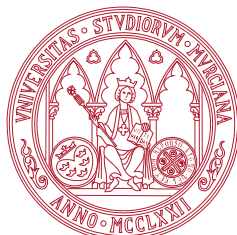
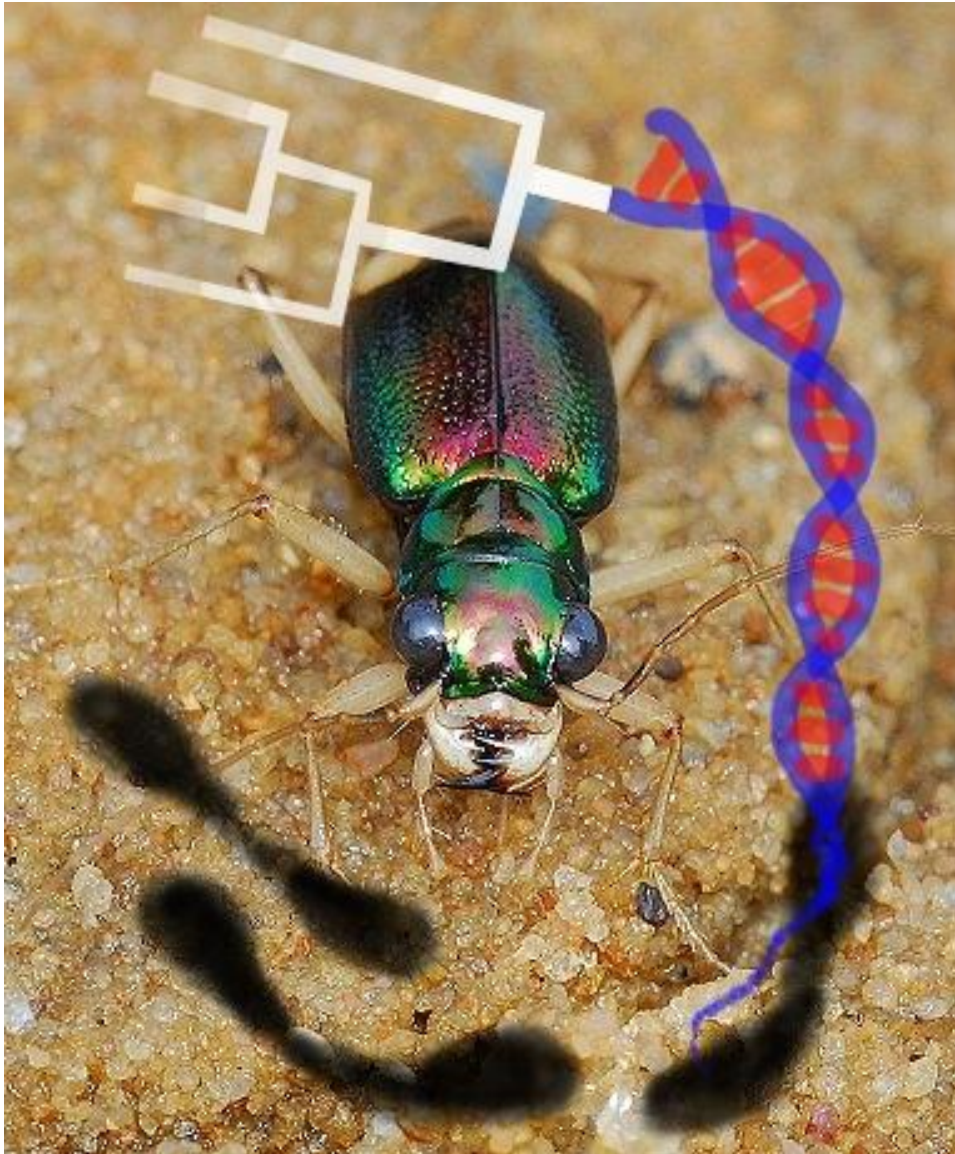


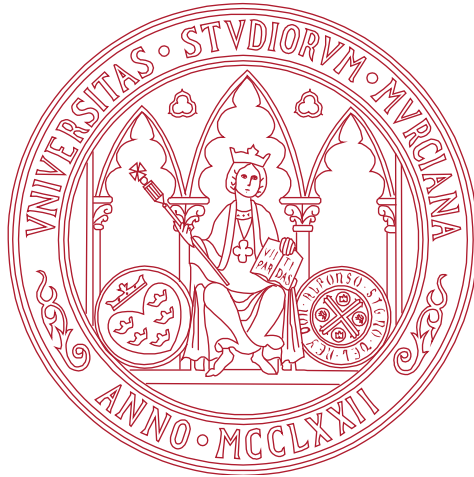
TESINA DE LICENCIATURA
Alejandro López López

**Análisis citogenético, filogenético y filogeográfico
de tres especies de *Pseudotetracha* Fleutiaux, 1894
(Coleoptera: Cicindelidae: Megacephalina)**



Universidad de Murcia
Facultad de Biología
Departamento de Zoología y Antropología Física

Universidad de Murcia
Facultad de Biología
Departamento de Zoología y Antropología
Física



**Análisis citogenético, filogenético y
filogeográfico de tres especies de
Pseudotetracha Fleutiaux, 1894 (Coleoptera:
Cicindelidae: Megacephalina)**

**TESINA DE LICENCIATURA
Alejandro López López**

IDENTIFICACIONES:

Autor: **Alejandro López López.**

Título: **Análisis citogenético, filogenético y filogeográfico de tres especies de *Pseudotetracha* Fleutiaux, 1894 (Coleoptera: Cicindelidae: Megacephalina)**

Director: **José Galián Albaladejo.**

Año: **2009.**

Titulación: **Licenciatura en Biología.**

PALABRAS CLAVE: Cromosomas, Megacephalini, *Pseudotetracha*, Australia, Filogenia, Filogeografía, Citogenética, Ortoselección cariotípica.

Grupo taxonómico: Género ***Pseudotetracha* Fleutiaux, 1894.**

Área geográfica: **Australia del Sur.**

Tipo de trabajo: **Experimental.**

Técnica: **Citogenética, filogenia, filogeografía.**

OTROS DATOS:

Nº de citas bibliográficas: **82**

Nº de tablas: **5**

Nº de figuras: **29**

Nº de Anexos: **2**

RESUMEN: Se han analizado tres especies de la tribu Megacephalini mediante técnicas citogenéticas, filogenéticas y filogeográficas. La posición filogenética y los datos citogenéticos para *Pseudotetracha whelani* disponibles en la bibliografía han sido confirmados. Se ha hallado un cariotipo con fórmula meiótica $n=11+XY$ para *P. australis*, filogenéticamente próxima al complejo de especies *blackburni/murchisona*. Los datos moleculares obtenidos en este trabajo del gen citocromo oxidasa III han confirmado la monofilia de este complejo de especies, que ha sido discutida en trabajos previos. Se ha observado un sistema de cromosomas sexuales múltiples de tipo quiasmático y de origen reciente, del tipo $n=10+III$, en la especie *P. blackburni*. Los datos citogenéticos obtenidos junto con los datos disponibles en la bibliografía, observados en el contexto de la filogenia molecular, permiten inferir la existencia de una dinámica evolutiva tendente a la reducción del número de cromosomas.

ABSTRACT: Three species of the tribe Megacephalini have been analyzed through cytogenetic, phylogenetic and phylogeographic methods. The cytogenetic data and the phylogenetic relationship of *Pseudotetracha whelani* available in the literature have been confirmed. A karyotype with a meioformula of $n=11+XY$ has been found for *P. australis*, phylogenetically close to the *blackburni/murchisona* species complex. The monophyly of this complex has been confirmed by the results obtained from the phylogenetic analysis of the cytochrome oxidase III gene. A multiple sex chromosome system ($n=10+III$) has been found in *P. blackburni*. The cytogenetic data obtained in this work, together with those available in the literature, analyzed in the context of the molecular phylogeny, allows to infer the existence of a evolutionary dynamic towards the reduction of the chromosome number.

Agradecimientos

Si hay alguien a quien deba dar las gracias en primer lugar es a Pepe, maestro de maestros. A lo largo de la realización de esta tesina ha aportado una gran porción de su tiempo y un esfuerzo monumental. Sus sugerencias, sus ideas, su guía y su inestimable ayuda en el amargo trago (aunque bueno y necesario) que es la primera redacción de un trabajo científico son inestimables. Y más valiosa todavía es su compañía; su cordialidad y constante atención lo convierten en un inigualable director.

Tampoco puedo pasar por alto la inestimable ayuda de los compañeros del departamento: A Javi y José Manuel por sus comentarios y ayuda y por su compañía en este tren en el que hemos subido. A Carlos por enseñarme a manejar los misterios de los programas filogenéticos. Y, cómo no, a Carmelo, Ana y Obdulia, quienes me han enseñado a manejarme con soltura en el laboratorio. A todos los demás (Pilar, Diego, José Fermín, William, Irene, Maria Jesús, Pepe Serrano y todos aquellos que olvido nombrar y quienes se dejan caer por allí de cuando en cuando) por su alegría, su compañerismo y los ánimos que me han dado a lo largo de la realización de esta tesina.

A Eduardo Díaz y Peter Hudson, por el mes que pasaron capturando a los protagonistas de esta tesina en el otro extremo del mundo.

A todos quienes me han apoyado y alentado a seguir adelante, especialmente a toda mi familia, lamento no poder agradecerlos individualmente vuestro papel en este trabajo pues necesitaría otra tesina exclusivamente para ello. Muchas gracias.

Sería imposible acabar estos agradecimientos sin citar a mis padres, pues esta tesina es, por todo lo que les debo, en parte obra suya.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Base conceptual	3
1.1.1. Citogenética animal (evolución cromosómica)	3
1.1.2. Reorganizaciones cromosómicas y especiación	3
1.1.3. Estudios citogenéticos en coleópteros	5
1.1.4. Métodos filogenéticos	5
1.1.4.1. Métodos fenéticos: análisis de Neighbor-Joining	6
1.1.4.2. Análisis cladístico: Máxima Parsimonia	6
1.1.4.3. Test de <i>bootstrap</i>	6
1.1.4.4. Análisis Bayesiano	7
1.1.5. Filogeografía: construcción de redes haplotípicas	7
1.1.6. Código de barras de ADN y taxonomía de ADN	9
1.1.7. El ADN mitocondrial	11
1.2. Los cicindélidos o escarabajos tigre	12
1.3. Posición sistemática de los cicindélidos dentro de la familia Carabidae	14
1.4. Filogenia de los grupos de cicindélidos	14
1.5. Análisis citogenético en los cicindélidos	16
1.6. Filogenia molecular en la tribu Megacephalini	17
1.7. El género <i>Pseudotetracha</i> Fleutiaux, 1894	19
2. Objetivos e hipótesis de partida	23
3. Material y métodos	27
3.1. Recolección del material	29
3.2. Análisis cromosómico	30
3.3. Extracción del ADN	31
3.4. Amplificación y secuenciación de un fragmento del gen citocromo oxidasa III	32
3.5. Análisis filogenético de las secuencias	33
4. Resultados	35
4.1. Identificación de los ejemplares	37
4.2. Análisis filogenético	38
4.2.1. Neighbor-Joining	38
4.2.2. Máxima Parsimonia	41
4.2.3. Análisis Bayesiano	43
4.3. Análisis filogeográfico	44
4.4. Análisis cariotípico	47
5. Discusión	49
5.1. Filogenia del género <i>Pseudotetracha</i>	51
5.2. <i>Pseudotetracha whelani</i>	53
5.3. <i>Pseudotetracha australis</i>	55
5.4. <i>Pseudotetracha blackburni</i> y relaciones con otras especies del complejo <i>blackburni/murchisona</i>	56
5.5. Evolución cariotípica en el género <i>Pseudotetracha</i> y la tribu Megacephalini	58
5.6. Código de barras y taxonomía del ADN en la tribu Megacephalini	62
6. Resumen y conclusiones	65
6.1. Resumen	67
6.2. Conclusiones	68
7. Bibliografía	71
Anexo I	79
Anexo II	85

Índice de tablas

Tabla 1: relación de los ejemplares utilizados en este trabajo	37
Tabla 2: Matriz de divergencia: Distancias Gamma para el modelo de 2 parámetros de Kimura en el fragmento mitocondrial coxIII entre 37 ejemplares de los 3 taxones de <i>Pseudotetracha</i> analizados junto con los taxones incluidos precedentes de la base de datos GenBank.	39
Tabla 3: Ejemplares (ver Tabla 1) pertenecientes cada uno de los haplotipos encontrados	44
Tabla 4: Fórmulas meóticas de los ejemplares analizados	47
Tabla 5: Datos de número cromosómico y sistema de cromosomas sexuales en diferentes especies de la tribu Megacephalini	59

