Intraspecific phylogenetic congruence among multiple symbiont genomes. *Proc. Biol. Sci.*, 267: 2517-2521. 2000.
- Gao, N., Foster, R.G., y Hardie, J. Two opsin genes from the vetch aphid, *Megoura viciae*. *Insect Mol. Biol.*, 9 (2): 197-202. 2000.
- Gil, R., Sabater-Muñoz, B., Latorre, A., Silva, F.J., y Moya, A. Extreme genome reduction in *Buchnera* spp.: toward the minimal genome needed for symbiotic life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99 (7): 4454-4458. 2002.
- Gil, R., Sabater-Muñoz, B., Perez-Brocal, V., Silva, F.J., y Latorre, A. Plasmids in the aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola* with the smallest genomes. A puzzling evolutionary story. *Gene*, 370: 17-25. 2006.
- Gillot, C. Entomology. *Plenum Press*. New York, 1980.
- Guindon, S. y Gascuel, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.*, 52 (5): 696-704. 2003.
- Hales, D.F., Tomiuk, J., Wöhrmann, K., y Sunnucks, P. Evolutionary and genetic aspects of aphid biology: a review. *Eur. J. Entomol.*, 94: 1-55. 1997.
- Havill, N.P. y Footitt, R.G. Biology and evolution of Adelgidae. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 325-349. 2007.
- Heie, O.E. Taxonomy and phylogeny of the fossil family *Elektraphididae* Steffan, 1968 (Homoptera, Aphidoidea). *Entomologica Scandinavica*, 7: 53-58. 1976.
- Heie, O.E. The Aphidoidea (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. I. General Part. The Families Mindaridae, Hormaphididae, Thelaxidae, Anoeciidae, and Pemhigidae. *Fauna Entomologica Scandinavica*, 9: 1-236. 1980.
- Heie, O.E. Morphology and phylogeny of some Mesozoic aphids (Insecta, Hemiptera). *Entomologica Scandinavica Supplement*, 15: 401-415. 1981.
- Heie, O.E. Palaeontology and phylogeny. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier*. Amsterdam, 1987.

Bibliografía

- Heie, O.E.** Why are there so few aphid species in the temperate areas of the southern hemisphere? *Eur. J. Entomol.*, 91: 127-133. 1994.
- Heie, O.E.** The history of the studies on aphid palaeontology and their bearing on the evolutionary history of aphids. En: Aphids in a New Millenium. Simon, J.C., Dedryver, C.A., Rispe, C., y Hulle, M., eds. *INRA*. Paris, 2004.
- Houk, E.J.** Symbionts. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier*. Amsterdam, 1987.
- Hsu, R., Briscoe, A.D., Chang, B.S.W., y Pierce, N.E.** Molecular evolution of a long wavelength-sensitive opsin in mimetic *Heliconius* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 72: 435-449. 2001.
- Huelsenbeck, J.P. y Ronquist, F.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17 (8): 754-755. 2001.
- Iiharco, F.A. y van Harten, A.** Systematics. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier*. Amsterdam, 1987.
- Inbar, M., Wink, M., y Wool, D.** The evolution of host plant manipulation by insects: molecular and ecological evidence from gall-forming aphids on *Pistacia*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32 (2): 504-511. 2004.
- Kawada, K.** Polymorphism and morph determination. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier*. Amsterdam, 1987.
- Kimura, M.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120. 1980.
- Kumar, S.** PHYLTEST: A program for testing phylogenetic hypothesis. *Penn State University*. Pennsylvania, 1995 »
- Kumar, S., Tamura, K., y Nei, M.** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150-163. 2004.
- Lamelas, A., Perez-Brocal, V., Gomez-Valero, L., Gosalbes, M.J., Moya, A., y Latorre, A.** Evolution of the secondary symbiont "Candidatus serratia symbiotica" in aphid species of the subfamily lachninae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (13): 4236-4240. 2008.
- Latorre, A., Gil, R., Silva, F.J., y Moya, A.** Chromosomal stasis versus plasmid plasticity in aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola*. *Heredity*, 95 (5): 339-347. 2005.
- Latorre, A., Moya, A., y Ayala, F.J.** Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83 (22): 8649-8653. 1986.
- Le Trionnaire, G., Jaubert, S., Sabater-Muñoz, B., Benedetto, A., Bonhomme, J., Prunier-Leterme, N., Martínez-Torres, D., Simon, J.C., y Tagu, D.** Seasonal photoperiodism regulates the expression of cuticular and signalling protein genes in the pea aphid. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37 (10): 1094-1102. 2007.
- Lees, A.D.** Photoperiodic time measurement in the aphid *Megoura viciae*. *J. Insect Physiol.*, 19: 2279-2316. 1973.