Índice de figuras

Figura 1.1: Ejemplo de análisis cladístico anidado: árbol de haplotipos de <i>Timarcha goettingensis</i> (Gómez-Zurita et al. 2000).	8
Figura 1.2: Esquema del funcionamiento de la taxonomía del ADN; modificado de Vogler y Monaghan (2007).	9
Figura 1.3: Caso hipotético de aplicación de la taxonomía de ADN. Véanse los detalles en el texto. Tomado de Savolainen et al. (2005).	10
Figura 1.4: Primer plano de un cicindélido adulto (izquierda, fotografía de Igor Siwanowicz), un túnel de larva (centro) y una larva obstruyendo la entrada a su túnel con su cabeza (derecha, fotografías de A.J. Silverside).	13
Figura 1.5: Arbol de Inferencia Bayesiana de la familia Carabidae, en el que se resalta la posición de los cicindélidos. Tomado de Maddison et al., (2009).	15
Figura 1.6: Hipótesis filogenética de las relaciones de los Cicindelinae a partir de secuencias de ARNr 18S. Tomado de Galián et al., (2002).	16
Figura 1.7: Reconstrucción filogenética obtenida por inferencia Bayesiana de los genes coxIII, 16S y 18S. Tomado de Zerm et al. (2007).	18
Figura 1.8: El Lago Pink casi seco, situado junto a la costa.	20
Figura 1.9: Vista del Lago Gilles en su estado normal (superior), con una costra de sal cubriendo toda su superficie; y tras unas lluvias (inferior).	20
Figura 1.10: El Lago Hart seco (superior) y el Lago Gairdner completamente lleno de agua tras unas lluvias (inferior).	21
Figura 1.11: Mapas de distribución basados en los lugares de captura de los ejemplares en colecciones para las especies (de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo) <i>P. australis</i> , <i>P. blackburni</i> y <i>P. whelani</i> (Fuente: Australian Faunal Directory).	22
Figura 3.1: Mapa del área de estudio, marcando la posición de las localizaciones de recolección (cuadrados). En color se muestra la especie hallada en cada punto (rojo: <i>P. australis</i> ; azul: <i>P. blackburni</i> ; verde: <i>P. whelani</i>).	29
Figura 3.2: De izquierda a derecha, <i>P. blackburni</i> (ejemplar número 39), <i>P. australis</i> (ejemplar número 146) y <i>P. whelani</i> (ejemplar número 210). Se observan las características de los élitros (puntuadura, y extensión y forma del ápice testáceo) que empleamos para su identificación (Sumlin, 1997).	30
Figura 3.3: Estructura de la gónada de un representante de <i>P. whelani</i> (ejemplar número 146).	31
Figura 3.4: Fragmento del electroferograma perteneciente al fragmento analizado en el individuo número 171.	34
Figura 4.1: Fenograma obtenido tras el análisis de Neighbor-Joining de los datos analizados.	40

Figura 4.2: Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis de Máxima Parsimonia realizado en el programa TNT. 42	42
Figura 4.3: Árbol consenso obtenido tras el análisis de Inferencia Bayesiana realizado a partir de las secuencias analizadas. 43	43
Figura 4.4: Red haplotípica no enraizada obtenida del análisis de la matriz de datos completa. Los ejemplares procedentes del trabajo de Zerm et al. (2007) se nombran con las primeras letras del nombre específico. 45	45
Figura 4.5: Red haplotípica correspondiente a la especie <i>P. whelani</i> 46	46
Figura 4.6: Red haplotípica correspondiente a la especie <i>P. blackburni</i> y el resto de las especies del complejo <i>blackburni/murchisona</i> 46	46
Figura 4.7: Microfotografías de las preparaciones cromosómicas. 48	48
Figura 5.1: Árbol consenso de Máxima Parsimonia sobre el cual se han representado, de izquierda a derecha, los haplotipos de cada ejemplar, los datos cromosómicos obtenidos, la localidad de captura y la especie asignada en base a la morfología. 51	51
Figura 5.2: Filogeografía de los ejemplares analizados de <i>P. whelani</i> . A) Localización espacial de los haplotipos encontrados. B) Red haplotípica de los mismos. Se muestran englobados en recuadros azules los tres clados diferenciados en los análisis filogenéticos. 54	54
Figura 5.3: Relaciones filogeográficas para los ejemplares analizados de <i>P. australis</i> . A) Localización espacial de los haplotipos encontrados. B) Red haplotípica. 55	55
Figura 5.4: Relaciones filogeográficas para los ejemplares analizados de <i>P. blackburni</i> . A) Localización espacial de los haplotipos encontrados. B) Red haplotípica. 57	57
Figura 5.5: Detalle de los élitros del ejemplar número 163, en el que se aprecia su patrón de puntuadura alcanzando los ápices. 58	58
Figura 5.6: Hipótesis planteadas (ver explicación en el texto) para explicar el origen del trivalente hallado en <i>P. blackburni</i> 60	60
Figura 5.7: Datos cromosómicos conocidos en Megacephalini, localizados sobre el árbol obtenido por Zerm et al. (2007). 62	62

1.- Introducción

1.1.- Base conceptual

1.1.1.- Citogenética animal (Evolución cromosómica)

Una faceta importante de la citogenética animal ha sido el estudio de las diferencias y similitudes cromosómicas entre especies relacionadas o razas cromosómicas dentro de una especie. Ejemplos clásicos de este tipo de estudios los encontramos en diversos grupos animales entre los que se pueden mencionar los mamíferos, como el estudio comparativo de los cromosomas de humanos y los grandes simios llevados a cabo por Pearson (1973), los trabajos en diversas especies de ratas de Yosida y Sagay (1973) o sobre traslocaciones robertsonianas de Brooker (1982) en *Mus musculus*. Entre los insectos, los estudios con los cromosomas politénicos de los dípteros, como Simuliidae (Rothfels, 1980) o drosófilidos (Carson, 1970) han proporcionado observaciones espectaculares y excepcionales en el reino animal. Los cromosomas de ortópteros, con un patrón más común entre los insectos han proporcionado un gran número de casos de razas cromosómicas y zonas híbridas entre especies (Hewitt y Barton, 1980; Shaw *et al.*, 1980; Morgan-Ritchards, 1997; Morgan-Ritchards *et al.*, 2000; Morgan-Ritchards *et al.*, 2003). El impacto inicial de estos estudios clásicos han llevado a algunos autores a considerar a las reorganizaciones cromosómicas como un factor principal en la especiación animal (White, 1978; King, 1993).

Los cromosomas de los coleópteros son generalmente de pequeño tamaño y se les considera como difíciles citogenéticamente (Crowson, 1981). Desde el trabajo recopilatorio de Smith y Virkii (1978) numerosos autores han contribuido al conocimiento citogenético de los coleópteros. Hasta la recopilación de Petitpierre (1996) se conocían datos de más de 3000 especies de coleópteros, mostrando un amplio rango de variación entre $2n=4$ en el elatérico de América del Sur *Chalcolepidus zonatus* (Ferreria *et al.*, 1984) hasta $2n=69$ en el carábido paleártico *Ditomus capito* (Serrano, 1981). Los datos citogenéticos acumulados desde entonces, no han modificado este rango de variación numérica.

1.1.2.- Reorganizaciones cromosómicas y especiación

Las reorganizaciones cromosómicas son cambios en la estructura de los cromosomas producidos por fenómenos de translocación (salto de un fragmento de un cromosoma a otro), inversión (cambio en la orientación de un fragmento de un cromosoma) o de fusión (unión de dos cromosomas) y fisión (ruptura de un cromosoma en dos). Estos cambios producen alteraciones

visibles en el cariotipo aunque a menudo no afectan al fenotipo.

Se ha comprobado en diferentes especies, incluidos ortópteros y seres humanos que aproximadamente uno de cada 500 individuos de una población cualquiera poseen una reorganización cromosómica (White, 1978), que a nivel individual habitualmente no produce ningún efecto negativo, a pesar de que muchos investigadores siguen considerándolas como deletéreas (Rieseberg, 2001).

Algunos trabajos (Lewis, 1966; White, 1978; Templeton, 1981; Grant, 1981; Baker y Bickman, 1986; Rieseberg, 2001) apuntan a que, por medio de diferentes mecanismos, las reorganizaciones cromosómicas tienen un papel importante en los procesos de especiación. White (1978) les atribuye un papel fundamental e imprescindible, incluso hablando de un modelo de especiación llamado estasisipátrico; otros autores (Grant, 1981; King, 1993; Futuyma y Mayer, 1980; Sites y Moritz, 1987; Coyne y Orr, 1998), sin embargo, le restan importancia y lo consideran un fenómeno secundario en el proceso y posterior al evento de especiación.

El principal mecanismo por el que las reorganizaciones cromosómicas contribuyen a la formación de nuevas especies es la disminución de la viabilidad reproductiva de los híbridos entre los individuos con cariotipo normal y aquellos que presentan la reorganización (Searle, 1998), al verse reducida su fertilidad a causa de las dificultades meióticas que presentan los híbridos del sexo heterogamético (hecho conocido como la Regla de Haldane: “si uno de los dos sexos es inviable, siempre es el heterogamético”). Además, Rieseberg (2001) atribuye a la supresión de la recombinación meiótica en estos híbridos un papel primario en el proceso de especiación, al disminuir el flujo génico entre regiones cromosómicas de mayor tamaño del logrado por cualquier otro mecanismo. Esto puede facilitar la persistencia y posterior especiación de especies incipientes en parapatría en contacto con la especie progenitora.

Existen diferentes modelos que explican el papel de las reorganizaciones cromosómicas en los fenómenos de especiación (Lewis, 1966; White, 1978; Templeton, 1981; Grant, 1981; Baker y Bickman, 1986). Generalmente muestran escenarios con poblaciones pequeñas y con un alto índice de endogamia, en las que la deriva genética cuenta con un papel primario en las frecuencias alélicas, y aisladas geográficamente de la población parental. Algunos modelos sugieren que las reorganizaciones cromosómicas pueden conferir a los individuos que las portan ventajas adaptativas que les permitan colonizar nuevos hábitats (modelo de especiación cuántica: Grant, 1981) o incluso invadir el hábitat de la forma parental (modelo de especiación estasisipátrica: White, 1978).

1.1.3.- Estudios citogenéticos en coleópteros

Los coleópteros han sido abordados desde el punto de vista citogenético. Smith y Virkki (1978) recopilan información del cariotipo y del mecanismo de determinación cromosómica del sexo de 2160 especies. Estudios posteriores (revisión en Schneider *et al.*, 2004) recopilan información de otro marcador cromosómico, la localización de los genes ribosomales, en un total de 196 especies diferentes. Estos trabajos se refieren a la descripción del número cromosómico y del sistema de cromosomas sexuales. Eduard Petitpierre aborda en una revisión (Petitpierre, 1996) el conjunto de técnicas utilizadas actualmente para estudiar los cromosomas en coleópteros: hibridación *in situ* fluorescente para localizar ADN satélite o los genes ribosomales, digestión de los cromosomas con endonucleasas de restricción *in situ* o la localización de regiones enriquecidas en AT o CG mediante fluorocromos.

1.1.4.- Métodos filogenéticos

Actualmente nos encontramos con tres principales métodos (Felsenstein, 2004; Templeton, 2006) para reconstruir las relaciones de parentesco entre organismos: gradistas, fenéticos y filogenéticos.

Los primeros agrupan a los taxones en base a sus relaciones genealógicas y el grado de diferencia entre ellos, admitiendo en algunos casos la validez de grupos parafiléticos.

Los métodos fenéticos, también llamados numéricos, realizan la clasificación según la similitud entre los taxones basándose en una matriz de caracteres, obteniendo un fenograma a través del análisis de ésta. Los taxones se agrupan en base a su parecido global, sin tener en cuenta la mayor o menor importancia de cada carácter individual. Además, según el algoritmo empleado para analizar la matriz de datos los resultados pueden variar. Un ejemplo de método fenético es el análisis de Neighbor-Joining.

Los métodos filogenéticos o cladísticos basan la clasificación de los organismos en las relaciones genealógicas que se presentan entre ellos. A partir de la matriz de caracteres se obtiene un cladograma. Los agrupamientos que son soportados por caracteres son considerados clados. Los clados, que por definición corresponden siempre a grupos monofiléticos, son los únicos grupos válidos. Ejemplos de métodos filogenéticos son los análisis de Máxima Parsimonia, el análisis de

Máxima Verosimilitud o la Inferencia Bayesiana.

1.1.4.1.- Métodos fenéticos: Análisis de Neighbor-Joining

El análisis de Neighbor-Joining (“vecino más próximo”) es un método de reconstrucción de filogenias basado directamente en la matriz de distancias genéticas contruida a partir de la matriz de datos de secuencias. El árbol se construye uniendo consecutivamente aquellos taxones con menor valor de distancia entre ellos. Cuando dos taxones son agrupados, se transforman a efectos de la construcción del árbol en un nuevo clado cuya distancia al resto será la mayor de sus dos componentes.

Se trata de un análisis que, aunque no proporciona resultados con una elevada fidelidad, nos permite tener de una forma sencilla y rápida una aproximación a la estructura filogenética de nuestras muestras analizadas. Suele emplearse por lo tanto como punto de partida para posteriores análisis filogenéticos.

1.1.4.2.- Análisis Cladístico: Máxima Parsimonia.

El análisis de Máxima Parsimonia es un test estadístico no paramétrico que se basa en la búsqueda del árbol más parsimonioso, es decir, aquel en el que el número de pasos necesarios para explicar nuestra matriz de datos sea menor.

Para ello utiliza los caracteres filogenéticamente informativos, definidos como aquellos que presentan al menos dos estados diferentes en la matriz de datos, estando cada uno de ellos presente en al menos dos taxones.

El análisis selecciona finalmente el árbol cuya longitud sea menor, siendo la longitud del árbol la suma de los pasos necesarios para explicar cada uno de los caracteres.

1.1.4.3.- Test de bootstrap

El test de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) supone un método para evaluar la fidelidad del árbol evolutivo que hemos obtenido mediante Neighbor-Joining o Máxima Parsimonia, significando su valor la probabilidad de que un determinado nodo sea real en la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein y Kishino, 1993).

El test de *bootstrap* toma una serie de caracteres de la matriz elegidos al azar en cada una de sus réplicas, y realiza el análisis que hemos programado en cada réplica. Al final determina el porcentaje de réplicas en las que un nodo determinado aparece idéntico al obtenido en el análisis principal, siendo el resultado el valor de *bootstrap* para ese nodo.

Con esto podemos determinar qué nodos de nuestro árbol son realmente fiables y cuáles pueden haberse visto influidos por relaciones erróneas derivadas del análisis estadístico, el cual no puede determinar por ejemplo la existencia de reversiones a un estado ancestral, fenómenos de convergencia u otras perturbaciones.

1.1.4.4.- Análisis Bayesiano.

El análisis bayesiano utiliza el teorema de Bayes para inferir la filogenia de un grupo de taxones basándose en la probabilidad de que cada árbol sea correcto según las observaciones (caracteres).

Este análisis se realiza por aplicaciones informáticas que crean un espacio multidimensional en el que ubican todos los árboles posibles. El programa toma un árbol al azar y calcula la probabilidad de que refleje la historia evolutiva verdadera de los taxones analizados. Posteriormente evalúa los árboles más cercanos a éste, y prosigue con este protocolo siempre en la dirección en la que la probabilidad va creciendo. Al mismo tiempo, las llamadas “columnas calientes” analizan árboles al azar tomados de otras regiones alejadas del espacio, evitando así que el análisis quede enclavado en un pico de probabilidad diferente al correcto.

1.1.5.- Filogeografía: construcción de redes haplotípicas

A la hora de determinar las relaciones evolutivas intraespecíficas, los métodos filogenéticos pueden mostrar relaciones erróneas e inducir a error, ya que no utilizan toda la información disponible, debido al hecho de que aquellas posiciones en las que todos los taxones comparten la misma base en una determinada posición y sólo uno difiere las consideran filogenéticamente no informativas. Al trabajar a este nivel conviene utilizar métodos filogeográficos, que van a utilizar todas las diferencias entre haplotipos. La filogeografía se basa en tres ideas básicas (Avise *et al.*, 1987):

- Las especies suelen presentar estructura poblacional, es decir, los clados filogenéticos se muestran separados geográficamente.
- El grado de estructuración de la red de poblaciones es inversamente proporcional al flujo genético entre las diferentes localidades donde se halla la especie, lo cual depende de la capacidad de dispersión de los individuos y de la existencia de barreras geográficas.
- El aislamiento de las poblaciones conlleva a la formación de grupos bien diferenciados y con monofilia recíproca.

La filogeografía representa la estructura geográfica y las relaciones interpopulacionales dentro de una especie de forma más fiable que los métodos filogenéticos.

El análisis cladístico anidado colapsa la matriz de secuencias en haplotipos, definidos como una secuencia única que se presenta al menos en un individuo, para posteriormente inferir las relaciones filogeográficas entre ellos. El resultado es una red en la que los diferentes haplotipos aparecen separados por tantos nodos como mutaciones hayan sido necesarias para que uno dé lugar al otro. La visión global de la red haplotípica nos permite hacernos una idea de las relaciones entre las diferentes poblaciones de la especie.

Este análisis ha sido ampliamente utilizado en estudios moleculares con diversos grupos de coleópteros, tal como es el caso del género *Timarcha* (Gómez-Zurita *et al.*, 2000; Figura 1.1) o la especie amenazada *Ochtebius glaber* (Abellán *et al.*, 2006).

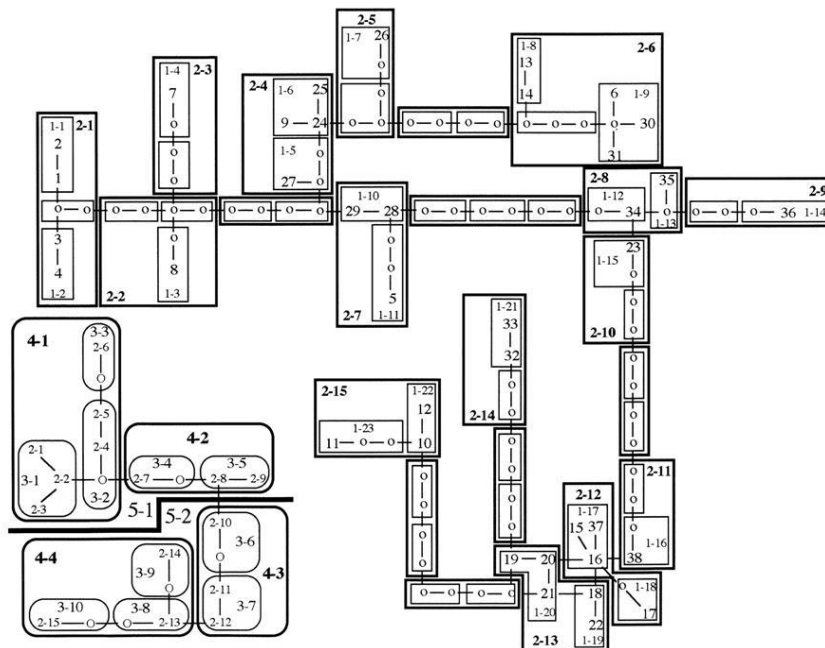


Figura 1.1: Ejemplo de análisis cladístico anidado: árbol de haplotipos de *Timarcha goettingensis* (Gómez-Zurita *et al.* 2000).

1.1.6.- Código de barras de ADN y taxonomía de ADN

El uso de fragmentos de ADN y su comparación en bases de datos para la identificación de los organismos, herramienta conocida como “DNA-barcoding” o código de barras de ADN, fue propuesto por Hebert *et al.* (2003). El método consiste en realizar un análisis de Neighbor-Joining con taxones conocidos y desconocidos, e identificar estos últimos con el taxón conocido más estrechamente relacionado con cada uno de ellos.

Las secuencias de los taxones de referencia pueden obtenerse desde bases de datos públicas, como GenBank. No obstante, debemos recordar que las bases de datos de las cuales podemos obtener las secuencias de taxones conocidos no incluyen a la totalidad de las especies, lo que puede llevarnos a identificaciones incorrectas por ausencia del taxón al que corresponde nuestro organismo problema. Esto hace que en grupos poco estudiados molecularmente, así como en aquellos con una elevada tasa de especiación, la fiabilidad de esta herramienta no sea suficientemente aceptable; debido a ello y en tanto no estén todos los taxones representados en la base de datos es recomendable trabajar con secuencias propias, como complemento a las obtenidas en dichas bases. En la figura 1.2 se muestra un esquema del protocolo a seguir en un estudio de taxonomía del ADN.

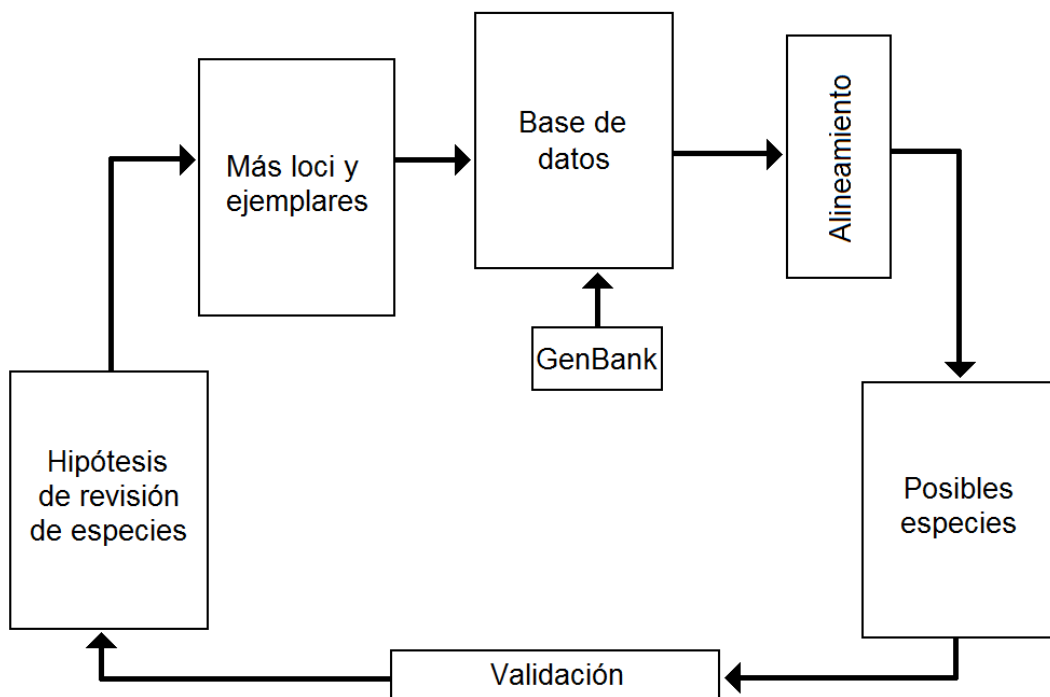


Figura 1.2: Esquema del funcionamiento de la taxonomía del ADN; modificado de Vogler y Monaghan (2007).

En la figura 1.3 se muestra un caso hipotético de aplicación de la taxonomía de ADN para poner a prueba la hipótesis basada en caracteres morfológicos, que considera la existencia de dos especies. El análisis de ADN revela la existencia de al menos tres especies. El agrupamiento 1 corresponde a una de las especies tradicionalmente reconocidas como tal en base a la morfología (especie 1). Los agrupamientos 2 y 3 podrían constituir dos especies crípticas puestas de manifiesto en el estudio molecular. Los números en negrita corresponden a ejemplares recolectados en un estudio de biodiversidad que han sido asignados a sus respectivas especies mediante código de barras de ADN. El individuo 21 no puede ser asignado a ninguno de los agrupamientos; esto puede ser debido a problemas con el marcador elegido, el algoritmo utilizado o fenómenos como hibridación o introgresión. Otra posibilidad es que el individuo 21 represente una entidad separada y muestreada una sola vez.