- Lewis, P.O.** Phylogenetic systematics turns over a new leaf. *Trends Ecol. Evol.*, 16 (1): 30-37. 2001.
- Linneo, C.v.** Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, loci. *Holmiae*. 1758.
- Lopez, P., Forterre, P., y Philippe, H.** The root of the tree of life in the light of the covarion model. *J. Mol. Evol.*, 49 (4): 496-508. 1999.
- Lozier, J.D., Roderick, G.K., y Mills, N.J.** Genetic evidence from mitochondrial, nuclear, and endosymbiont markers for the evolution of host plant associated species in the aphid genus *Hyalopterus* (Hemiptera: Aphididae). *Evolution Int. J. Org. Evolution.*, 61 (6): 1353-1367. 2007.
- Mamontova, V.A.** Popelitsi-Lyachnidi. *Akademiya Nauk Ukrainskoi*. Kiev, 1972.
- Mamontova, V.A.** Evolyutsiya, filogenyeyz i sistyema tlyei syemyeistva lyachnid (Aphidinea, Lachnidae), Coobshchyeniye II: Puti evolyutsii lyachnid. *Vest. Zool.*, 25-35. 1980.
- Marcovitch, S.** The migration of the Aphididae and the appearance of the sexual forms as affected by the relative length of daily exposure. *Journal of Agricultural Research*, 27: 513-522. 1924.
- Mardulyn, P. y Cameron, S.A.** The major opsin in bees (Insecta: Hymenoptera): A promising nuclear gene for higher level phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 12 (2): 168-176. 1999.
- Martínez, D., Moya, A., Latorre, A., y Fereres, A.** Mitochondrial DNA variation in *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) populations from four Spanish localities. *Annals of the Entomological Society of America*, 85 (2): 241-246. 1992.
- Martínez-Torres, D., Buades, C., Latorre, A., y Moya, A.** Molecular systematics of aphids and their primary endosymbionts. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 20 (3): 437-449. 2001.
- Martínez-Torres, D., Moya, A., Hebert, P.D., y Simon, J.C.** Geographic distribution and seasonal variation of mitochondrial DNA haplotypes in the aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 87: 161-167. 1997.
- Metcalf, Z.P.** Phylogeny of Homoptera Auchenorrhyncha. *Commentaria Biologia*, 12: 1-14. 1951.
- Miller III, D.G. y Crespi, B.** The evolution of inquilinism, host-plant use and mitochondrial substitution rates in *Tamalia* gall aphids. *J. Evol. Biol.*, 16 (4): 731-743. 2003.
- Miyazaki, M.** Morphology of Aphids. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier*. Amsterdam, 1987.
- Moran, N.A.** The evolution of host-plant alternation in aphids: evidence for specialization as a dead end. *The American Naturalist*, 132 (5): 681-706. 1988.
- Moran, N.A.** A 48-million-year-old aphid-host plant association and complex life cycle: biogeographic evidence. *Science*, 245: 173-175. 1989.
- Moran, N.A.** Aphid life cycles: two evolutionary steps. *The American Naturalist*, 136 (1): 135-138. 1990.
- Moran, N.A.** The evolution of aphid life cycles. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 321-348. 1992.