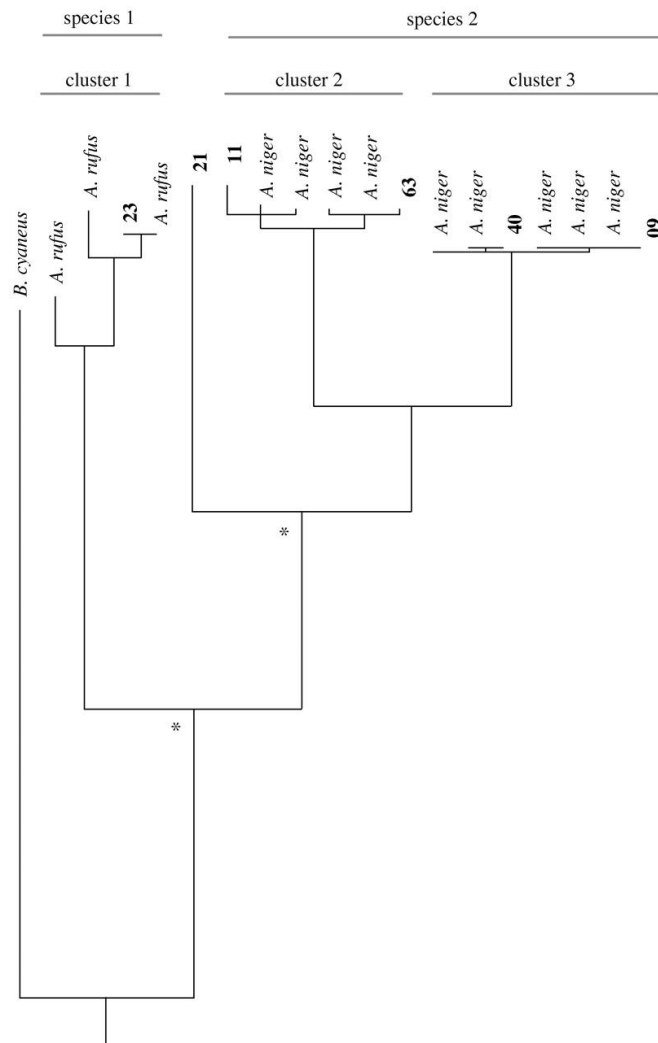


Figura 1.3: Caso hipotético de aplicación de la taxonomía de ADN. Véanse los detalles en el texto. Tomado de Savolainen et al. (2005).

Actualmente hay taxónomos partidarios de utilizar exclusivamente la taxonomía del ADN, mientras que otros abogan por mantener el uso de caracteres morfológicos como método preferente

para abordar la taxonomía de un grupo de organismos. Sin embargo, a menudo ambos criterios convergen, como es el caso de la especie 1 del ejemplo, y en los casos en los que no hay concordancia la taxonomía de ADN nos pone de manifiesto situaciones que deben ser investigadas desde distintos enfoques, entre los cuales no debe excluirse el morfológico.

1.1.7.- El ADN mitocondrial

Una herramienta que ha demostrado ser de gran utilidad para estudiar la filogeografía y la filogenia a nivel de especies próximas es el ADN mitocondrial (Avice, 2000). La importancia de esta molécula en este ámbito se debe a una serie de características que la diferencian del ADN nuclear:

- a) Carece de regiones de ADN repetitivo, intrones, pseudogenes, transposones y demás secuencias que puedan influir en estos estudios.
- b) Se presenta en gran número en cada una de las células; esto permite obtener mejores resultados al extraer el ADN o amplificarlo mediante PCR.
- c) Presenta herencia uniparental, por lo que no presenta recombinación (Avice *et al.*, 1987).
- d) Su tasa de mutación es diez veces superior a la del ADN nuclear (Hewitt, 2004), requiriendo menor tiempo evolutivo para que la diferenciación entre linajes quede reflejada en esta molécula.

No obstante, por otro lado presenta también una serie de desventajas que limitan su utilidad:

- a) Debido a su elevada tasa de mutación, se llega rápidamente a la saturación de las secuencias; es decir, que pueden producirse múltiples mutaciones en una misma posición nucleotídica, fenómeno conocido como homoplasia.
- b) La posible presencia de fenómenos de heteroplasma u homoplasma que puedan interferir en los resultados (Avice *et al.*, 1987).
- c) La mayor sensibilidad a los procesos de selección (Hey, 1997).

Estos inconvenientes pueden reducir la fiabilidad de los nodos más basales del árbol, como los indicados con un asterisco en la figura 1.3.

Una de las secuencias del ADN mitocondrial más utilizadas para reconstrucción filogenética y estudios de taxonomía de ADN ha sido la del gen de la citocromo oxidasa I (COI); no obstante ciertos estudios recientes (Vialle *et al.*, 2009) ponen en duda su idoneidad para estudios de código de barras de ADN, proponiendo como alternativa genes como los de la subunidad 6 de la ATPasa, la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa o la citocromo oxidasa III (coxIII).

1.2.- Los cicindélidos o escarabajos tigre.

De entre todos los órdenes de insectos, los coleópteros constituyen, con cerca de 400000 especies descritas en todo el planeta y un número igual o mayor de especies aun no conocidas, el orden más numeroso del reino animal, y una cuarta parte de todas las especies conocidas (Hunt *et al.*, 2007). La enorme diversidad de especies se traduce en una extraordinaria diversidad ecológica y morfológica, por lo que se encuentran en la gran mayoría de los ecosistemas terrestres, y en los de aguas continentales. Un grupo peculiar dentro del orden Coleoptera son los cicindélidos, conocidos comunmente como “escarabajos tigre” por su nombre inglés (*tiger beetles*). Éstos constituyen uno de los grupos más extensamente estudiados de escarabajos para conocer su sistemática, su biología, su ontogenia, su ecología, su comportamiento, su distribución geográfica, su cariotipo y su filogenia (Pearson *et al.*, 1988; Knisley y Schultz, 1997; Pearson y Vogler, 2001; Galián *et al.* 2007 y referencias allí citadas). Hasta el momento, se han descrito unas 2300 especies de cicindélidos (Pearson y Vogler, 2001). Éstos se encuentran distribuidos sobre toda la superficie terrestre, exceptuando la Antártida, el Ártico norte por encima de 65° de latitud, Tasmania y algunas islas oceánicas tales como Hawái y las Maldivas. Se encuentran en un rango altitudinal desde el nivel del mar hasta los 3500 metros ocupando diversos ambientes. Algunas especies tienen gran valor como indicadores ecológicos debido a su estrecha relación con hábitats específicos. Con sus colores a menudo llamativos, un comportamiento peculiar y su habilidad para vivir en hábitats tan diversos como prados alpinos, desiertos, selvas tropicales y océanos, los escarabajos tigre, han despertado siempre una gran curiosidad entre científicos y aficionados. Se trata de un grupo muy rico en especies con gran capacidad de repartirse temporal y espacialmente los hábitats para evitar competencia.

Ciertas características distinguen a los cicindélidos (Figura 1.4) del resto de adéfagos, suborden al que pertenecen:

- 1) Largas mandíbulas en forma de hoz.
- 2) Dientes simples alineados en el borde interior de la mandíbula con un agregado (“molar”) en la porción interior proximal de cada una.
- 3) Cuerpo alargado, con cabeza y ojos más anchos que el tórax (son cazadores que se guían principalmente por la vista).
- 4) Largas patas marchadoras.
- 5) Comportamiento constructor de túneles de la larva.



Figura 1.4: Primer plano de un cicindélido adulto (izquierda, fotografía de Igor Siwanowicz), un túnel de larva (centro) y una larva obstruyendo la entrada a su túnel con su cabeza (derecha, fotografías de A.J. Silverside).

El estadio adulto de las especies de cicindélidos, sobre todo en las tribus Cicindelini y Megacephalini, presenta grandes similitudes en cuanto a morfología externa, proporciones y comportamiento. Las variaciones se refieren principalmente al tamaño, que varía de 5 mm a más de 4 cm; al color, observándose muchas especies de color negro brillante y otras con varias combinaciones, también brillantes, de diversas tonalidades de verde, violeta, azul, rojo y amarillo. Muchas especies tienen cuerpos cilíndricos y largas patas finas para correr rápidamente por tierra o entre la vegetación.

Los adultos tienen alas transparentes funcionales plegadas y ocultas bajo los élitros, que cubren la parte superior del abdomen y se abren para permitir el vuelo. Las alas son usadas para huidas de los depredadores, siempre cortas y a baja altura. Algunas especies las usan para dispersarse a gran distancia, mientras que otras carecen de ellas y son completamente terrestres (Pearson y Vogler, 2001).

Los cicindélidos son animales ectotérmicos, cuyo límite superior de temperatura se encuentra alrededor de los 47 o 49°C. Algunas especies nocturnas tienen mecanismos para mantener la temperatura corporal en ausencia de radiación solar. Otras combaten el exceso de calor mediante iridiscencia, sedas o modificando la relación superficie/volumen o la cutícula (espesor, proporción de lípidos, etc.). También evitan el sobrecalentamiento mediante la posesión de largas patas, buscando sustratos húmedos o encarándose al Sol para reducir la superficie expuesta (Pearson y Vogler, 2001).

1.3.- Posición sistemática de los cicindélidos dentro de la familia Carabidae.

Algunos autores incluyen a los cicindélidos como un subgrupo (subfamilia Cicindelinae o tribu Cicindelini) dentro de la familia de los carábidos (Jeannel, 1942). Muchos entomólogos, sin embargo, consideran que los cicindélidos forman su propia familia: Cicindelidae. Los sistemáticos aceptan que, donde quiera que se emplacen, los cicindélidos comparten muchos caracteres y están muy relacionados con los carábidos, ditíscidos, girínidos y halíplidos (Pearson y Vogler, 2001).

Diversos trabajos de filogenia molecular parecen indicar que los cicindélidos se emplazan dentro de la familia de los carábidos, como los análisis realizados con secuencias del rRNA 18S (Shull *et al.*, 2001), 16S y 28S (Maddison *et al.*, 2009; Figura 1.5). Estos trabajos muestran que los carábidos sólo forman un grupo monofilético si consideramos a los cicindélidos y a otros grupos, como la subfamilia Rhysodinae y la familia Trachypadidae, como pertenecientes a este grupo; entonces la familia Carabidae equivaldría al grupo llamado Geadephaga (Maddison *et al.*, 2009).

1.4.- Filogenia de los géneros de cicindélidos.

Dentro de los cicindélidos, no obstante, las relaciones parecen estar relativamente claras tras diversos trabajos publicados sobre este tema (Vogler y Pearson, 1996; Galián *et al.* 2002). Encontramos un grupo tempranamente separado del resto formado por las tribus Mantichorini y Omini. La tribu Megacephalini resulta ser un grupo parafilético, intercalándose dentro de ella la subfamilia Collyrinae. La taxonomía de los Megacephalini debe ser revisada, para clarificar esta situación. La tribu Cicindelini, por otro lado, es el grupo más derivado y reciente; además representa un linaje monofilético (Figura 1.6).

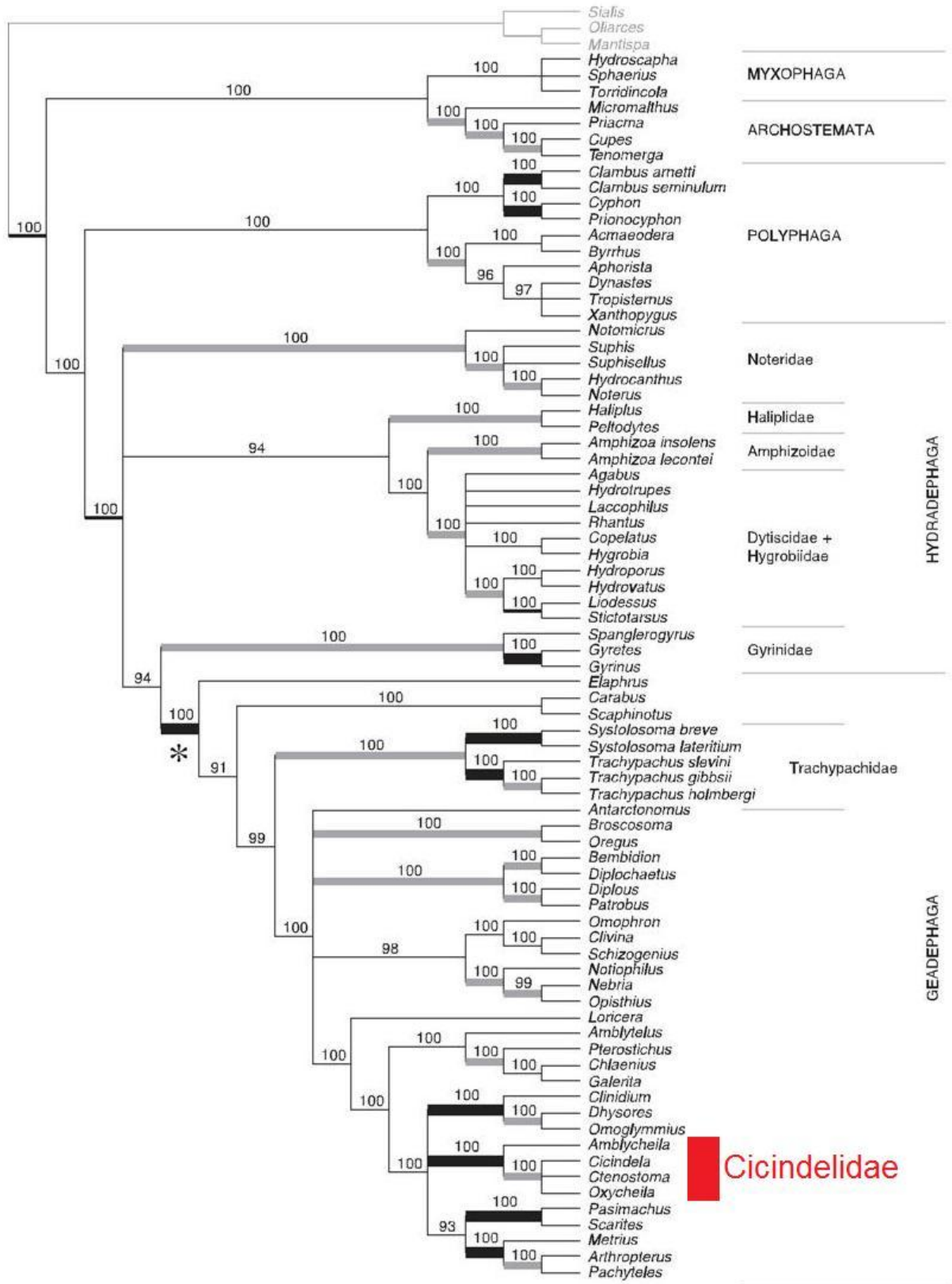


Figura 1.5: Arbol de Inferencia Bayesiana de la familia Carabidae, en el que se resalta la posición de los cicindélidos. Tomado de Maddison et al., (2009).

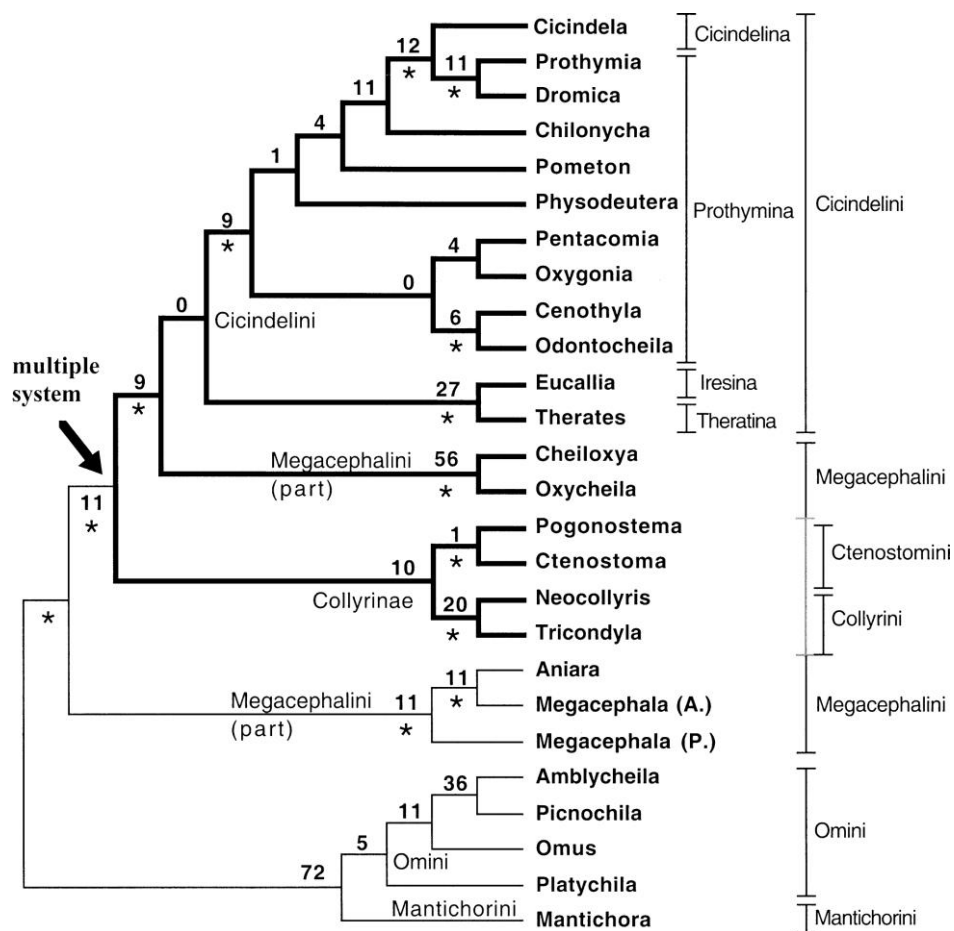


Figura 1.6: Hipótesis filogenética de las relaciones de los Cicindelinae a partir de secuencias de ARNr 18S. Tomado de Galián et al., (2002).

1.5.- Análisis citogenético en los cicindélidos

Dentro del grupo de los Cicindélidos nos encontramos una amplia variedad cariotípica, tanto en el número de autosomas como el de heterosomas, y por lo tanto en el sistema de determinación cromosómica del sexo.

El número de autosomas se mantiene entre 9 y 21 pares (Galián *et al.*, 2002), siendo generalmente mayor en los grupos más basales del árbol filogenético obtenido por datos moleculares, y observándose una tendencia a la reducción en la tribu Cicindelini. Así mismo, el grupo de los Cicindelini presenta un sistema de determinación del sexo mediante cromosomas sexuales múltiples, no presente en ningún otro grupo de esta familia y cuya fórmula puede expresarse como X_nY para los machos y X_nX_n para las hembras, variando n entre 1 y 4. Además, estos cromosomas sexuales no realizan recombinación en meiosis, tal como se deduce de la ausencia de quiasmas en la vesícula sexual; hecho confirmado por Giers (1977) en *Cicindela hybrida*, analizando los complejos sinaptinémicos. Este sistema de cromosomas sexuales múltiples

tiene un origen que se remonta a más de 100 millones de años en el pasado (Galián *et al.*, 2002).

El hecho de que los cromosomas sexuales de los Cicindelini no presenten quiasmas implica una ausencia de recombinación entre los cromosomas X en el sexo masculino. Así, los cromosomas X sólo presentan recombinación en hembras. Uniendo este hecho a la presencia de translocaciones de genes entre autosomas y heterosomas (Galián *et al.*, 2007) la viabilidad de los híbridos entre diferentes razas cromosómicas se ve drásticamente reducida paralelamente a la reducción de los niveles de recombinación, mecanismo que según diversos autores (Rieseberg, 2001; Navarro y Barton, 2003) facilita la fijación de las alteraciones cariotípicas en las poblaciones.

Por otro lado, dentro del grupo de los Megacephalini nos encontramos con números cromosómicos que varían desde 12 hasta 15 pares de autosomas más un sistema simple de heterosomas, del tipo XY o X0 (en machos) (Serrano *et al.*, 1986; Galián y Hudson, 1999; Proença *et al.*, 2003, Proença *et al.*, 2005).

1.6.- Filogenia molecular en la tribu Megacephalini

La tribu Megacephalini, de distribución pantropical, tuvo su origen antes de la fragmentación de Gondwana, hace aproximadamente 100 millones de años, durante el período Cretácico. Este hecho viene apoyado por los datos moleculares, ya que los clados americano y australiano resultan formar un grupo monofilético (Zerm *et al.* 2007; Figura 1.7).

Inicialmente se separó un grupo de especies que permaneció en lo que en la actualidad es África, Oriente Medio y la región mediterránea, comprendiendo los actuales géneros *Megacephala* y *Grammognatha*. El resto se dividió en dos grupos: uno (formado por los géneros *Tetracha*, *Metriocheila*, *Phaeoxantha* y *Aniara*) quedó en la actual Sudamérica, aunque algunas especies han alcanzado Norteamérica; el otro quedó aislado en Australia cuando este continente se separó de la masa de tierra original que formaba Gondwana.

Las especies australianas de la tribu Megacephalini conforman un grupo monofilético (Zerm *et al.* 2007), siendo los géneros *Australicapitona* y *Pseudotetracha* grupos hermanos, cada uno de ellos también monofilético.

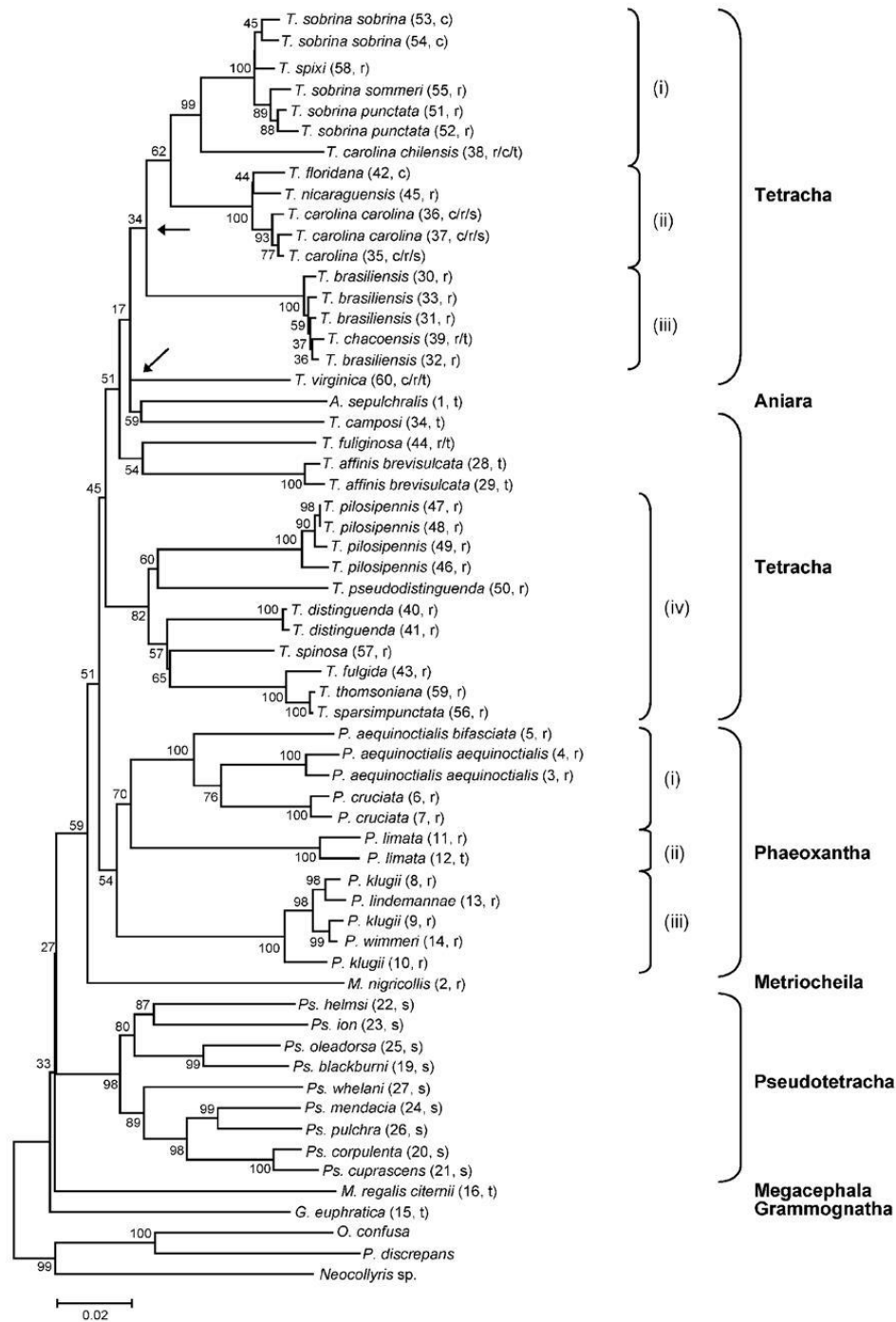


Figura 1.7: Reconstrucción filogenética obtenida por inferencia Bayesiana de los genes *coxIII*, *16S* y *18S*. Tomado de Zerm *et al.* (2007).

No obstante, los resultados obtenidos por Zerm *et al.* (2007) tras un análisis molecular del género *Pseudotetracha* no concuerdan con la literatura publicada basada en análisis morfológicos, al separar a la especie *P. blackburni* de otras especies (*P. mendacia*, *P. corpulenta* y *P. cuprascens*), con las que según algunos autores (Sumlin, 1997) forma un complejo de especies muy relacionadas (complejo *blackburni/murchisona*). Otras incongruencias con los caracteres morfológicos son la separación de las especies supuestamente relacionadas *P. ion* y *P. whelani* (Sumlin, 1997) o la de *P. helmsi* y *P. oleadora* (McCairns, 1997).

1.7. El género *Pseudotetracha* Fleutiaux, 1894

El género *Pseudotetracha*, descrito por Fleutiaux, fue considerado subgénero de *Megacephala* en la revisión realizada por Horn (1910), pasando de nuevo a la categoría de género en la revisión de Huber (1994). Posteriormente, Sumlin (1997) en su revisión basada en datos morfológicos vuelve a considerarla como un subgénero, y es en el trabajo de Zerm *et al.* (2007) cuando es de nuevo considerado a nivel de género utilizando datos moleculares.