Bibliografía

- Moran, N.A. y Baumann, P.** Phylogenetics of cytoplasmically inherited microorganism of arthropods. *Trends Ecol. Evol.*, 9: 15-20. 1994.
- Moran, N.A., Baumann, P., y von Dohlen, C.D.** Use of DNA sequences to reconstruct the history of the association between members of the Sternorrhyncha (Homoptera) and their bacterial endosymbionts. *Eur. J. Entomol.*, 91: 79-83. 1994.
- Moran, N.A., Degnan, P.H., Santos, S.R., Dunbar, H.E., y Ochman, H.** The players in a mutualistic symbiosis: insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102 (47): 16919-16926. 2005a.
- Moran, N.A., Dunbar, H.E., y Wilcox, J.L.** Regulation of transcription in a reduced bacterial genome: nutrient-provisioning genes of the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *J. Bacteriol.*, 187 (12): 4229-4237. 2005b.
- Moran, N.A., Kaplan, M.E., Gelsey, M.J., Murphy, T.G., y Scholes, E.A.** Phylogenetics and evolution of the aphid genus *Uroleucon* based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Systematic Entomology*, 24: 85-93. 1999.
- Moran, N.A., Munson, M.A., Baumann, P., y Ishikawa, H.** A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 253: 167-171. 1993.
- Moran, N.A., von Dohlen, C.D., y Baumann, P.** Faster evolutionary rates in endosymbiotic bacteria than in cospeciating insect hosts. *J. Mol. Evol.*, 41: 727-731. 1995.
- Mordvilko, A.K.** Tli *Aphidodea*. En: Faune de la Russie (*Insecta, Hemiptera*). Petrograd, 1914.
- Mordvilko, A.K.** Podotrjad *Aphidodea* - tli, ili, restitel'nye vsi. En: Opredeletel' nasekomykh europejskoj casti SSSR. Moskva-Leningrad, 1948.
- Moya, A., Latorre, A., Sabater-Muñoz, B., y Silva, F.J.** Comparative molecular evolution of primary (*Buchnera*) and secondary symbionts of aphids based on two protein-coding genes. *J. Mol. Evol.*, 55 (2): 127-137. 2002.
- Munson, M.A., Baumann, P., Clark, M.A., Baumann, L., Moran, N.A., Voegtlin, D.J., y Campbell, B.C.** Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *J. Bacteriol.*, 173 (20): 6321-6324. 1991a.
- Munson, M.A., Baumann, P., y Kinsey, M.G.** *Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41 (4): 566-568. 1991b.
- Nieto Nafría, J.M. y de Benito Dorrego, J.** Los pulgones (Hom., Aphidinea) de las plantas cultivadas en España, II. Cereales. *Boletín Servicio Plagas*, 2: 225-246. 1978.
- Nieto Nafría, J.M. y Mier Durante, M.P.** Fauna Ibérica. Hemiptera Aphididae I. Ramos Sánchez, M.A., ed. *Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC*. Madrid, 1998.
- Nieto Nafría, J.M., Mier Durante, M.P., Binazzi, A., y Pérez Hidalgo, N.** Fauna Ibérica. Hemiptera Aphididae II. Ramos Sánchez, M.A., ed. *Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC*. Madrid, 2003.

- Nieto Nafría, J.M., Mier Durante, M.P., García Prieto, F., y Pérez Hidalgo, N.** Fauna Ibérica. Hemiptera Aphididae III. Ramos Sánchez, M.A., ed. *Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC*. Madrid, 2005.
- Nieto Nafría, J.M., Mier Durante, M.P., y Remaudière, G.** Les noms des taxa du groupe-famille chez les Aphididae (Hemiptera). *Revue fr. Ent. (N. S.)*, 19 (3-4): 77-92. 1997.
- Normark, B.B.** Molecular systematics and evolution of the aphid family Lachnidae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 14 (1): 131-140. 2000.
- Parfitt, D.E. y Badenes, M.L.** Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 94: 7987-7992. 1997.
- Pérez Hidalgo, N., Espadaler, X., y Nieto Nafría, J.M.** Primera cita de *Geoica setulosa* (Passerini, 1860) en la península Ibérica (Hemiptera: Aphididae: Eriosomatinae: Fordini). *Graellsia*, 63 (1): 143-146. 2007.
- Pérez Hidalgo, N. y Nieto Nafría, J.M.** Subfamilia *ERIOSOMATINAE* Kirkaldy, 1905 (1843). En: Fauna Ibérica. Hemiptera Aphididae II. Ramos Sánchez, M.A., ed. *Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC*. Madrid, 2003.
- Perez-Brocal, V., Gil, R., Ramos, S., Lamelas, A., Postigo, M., Michelena, J.M., Silva, F.J., Moya, A., y Latorre, A.** A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship? *Science*, 314 (5797): 312-313. 2006.
- Perez-Brocal, V., Latorre, A., Gil, R., y Moya, A.** Comparative analysis of two genomic regions among four strains of *Buchnera aphidicola*, primary endosymbiont of aphids. *Gene*, 345 (1): 73-80. 2005.
- Poisson, R. y Pesson, P.** Super-ordre des Hémiptéroïdes. En: *Traité de Zoologie*. Grassé, P.P., ed. *Masson et Cie*. Paris, 1951.
- Posada, D. y Buckley, T.R.** Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.*, 53 (5): 793-808. 2004.
- Posada, D. y Crandall, K.A.** MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817-818. 1998.
- Quednau, F.W. y Remaudière, G.** Le genre sud-américain *Neuquenaphis* E.E. Blanchard, description de deux nouvelles espèces et définition de nouvelles sous-familles d'Aphididae (Homoptera). *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 99 (4): 365-384. 1994.
- Rambaut, A. y Drummond, A.** Tracer. *University of Edinburgh*. 2003 »
- Ramos, S., Moya, A., y Martínez-Torres, D.** Identification of a gene overexpressed in aphids reared under short photoperiod. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33 (3): 289-298. 2003.
- Remaudière, G.** Espèces et synonymies nouvelles dans le genre *Forda* [Hemiptera, Aphididae, Eriosomatinae]. *Revue fr. Ent. (N. S.)*, 21 (3): 97-104. 1999.
- Remaudière, G. y Quednau, F.W.** Description de deux *Pterasthenia* nouveaux et révision de Pterastheniinae subfam. nov. (Hom.: Aphididae). *Annales de la Société Entomologique de France*, 24 (1): 47-57. 1988.
- Remaudière, G. y Remaudière, M.** Catalogue des Aphididae du Monde. *INRA*. Paris, 1997.