Se encuentra constituido por 19 especies (Sumlin, 1997), aunque sólo están bien conocidas, con pocas excepciones, aquellas cuya distribución se incluye en el territorio de Australia Occidental. En el resto de territorios australianos la información de la que se dispone es escasa, hecho que, junto a los hábitats remotos en los que estos organismos suelen encontrarse, lleva a pensar en la posible existencia de un gran número de especies pertenecientes a este género desconocidas para la ciencia (Anexo II).

Este género puede diferenciarse fácilmente del otro género de Megacephalini australiano, *Australicapitona* Sumlin, 1992, observando el margen de sus élitros: mientras que en *Australicapitona* éste está recorrido en toda su longitud por un borde testáceo (no esclerotizado), en *Pseudotetracha* este borde se limita como máximo a la mitad apical, pudiendo existir especies como *P. blackburni* en las que no se halla presente (Sumlin, 1997).

Para la realización de este trabajo contamos con ejemplares de tres especies de *Pseudotetracha*:

P. australis (Chaudoir, 1865) (Figura 3.2, centro) se distingue de las otras dos en poseer una amplia zona testácea en sus élitros. Se distribuye por el centro, sur y este del continente australiano (Figura 1.11), ocupando hábitats riparios y lagos salinos (Figura 1.8). El adulto es depredador nocturno de otros insectos e invertebrados. La larva, como es común en cicindélidos, habita en túneles desde donde tiende emboscadas a sus presas.

P. blackburni (Fleutiaux, 1895) (Figura 3.2, izquierda), sin ápice testáceo, ocupa un área de distribución que se extiende por la mitad occidental de Australia (Figura 1.11). Se trata de una especie terrestre y nocturna, habitante de zonas riparias y lagos salinos (Figura 1.9).



Figura 1.8: El Lago Pink casi seco, situado junto a la costa.



Figura 1.9: Vista del Lago Gilles en su estado normal (superior), con una costra de sal cubriendo toda su superficie; y tras unas lluvias (inferior).

P. whelani Sumlin, 1992 (Figura 3.2, derecha) posee un delgado margen testáceo en el ápice de sus élitros. El adulto es depredador nocturno, habitante de lagos salinos y zonas riparias (Figura 1.10). La larva, al igual que la de las especies anteriores, presenta las características típicas de la larva de cicindélidos. Esta especie sólo se conoce en Australia del Sur (Figura 1.11).



Figura 1.10: El Lago Hart seco (superior) y el Lago Gairdner completamente lleno de agua tras unas lluvias (inferior).

Los lagos salinos australianos, en los que habitan estas especies, conforman unos hábitats con unas condiciones de aridez muy acentuadas. Permanecen completamente secos durante largos periodos de tiempo, llenándose tan solo ante la ocasional llegada de precipitaciones torrenciales. De hecho algunos lagos, como el Lago Eyre, tan solo se han llenado dos veces a lo largo de todo el siglo XX.

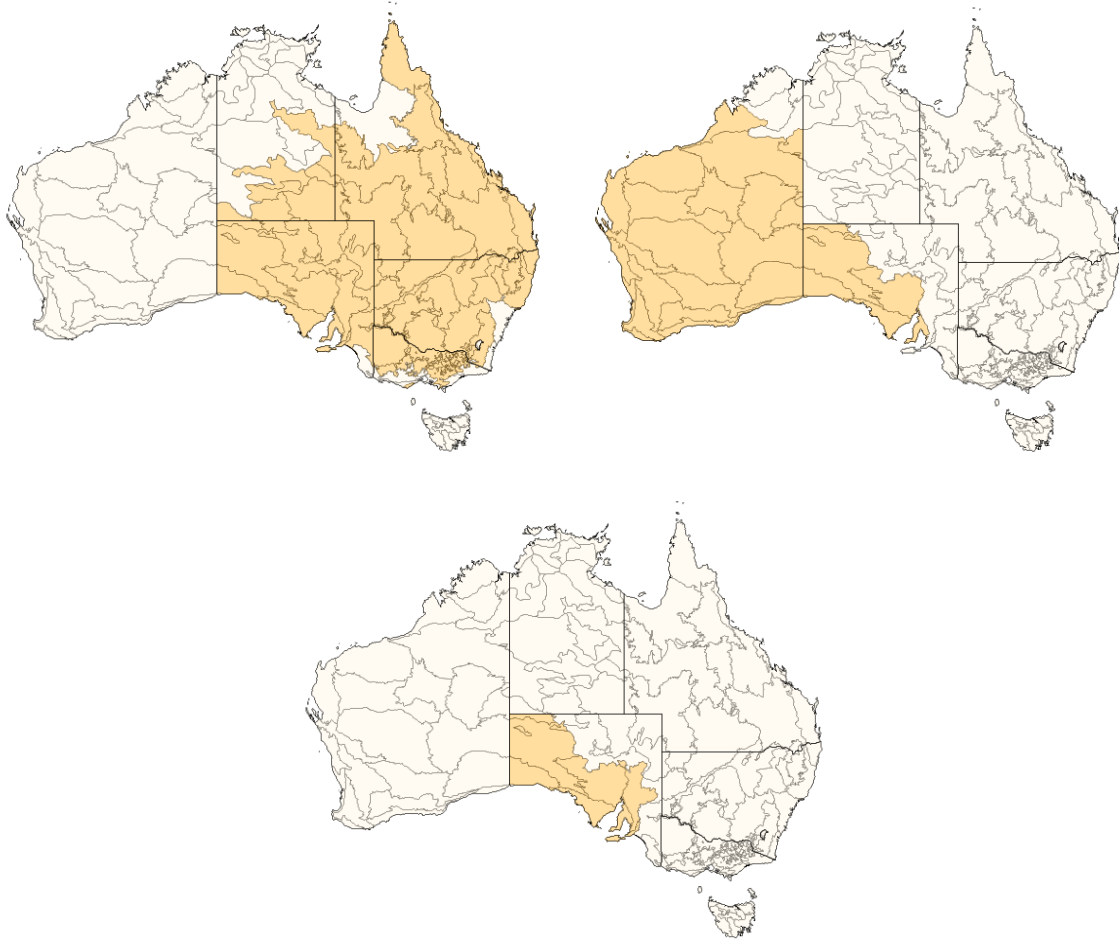


Figura 1.11: Mapas de distribución basados en los lugares de captura de los ejemplares en colecciones para las especies (de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo) *P. australis*, *P. blackburni* y *P. whelani* (Fuente: Australian Faunal Directory).

2.- Objetivos e hipótesis de partida

El género *Pseudotetracha* conforma un grupo monofilético de radiación australiana con especies y grupos de especies distribuidas en torno a los lagos del continente australiano. Esta circunstancia hace que el género constituya un buen modelo para contrastar hipótesis citogenéticas, filogenéticas o filogeográficas.

De acuerdo con Galián *et al.* (2002) el sistema de cromosomas sexuales múltiples de tipo aquiasmático descrito en la subfamilia Cicindelinae, está presente únicamente en la tribus Cicindelini y Collyrini, y no ha sido descrito hasta el momento en especies de la tribu Megacephalini. El análisis cariotípico de las tres especies analizadas aportará nuevos datos cromosómicos al escaso número de especies de la tribu Megacephalini analizadas citogenéticamente hasta el momento y permitirá contrastar la hipótesis de Galián *et al.* (2002) sobre el origen único de los cromosomas sexuales múltiples de naturaleza aquiasmática en los cicindélidos. Por otra parte al análisis citogenético a nivel poblacional en poblaciones geográficamente cercanas permitirá detectar variantes cariotípicas y reorganizaciones que contribuyan a inferir patrones de cambio evolutivo a nivel cariotípico y analizar su relación con la especiación.

El análisis filogeográfico permite deducir patrones de asociación geográfica de la variabilidad haplotípica e inferir las causas históricas que puedan explicarla. La generación de una red haplotípica permitirá poner a prueba las hipótesis planteadas en base a las diferencias cariotípicas observadas.

El análisis filogenético del fragmento de la citocromo oxidasa III de los taxones estudiados en este trabajo conjuntamente con las secuencias disponibles en la base de datos permitirá poner a prueba hipótesis planteadas por Zerm *et al.* (2007) sobre relaciones de parentesco entre los taxones en estudio, en particular las relativas al complejo *blackburni/murchisona*. En este grupo la hipótesis propuesta por Sumlin (1997) basada en datos morfológicos difiere de la hipótesis propuesta por Zerm *et al.* (2007) utilizando datos moleculares. Adicionalmente el análisis de las secuencias bajo el enfoque de la taxonomía del ADN proporcionará información acerca de la posible existencia de taxones que puedan haber pasado desapercibidos a los estudios taxonómicos basados en la morfología.

Para poner a prueba las hipótesis anteriormente mencionadas, se plantean los siguientes objetivos:

- a) Análisis citogenético de poblaciones de tres especies del género *Pseudotetracha* de Australia
- b) Análisis filogenético y filogeográfico de estas poblaciones utilizando un fragmento del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa III.
- c) Interpretación de los datos cromosómicos en base a los resultados de la filogenia y la filogeografía.
- d) Interpretación de los datos obtenidos en el contexto de las hipótesis propuestas acerca del complejo *blackburni/murchisona*.
- e) Análisis de las implicaciones taxonómicas de la hipótesis filogenética planteada desde la perspectiva de la taxonomía del ADN.

3.- Material y métodos

3.1.- Recolección del material

El material empleado en este estudio fue recolectado por Eduardo Díaz y Peter Hudson (South Australian Museum), en diversas localizaciones de Australia del Sur, durante los meses de marzo y abril del año 2004 (Tabla 1) mediante captura directa con manga entomológica.

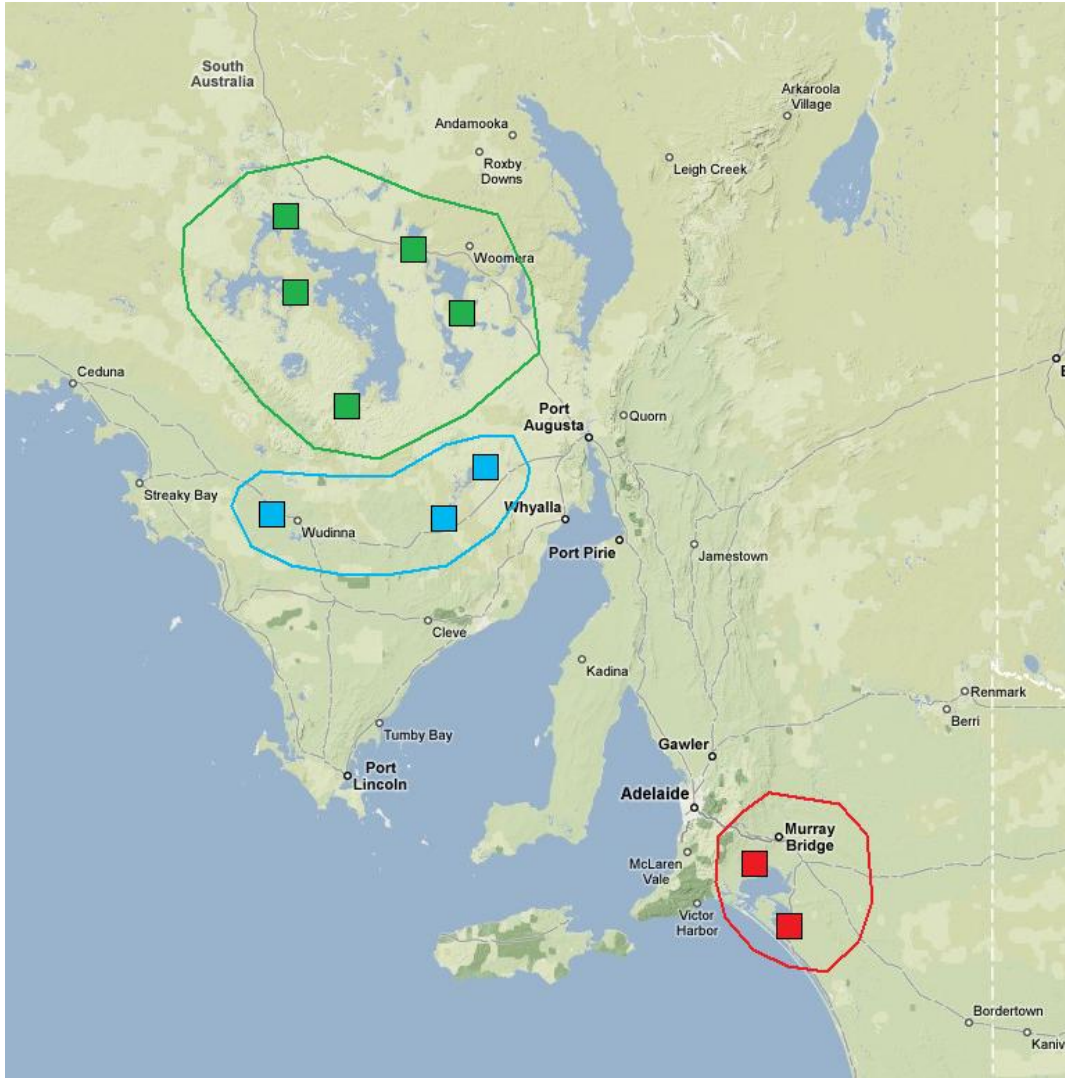


Figura 3.1: Mapa del área de estudio, marcando la posición de las localizaciones de recolección (cuadrados). En color se muestra la especie hallada en cada punto (rojo: *P. australis*; azul: *P. blackburni*; verde: *P. whelani*).

En total fueron capturados 89 ejemplares pertenecientes a la tribu Megacephalini (género *Pseudotetracha*, dentro del antiguo género *Megacephala*), que se incluyen en tres especies según la clave de determinación de Sumlin (1997). En la figura 3.2 se muestra un ejemplar de cada una de estas tres especies.

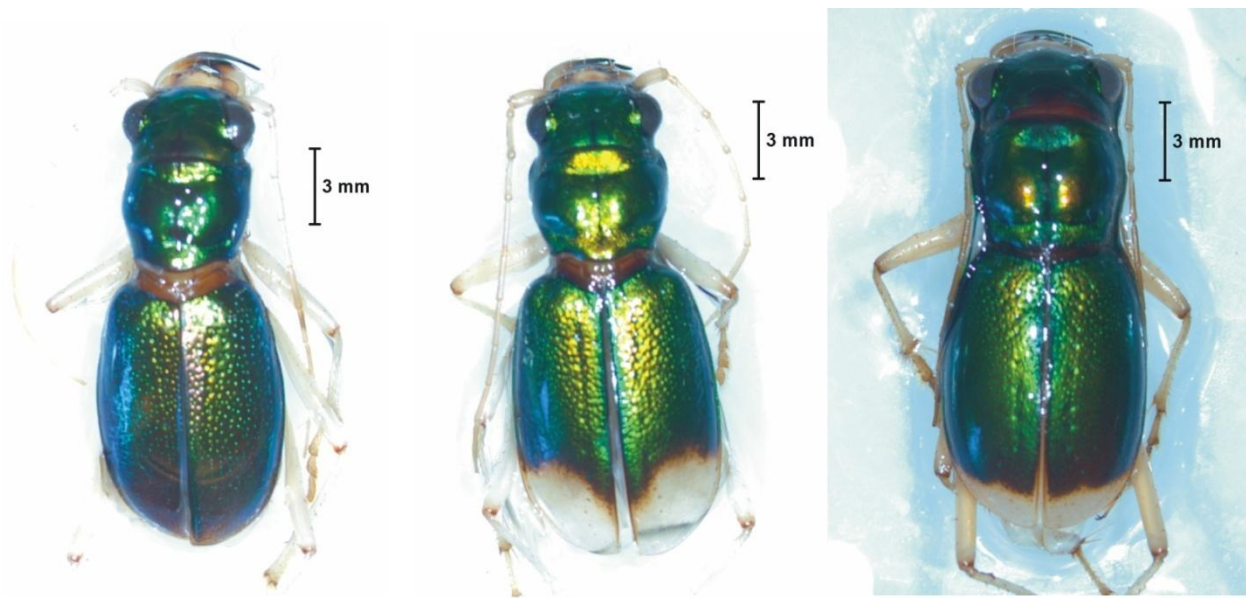


Figura 3.2: De izquierda a derecha, *P. blackburni* (ejemplar número 39), *P. australis* (ejemplar número 146) y *P. whelani* (ejemplar número 210). Se observan las características de los élitros (puntuadura, y extensión y forma del ápice testáceo) que empleamos para su identificación (Sumlin, 1997).

Cada ejemplar fue anestesiado mediante acetato de etilo. Una vez dormido se le abrió el abdomen para extraer la gónada, procurando que el daño fuera mínimo. Los órganos extraídos fueron fijados y almacenados con fijador de Carnoy (disolución de etanol y ácido acético en proporción 3:1). El animal fue fijado en etanol absoluto para preservar su ADN. Este paso fue realizado en Australia por los recolectores, y el material fue enviado a Murcia por correo aéreo, donde fue almacenado a -20°C hasta su análisis. Los líquidos conservantes fueron renovados con periodicidad para prevenir el deterioro del material.

3.2.- Análisis cromosómico

Se tomaron porciones de la gónada de cada uno de los machos analizados, procurando tomar la muestra de tejido de la zona inmediatamente adyacente a aquella en la que la espermatogénesis ya ha tenido lugar para localizar células en proceso de meiosis (Figura 3.3). Tras colocar el fragmento de tejido sobre un portaobjetos limpio, se añadieron unas gotas de ácido acético al 45% y se aplastó con un cubreobjetos (método de Squash). Las preparaciones fueron inmediatamente observadas bajo un microscopio de contraste de fases para determinar el número cromosómico, el mecanismo de determinación del sexo (un par de heterosomas, cromosomas sexuales múltiples o tan sólo un heterosoma) y la posible existencia de alteraciones cromosómicas, tales como transposiciones o fusiones, en base a la observación de sus consecuencias en la morfología de los cromosomas. Una vez observadas, las preparaciones fueron fijadas con nitrógeno líquido y se retiró el cubreobjetos.

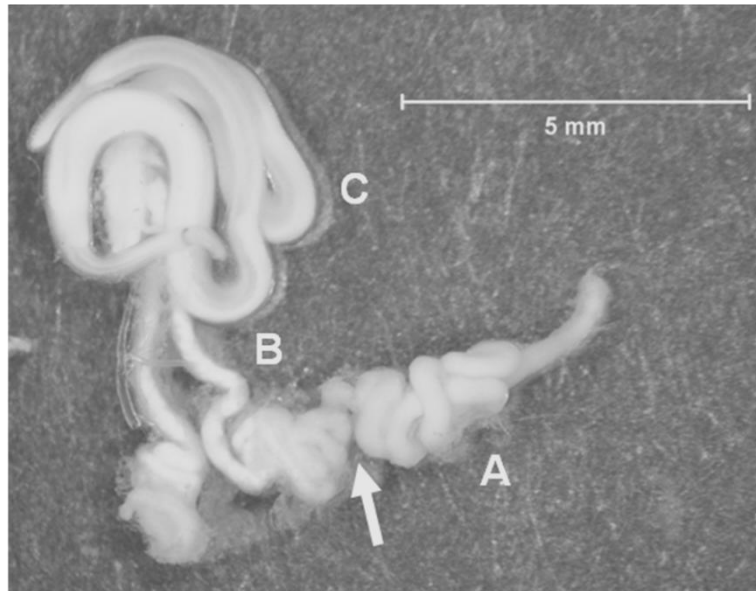


Figura 3.3: Estructura de la gónada de un representante de *P. whelani* (ejemplar número 146). A: Testículo. B: Conducto deferente. C: Glándula accesoria. La flecha indica el punto en el que se diferencian la zona llena de espermatozoides donde la espermatogénesis ya ha tenido lugar (a la izquierda) y la zona donde las células se encuentran en división (a la derecha). La muestra la tomamos del fragmento inmediatamente a la derecha de la flecha.

Una vez secas (en placa caliente) se guardaron a temperatura ambiente para su posterior tinción con Giemsa. La tinción de Giemsa está compuesta por diversos colorantes que tiñen diferencialmente la cromatina, permitiendo diferenciarla fácilmente del resto de componentes celulares.

Las preparaciones fueron fotografiadas en el SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Murcia mediante un microscopio óptico LEICA DMRB.

3.3.- Extracción del ADN

El ADN se extrajo de una pata del par mesotorácico de cada ejemplar macho, a la que se le eliminó todo resto de etanol y se maceró para facilitar la acción de la protein-quinasa incluida en el kit de extracción. Se utilizó el kit de extracción DNeasy Tissue Kit de Qiagen, que utiliza una serie de eluyentes en una columna de extracción para eliminar toda sustancia de naturaleza diferente al ADN, eluyéndose finalmente el ADN purificado, según las especificaciones del fabricante.

3.4.- Amplificación y secuenciación de un fragmento del gen Citocromo oxidasa III

Se amplificó una región de 422 pares de bases del gen de la citocromo oxidasa III mitocondrial, utilizando para ello la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción se llevó a cabo mediante los “beads” de PCR *PuReTaq Ready-To-Go* suministrados por la empresa GE Healthcare Co. y los cebadores empleados por Zerm *et al.* (2007):

coxIII-F:

5'-CTGTAGAAAYTWGGRAGAACTTGRCC-3' ← nótese que se trata de una secuencia degenerada, diseñada para amplificar diversas variantes nucleotídicas en ciertas posiciones del lugar de anillamiento del cebador.

coxIII-R:

5'-TACTATATAAATTATCTACCTCATC-3'

Para la elección de la región a secuenciar se tuvo en cuenta en primer lugar la posibilidad de comparar posteriormente nuestros resultados con los de Zerm *et al.* (2007) y en segundo lugar la idoneidad de esta secuencia de ADN mitocondrial para estudios de código de barras de ADN (Vialle *et al.*, 2009).

El programa seguido se compone de los siguientes ciclos:

- Activación a 94°C durante 5 minutos
- 39 ciclos de amplificación:
 - 30 segundos a 94°C (desnaturalización)
 - 30 segundos a 50°C (anillamiento)
 - 1 minuto a 72°C (elongación)
- 10 minutos de elongación final a 72°C
- Conservación indefinida a 15°C

Tras la reacción de PCR se procedió a verificar que la reacción había tenido lugar utilizando para ello un gel de agarosa al 1'5 %. Una vez realizada la comprobación, el producto fue purificado para eliminar los restos de reactivos utilizando el protocolo estándar de precipitación de productos de PCR con isopropanol y acetato de amonio.

La concentración de ADN de cada purificado fue medida con un NanoDrop 1000 Overview de Thermo Fisher Scientific® para, en los casos que fuera necesario, ajustar la concentración al óptimo de 10 ng/μl requerido por el servicio de secuenciación del Laboratorio de Biología Molecular del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación) de la Universidad de Murcia.

Por último, el ADN purificado fue secuenciado en un secuenciador ABI Prism 3130 de Applied Biosystems® propiedad del SAI.

3.5.- Análisis filogenético de las secuencias

Por otro lado, se buscaron las secuencias obtenidas por Zerm *et al.* (2007) en GenBank, de las cuales tomamos las pertenecientes a todas las especies de *Pseudotetracha* que estos autores emplearon en su estudio, así como la secuencia de la especie *Odontocheila confusa* para emplearla como grupo externo.

Las secuencias se analizaron mediante el programa Chromas (versión 1.45) a partir de los electroferogramas obtenidos en el SAI (Figura 3.4), utilizando en algunos casos el programa BioEdit versión 7.0.9.0 para obtener la secuencia consenso de ambas cadenas en aquellos casos en los que lo consideramos necesario.

Finalmente reunimos todas las secuencias en un archivo con formato FASTA para su análisis. Esta matriz fue convertida al formato mega utilizando para ello el programa MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007), donde se realizó el alineamiento mediante el algoritmo Clustal W. Seguidamente efectuamos en el mismo programa un análisis de filogenia por el método basado en distancias de Neighbor-Joining, empleando como modelo de sustitución de nucleótidos el modelo de Kimura 2-parámetros y realizando un test de *bootstrap* con 10.000 réplicas.

A partir de la misma matriz, exportada a formato NEXUS, realizamos un análisis de Máxima Parsimonia utilizando el programa TNT versión 1.1 (Goloboff *et al.*, 2003) con 10.000 réplicas y el algoritmo TBR como algoritmo de intercambio. A continuación se realizó un test de *bootstrap* estándar con 500 réplicas.