Bibliografia

- Remaudière, G. y Stroyan, H.L.G.** Un *Tamalia* nouveau de Californie (USA) et discussion sur les Tamalinae subfam. nov. (Hom. Aphididae). *Annales de la Société Entomologique de France*, 20 (1): 93-103. 1984.
- Roberti, D.** Note su alcune specie di Fordinae (Homoptera - Aphidoidea - Eriosomatidae). *Entomologica*, 28: 141-205. 1983.
- Roberti, D.** Gli Afidi d'Italia (Homoptera - Aphidoidea). *Entomologica*, 25: 3-387. 1993.
- Robinson-Rechavi, M. y Huchon, D.** RRTree: relative-rate tests between groups of sequences on a phylogenetic tree. *Bioinformatics*, 16 (3): 296-297. 2000.
- Rouhbakhsh, D., Lai, C.Y., von Dohlen, C.D., Clark, M.A., Baumann, L., Baumann, P., Moran, N.A., y Voegtlin, D.J.** The tryptophan biosynthetic pathway of aphid endosymbionts (*Buchnera*): genetics and evolution of plasmid-associated anthranilate synthase (trpEG) within the Aphididae. *J. Mol. Evol.*, 42 (4): 414-421. 1996.
- Ruiz-Trillo, I., Paps, J., Loukota, M., Ribera, C., Jondelius, U., Baguna, J., y Riutort, M.** A phylogenetic analysis of myosin heavy chain type II sequences corroborates that Acoela and Nemertodermatida are basal bilaterians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99 (17): 11246-11251. 2002.
- Russell, J.A., Latorre, A., Sabater-Muñoz, B., Moya, A., y Moran, N.A.** Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol. Ecol.*, 12 (4): 1061-1075. 2003.
- Sabater-Muñoz, B., Gomez-Valero, L., van Ham, R.C., Silva, F.J., y Latorre, A.** Molecular characterization of the leucine cluster in *Buchnera* sp. strain PSY, a primary endosymbiont of the aphid *Pemphigus spyrothecae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (5): 2572-2575. 2002.
- Sabater-Muñoz, B., van Ham, R.C., Moya, A., Silva, F.J., y Latorre, A.** Evolution of the leucine gene cluster in *Buchnera aphidicola*: insights from chromosomal versions of the cluster. *J. Bacteriol.*, 186 (9): 2646-2654. 2004.
- Saitou, N. y Nei, M.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425. 1987.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T.** Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York, 1989.
- Sandstrom, J.P., Russell, J.A., White, J.P., y Moran, N.A.** Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Mol. Ecol.*, 10 (1): 217-228. 2001.
- Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M., y von Haeseler, A.** TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics*, 18: 502-504. 2002.
- Sentandreu, V., Castro, J.A., Ayllon, M.A., Rubio, L., Guerri, J., Gonzalez-Candelas, F., Moreno, P., y Moya, A.** Evolutionary analysis of genetic variation observed in citrus tristeza virus (CTV) after host passage. *Arch. Virol.*, 151 (5): 875-894. 2006.
- Shaposhnikov, G.Ch.** Podotrjad *Aphidinea* - tli. En: *Opredelitel' nasekomykh evropejskoj casti SSSR*. Moskva-Leningrad, 1964.
- Shaposhnikov, G.Ch.** Evolution of aphids in relation to evolution of plants. En: *Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control*. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier*. Amsterdam, 1987a.

- Shaposhnikov, G.Ch.** Organization (structure) of populations and species, and speciation. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier*. Amsterdam, 1987b.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., y Ishikawa, H.** Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature*, 407 (6800): 81-86. 2000.
- Shimodaira, H. y Hasegawa, M.** Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.*, 16 (8): 1114-1116. 1999.
- Shingleton, A.W. y Stern, D.L.** Molecular phylogenetic evidence for multiple gains or losses of ant mutualism within the aphid genus *Chaitophorus*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 26 (1): 26-35. 2003.
- Shudd, J.H.** Ant Aphid Mutualism. En: Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control. Minks, A.K. y Harrewijn, P., eds. *Elsevier*. Amsterdam, 1987.
- Silva, F.J., van Ham, R.C., Sabater, B., y Latorre, A.** Structure and evolution of the leucine plasmids carried by the endosymbiont (*Buchnera aphidicola*) from aphids of the family Aphididae. *FEMS Microbiol. Lett.*, 168 (1): 43-49. 1998.
- Simon, J.C., Martínez-Torres, D., Latorre, A., Moya, A., y Hebert, P.D.** Molecular characterization of cyclic and obligate parthenogens in the aphid *Rhopalosiphum padi* (L.). *Proc. Biol. Sci.*, 263 (1369): 481-486. 1996.
- Staden, R., Beal, K., y Bonfield, J.K.** The Staden Package. En: Computer Methods in Molecular Biology. Misener, S. y Krawetz, S., eds. *Humana Press*. Totowa, NJ, 1998.
- Stern, D.L.** A phylogenetic analysis of soldier evolution in the aphid family Hormaphididae. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 256: 203-209. 1994.
- Stern, D.L.** Phylogenetic evidence that aphids, rather than plants, determine gall morphology. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 260: 85-90. 1995.
- Stern, D.L.** Phylogeny of the tribe Cerataphidini (Homoptera) and the evolution of the horned soldier aphids. *Evolution*, 52 (1): 155-165. 1998.
- Stern, D.L., Aoki, S., y Kurosu, U.** Determining aphid taxonomic affinities and life cycles with molecular data: a case study of the tribe Cerataphidini (Hormaphididae:Aphidoidea:Hemiptera). *Systematic Entomology*, 22: 81-96. 1997.
- Stern, D.L. y Foster, W.A.** The evolution of soldiers in aphids. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 71 (1): 27-79. 1996.
- Strimmer, K. y Rambaut, A.** Inferring confidence sets of possibly misspecified gene trees. *Proc. Biol. Sci.*, 269 (1487): 137-142. 2002.
- Sunnucks, P. y Hales, D.F.** Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Mol. Biol. Evol.*, 13 (3): 510-524. 1996.
- Swofford, D.L.** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. *Sinauer Associates*. Sunderland, Massachusetts, 2002.
- Takahashi, R.** *Aphididae* of Formosa, Part. 6. *Rept. Dept. Agr. Gov. Res. Inst. Formosa*, 53: 1-127. 1931.
- Tamas, I., Klasson, L., Canback, B., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Wernegreen, J.J., Sandstrom, J.P., Moran, N.A., y Andersson, S.G.**

Bibliografía

- 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science*, 296 (5577): 2376-2379. 2002.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D.G.** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882. 1997.
- Tsuchida, T., Koga, R., Shibao, H., Matsumoto, T., y Fukatsu, T.** Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Mol. Ecol.*, 11 (10): 2123-2135. 2002.
- van Ham, R.C., Gonzalez-Candelas, F., Silva, F.J., Sabater, B., Moya, A., y Latorre, A.** Postsymbiotic plasmid acquisition and evolution of the repA1-replicon in *Buchnera aphidicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97 (20): 10855-10860. 2000.
- van Ham, R.C., Kamerbeek, J., Palacios, C., Rausell, C., Abascal, F., Bastolla, U., Fernandez, J.M., Jimenez, L., Postigo, M., Silva, F.J., Tamames, J., Viguera, E., Latorre, A., Valencia, A., Moran, F., y Moya, A.** Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (2): 581-586. 2003.
- van Ham, R.C., Martínez-Torres, D., Moya, A., y Latorre, A.** Plasmid-encoded anthranilate synthase (TrpEG) in *Buchnera aphidicola* from aphids of the family Pemphigidae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (1): 117-125. 1999.
- van Ham, R.C., Moya, A., y Latorre, A.** Putative evolutionary origin of plasmids carrying the genes involved in leucine biosynthesis in *Buchnera aphidicola* (endosymbiont of aphids). *J. Bacteriol.*, 179 (15): 4768-4777. 1997.
- von Dohlen, C.D.** Macroevolution of aphid-plant relationships: an integrated approach. En: Aphids in a New Millennium. Simon, J.C., Dedryver, C.A., Rispe, C., y Hulle, M., eds. *INRA*. Paris, 2004.
- von Dohlen, C.D., Kurosu, U., y Aoki, S.** Phylogenetics and evolution of the eastern Asian-eastern North American disjunct aphid tribe, Hormaphidini (Hemiptera: Aphididae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 23 (2): 257-267. 2002.
- von Dohlen, C.D. y Moran, N.A.** Molecular phylogeny of the Homoptera: a paraphyletic taxon. *J. Mol. Evol.*, 41 (2): 211-223. 1995.
- von Dohlen, C.D. y Moran, N.A.** Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 71: 689-717. 2000.
- von Dohlen, C.D., Rowe, C.A., y Heie, O.E.** A test of morphological hypotheses for tribal and subtribal relationships of Aphidinae (Insecta: Hemiptera: Aphididae) using DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 38. 2006.
- von Dohlen, C.D. y Teulon, D.A.** Phylogeny and historical biogeography of New Zealand Indigenous Aphidini Aphids (Hemiptera, Aphididae): An hypothesis. *Systematics*, 96 (2): 107-116. 2003.
- Weiller, G.F. y Gibbs, A.** DIPLOMO: the tool for a new type of evolutionary analysis. *Computer Applications in BioSciences*, 11 (5): 535-540. 1995.
- Wilson, A.C., Sunnucks, P., y Hales, D.** Heritable genetic variation and potential for adaptive evolution in asexual aphids (Aphidoidea). *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 115-135. 2003.

- Wojciechowski, W.** Studies on the systematic system of aphids (*Homoptera, Aphidinea*). *Uniwersytet Slaski, Katowice*. 1992 »
- Yi, T., Wen, J., Golan-Goldhirsh, A., y Parfitt, D.E.** Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany*, 95 (2): 241-251. 2008.
- Zhang, H.C. y Qiao, G.X.** Molecular phylogeny of Fordini (Hemiptera: Aphididae: Pemphiginae) inferred from nuclear gene EF-1a and mitochondrial gene COI. *Bull. Ent. Res.*, 97: 379-386. 2007.

ANEXOS

ANEXOS

Debido a su extenso tamaño, los anexos de esta tesis doctoral se han incluido en el CD adjunto. A continuación se describe brevemente el contenido de cada uno de los anexos y los ficheros que se incluyen en el CD.

Anexo I. Alineamientos

Cada uno de los alineamientos utilizados para la reconstrucción filogenética en esta tesis doctoral se presenta en un fichero de Microsoft Office Word (Microsoft Corporation). En la tabla siguiente se muestra el nombre de cada uno de los ficheros presentes en el CD (dentro de la carpeta "Anexo I"), junto a una breve descripción de cada uno de ellos.

Tabla Anexo I. Ficheros de alineamientos adjuntos en CD.

Fichero	Alineamiento de ...
Capítulo 1.	
1.lwrh	gen <i>lwrh</i> , intrones incluidos
2.lwrh_ex	exones del gen <i>lwrh</i>
3.lwrh_aa	secuencias de aminoácidos del gen <i>lwrh</i>
4.ef1a	gen <i>ef1a</i> , intrones incluidos
5.ef1a_ex	exones del gen <i>ef1a</i>
6.atp6	gen <i>atp6</i>
7.atp6_aa	secuencias de aminoácidos del gen <i>atp6</i>
8.coll	gen <i>coll</i>
9.coll_aa	secuencias de aminoácidos del gen <i>coll</i>
10.ntLEA	conjunto de datos combinados ntLEA
11.aaLEA	conjunto de datos de aminoácidos aaLEA
12.ntLEAC	conjunto de datos combinados ntLEAC
13.aaLEAC	conjunto de datos de aminoácidos aaLEAC
Capítulo 2.	
14.Fordini_lwrh	gen <i>lwrh</i> en la tribu Fordini
15.Fordini_lwrh_ex	exones del gen <i>lwrh</i> en la tribu Fordini
16.Fordini_ef1a	gen <i>ef1a</i> en la tribu Fordini
17.Fordini_ef1a_ex	exones del gen <i>ef1a</i> en la tribu Fordini
18.Fordini_mtDNA	fragmento mitocondrial en la tribu Fordini
19.Fordini_atp6	gen <i>atp6</i> en la tribu Fordini
20.FordaParacletus_lwrh	gen <i>lwrh</i> en los géneros <i>Forda</i> y <i>Paracletus</i>
21.FordaParacletus_lwrh_ex	exones del gen <i>lwrh</i> en <i>Forda</i> y <i>Paracletus</i>
22.FordaParacletus_mtDNA	fragmento mitocondrial en <i>Forda</i> y <i>Paracletus</i>

Anexo II. Topologías extra para test de comparación de hipótesis filogenéticas alternativas

Del conjunto inicial de 30 topologías alternativas utilizado para los test de comparación de hipótesis filogenéticas alternativas, 11 de ellas aparecen en figuras a lo largo del Capítulo 1 (ver tabla 1.8). En este anexo se muestran las 19 topologías restantes incluidas en el mencionado conjunto, las cuales pueden observarse en el fichero "AnexoII.doc" del CD adjunto.

Anexo III. Tablas de composición nucleotídica y aminoacídica

En el fichero "AnexoIII.doc" del CD adjunto se han recopilado todas las tablas de composición nucleotídica y aminoacídica de las secuencias utilizadas en esta tesis doctoral. La composición de las secuencias se obtuvo mediante el programa MEGA. Para cada secuencia, se muestra también el resultado de los test de homogeneidad en la composición, realizado mediante el programa TREE-PUZZLE.

Anexo IV. Curvas de saturación

En el fichero "AnexoIV.doc", presente en el CD adjunto, se muestra el total de curvas de saturación realizadas a partir de los datos obtenidos para las secuencias analizadas en el capítulo 1. Las distancias por parejas de especies, tanto nucleotídicas como aminoacídicas, se obtuvieron mediante el programa MEGA. Las matrices de distancias se introdujeron posteriormente en el programa DIPLOMO para la representación de las curvas de saturación. Este programa se utilizó también para transformar las matrices de distancias en datos representados en dos columnas, correspondientes a los ejes de abscisas y ordenadas de las representaciones. Estos datos se utilizaron finalmente para representar las curvas de saturación en el programa Microsoft Excel.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha acordó otorgar a esta Tesis Doctoral de

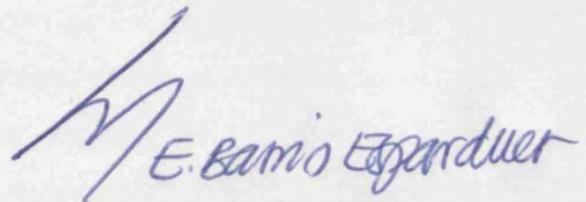
D./D^a **BENJAMÍN ORTÍZ RIVAS**

la calificación de **SOBRESALIENTE "CUM LAUDE"**

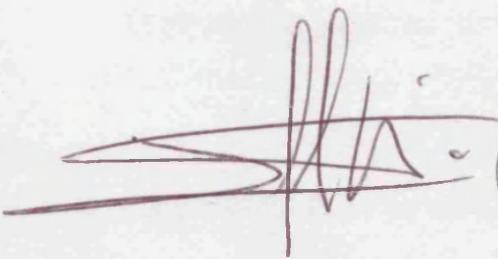
Valencia, a ...29. de mayo..... de ...2009.....

EL/LA SECRETARIO/A,

EL/LA PRESIDENTE/A



Dr. D. Eladio Barrio Esparducer



Dr. D. Juan Manuel Nieto Nafria