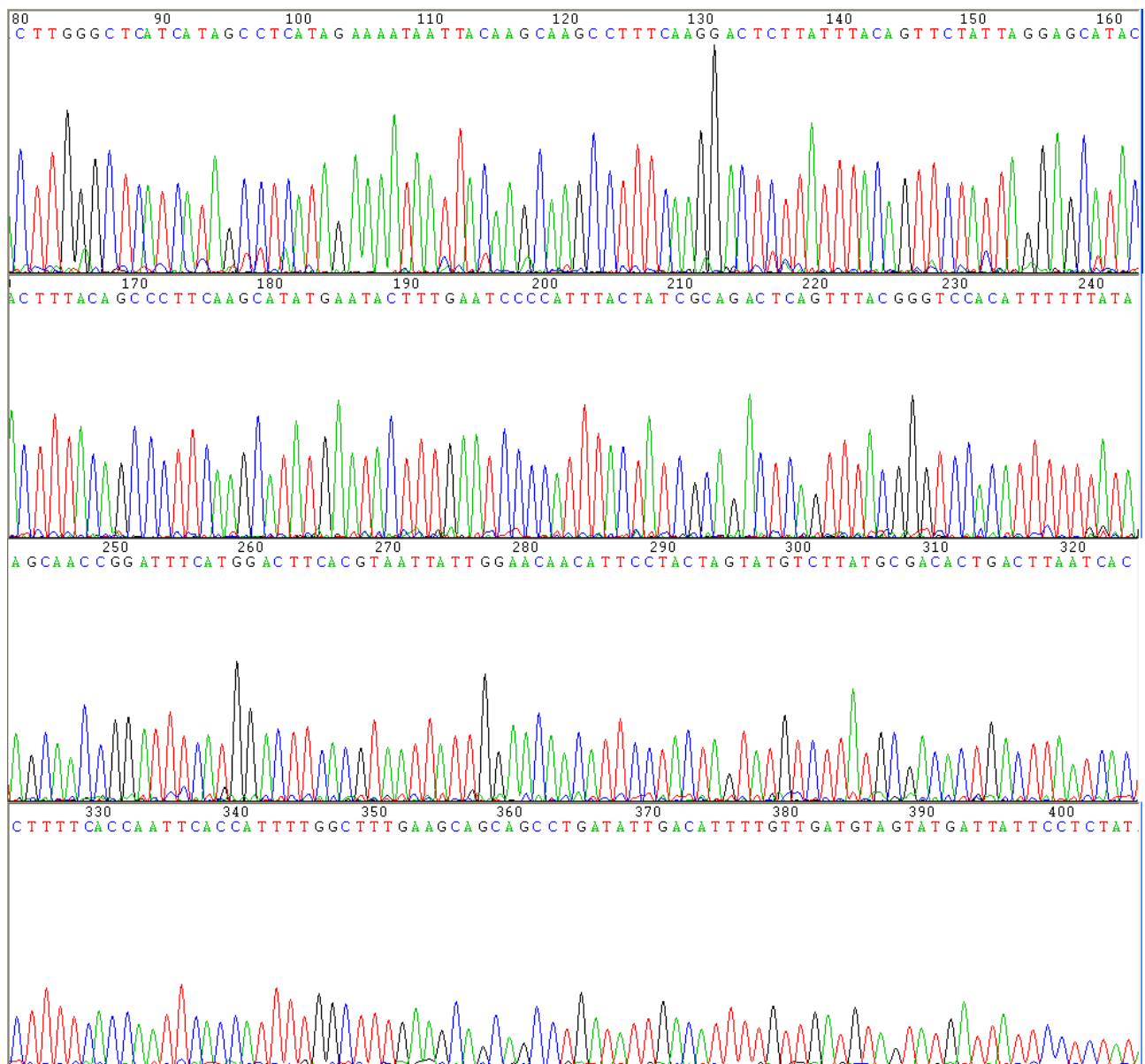


Figura 3.4: Fragmento del electroferograma perteneciente al fragmento analizado en el individuo número 171.

Posteriormente se realizó un análisis de inferencia bayesiano mediante el programa Mr. Bayes (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) versión 3.1.2. utilizando los valores por defecto según Ronquist *et al.* (2005).

La red haplotípica se realizó utilizando el programa TCS versión 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Para forzar la unión de las tres especies estudiadas se fijó el límite de conectividad a un valor de 35 pasos. Fue realizado en un principio con la matriz de datos completa; posteriormente se realizaron análisis independientes para los ejemplares de cada especie o complejo de especies separadamente.

4.- Resultados

4.1.- Identificación de los ejemplares

Los ejemplares analizados se han identificado como pertenecientes a las especies *P. blackburni*, *P. australis* y *P. whelani* (Tabla 1).

Tabla 1: Relación de los ejemplares utilizados en este trabajo.

Código	Especie	Localidad	Fecha de captura	Referencia / Código GenBank
odonconf	<i>Odontocheila confusa</i>	Bolivia, GenBank	???	AF438928
ion	<i>P. ion</i>	Australia, W.A., Lake Auld-Wapet Rd.	04/03	DQ152153
helmsi	<i>P. helmsi</i>	Australia, W.A., Lake Annean	04/03	DQ152152
oleadora	<i>P. oleadora</i>	Australia, W.A., Lake Barlee	04/03	DQ152155
blackburni	<i>P. blackburni</i>	Australia, W.A., L. Lefroy	04/03	DQ152149
whelani	<i>P. whelani</i>	Australia, S.A., Iron Stone Lagoon	03/03	DQ152157
cuprascens	<i>P. cuprascens</i>	Australia, W.A., Lake Moore	04/03	DQ152151
corpulenta	<i>P. corpulenta</i>	Australia, N.T., 33 km E Curtin Spgs	03/03	DQ152150
pulchra	<i>P. pulchra</i>	Australia, W.A., Lake Noonie	04/03	DQ152156
mendacia	<i>P. mendacia</i>	Australia, W.A., Lake Ballard	04/03	DQ152154
32	<i>P. blackburni</i>	Whyalla (33°2'S,136°36'E)	11/03/04	Este trabajo
33	<i>P. blackburni</i>	Whyalla (33°2'S,136°36'E)	11/03/04	Este trabajo
34	<i>P. blackburni</i>	Whyalla (33°2'S,136°36'E)	11/03/04	Este trabajo
35	<i>P. blackburni</i>	Whyalla (33°2'S,136°36'E)	11/03/04	Este trabajo
36	<i>P. blackburni</i>	Whyalla (33°2'S,136°36'E)	11/03/04	Este trabajo
38	<i>P. blackburni</i>	Whyalla (33°2'S,136°36'E)	11/03/04	Este trabajo
39	<i>P. blackburni</i>	Whyalla (33°2'S,136°36'E)	11/03/04	Este trabajo
43	<i>P. blackburni</i>	Yardea (marzo) (32°58'S,135°16'20"E)	12/03/04	Este trabajo
49	<i>P. blackburni</i>	Yardea (marzo) (32°58'S,135°16'20"E)	12/03/04	Este trabajo
76	<i>P. whelani</i>	Lake Torrens (31°43'S,136°49'30"E)	14/03/04	Este trabajo
78	<i>P. whelani</i>	Lake Torrens (31°43'S,136°49'30"E)	14/03/04	Este trabajo
82	<i>P. whelani</i>	Lake Torrens (31°43'S,136°49'30"E)	14/03/04	Este trabajo
118	<i>P. australis</i>	Lake Barker A (35°18'30"S,139°15'E)	29/03/04	Este trabajo
139	<i>P. australis</i>	Lake Barker F (35°35'20"S,139°23'E)	30/03/04	Este trabajo
140	<i>P. australis</i>	Lake Barker F (35°35'20"S,139°23'E)	30/03/04	Este trabajo
141	<i>P. australis</i>	Lake Barker F (35°35'20"S,139°23'E)	30/03/04	Este trabajo
142	<i>P. australis</i>	Lake Barker F (35°35'20"S,139°23'E)	30/03/04	Este trabajo
143	<i>P. australis</i>	Lake Barker F (35°35'20"S,139°23'E)	30/03/04	Este trabajo
146	<i>P. australis</i>	Lake Barker F (35°35'20"S,139°23'E)	30/03/04	Este trabajo
149	<i>P. australis</i>	Lake Barker F (35°35'20"S,139°23'E)	30/03/04	Este trabajo
162	<i>P. blackburni</i>	Port Augusta (32°44'S,136°54'20"E)	02/04/04	Este trabajo
163	<i>P. blackburni</i>	Port Augusta (32°44'S,136°54'20"E)	02/04/04	Este trabajo
168	<i>P. whelani</i>	Yardea (abril) (32°18'20"S,135°51'E)	02/04/04	Este trabajo
169	<i>P. whelani</i>	Yardea (abril) (32°18'20"S,135°51'E)	02/04/04	Este trabajo
171	<i>P. whelani</i>	Yardea (abril) (32°18'20"S,135°51'E)	02/04/04	Este trabajo
176	<i>P. whelani</i>	Yardea (abril) (32°18'20"S,135°51'E)	02/04/04	Este trabajo
199	<i>P. whelani</i>	Lake Gairdner 3' (31°36'S,135°25'40"E)	03/04/04	Este trabajo
202	<i>P. whelani</i>	Lake Gairdner 3' (31°36'S,135°25'40"E)	03/04/04	Este trabajo
203	<i>P. whelani</i>	Lake Gairdner 3' (31°36'S,135°25'40"E)	03/04/04	Este trabajo
206	<i>P. whelani</i>	Lake Gairdner 4' (31°7'S,135°19'20"E)	03/04/04	Este trabajo
207	<i>P. whelani</i>	Lake Gairdner 4' (31°7'S,135°19'20"E)	03/04/04	Este trabajo
208	<i>P. whelani</i>	Lake Gairdner 4' (31°7'S,135°19'20"E)	03/04/04	Este trabajo
210	<i>P. whelani</i>	Lake Gairdner 4' (31°7'S,135°19'20"E)	03/04/04	Este trabajo
215	<i>P. whelani</i>	Lake Gairdner 4' (31°7'S,135°19'20"E)	03/04/04	Este trabajo
222	<i>P. whelani</i>	Lake Gairdner 4' (31°7'S,135°19'20"E)	03/04/04	Este trabajo
225	<i>P. whelani</i>	Lake Gairdner 5' (31°13'30"S,136°24'E)	04/04/04	Este trabajo
231	<i>P. whelani</i>	Lake Torrens (31°43'S,136°50'E)	04/04/04	Este trabajo

4.2.- Análisis filogenético

Se ha analizado la secuencia de un fragmento, de 422 pares de bases de longitud, del gen de la subunidad III de la citocromo oxidasa mitocondrial en 37 ejemplares pertenecientes a tres especies del género australiano *Pseudotetracha* (Anexo I). Estos datos se han analizado conjuntamente con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank de nueve especies representantes de este género (Zerm *et al.*, 2007) (Tabla 1). Se ha empleado la secuencia de *Odontocheila confusa* como grupo externo, también utilizada como tal por Zerm *et al.* (2007). Considerando el conjunto total de los datos, se han detectado 145 pares de bases variables, de las cuales 104 son filogenéticamente informativas.

Mediante el programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007) se han calculado las distancias Gamma para el modelo de los 2 parámetros de Kimura (Tabla 2). La distancia mayor, con un valor de 0'202, se ha observado entre *P. oleadora* (Zerm *et al.*, 2007) y el ejemplar 118 (*P. australis*). En cuanto a la menor distancia se ha observado en dos grupos diferentes (Figura 4.2), todas con un valor de 0'003. Se han hallado secuencias idénticas (distancia igual a cero) entre los miembros de diferentes grupos:

- a) 32, 33, 34, 35, 38 y 162 (*P. blackburni*)
- b) 139, 140, 141, 142, 143, 146 y 149 (*P. australis*)
- c) 76, 78 y 231 (*P. whelani*)
- d) 171, 208 y 215 (*P. whelani*)
- e) 199, 202, 203, 206, 207, 210 y 222 (*P. whelani*)

4.2.1.- Neighbor Joining

El análisis mediante Neighbor-Joining muestra un árbol (Figura 4.1) que agrupa a los ejemplares identificados como *P. whelani* en un clado monofilético junto con la secuencia de la misma especie procedente del análisis de Zerm *et al.* (2007). A su vez, este clado se subdivide en dos clados monofiléticos, estando esta división soportada por un valor de *bootstrap* del 99%.

Los ejemplares asignados a la especie *P. australis* forman otro clado monofilético cuyo clado hermano está formado por los ejemplares identificados en el presente trabajo como *P. blackburni* junto con las especies *P. pulchra*, *P. cuprascens*, *P. corpulenta* y *P. mendacia* del análisis de Zerm *et al.* (2007).

Tabla 2: Matriz de divergencia: Distancias Gamma para el modelo de 2 parámetros de Kimura en el fragmento mitocondrial coxIII entre 37 ejemplares de los 3 taxones de *Pseudotetracha* analizados junto con los taxones incluidos precedentes de la base de datos GenBank.

```
[ 1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 ]
[ 1]
[ 2] 0.007
[ 3] 0.010 0.010
[ 4] 0.007 0.007 0.010
[ 5] 0.014 0.014 0.017 0.014
[ 6] 0.014 0.014 0.017 0.014 0.000
[ 7] 0.014 0.014 0.017 0.014 0.000 0.000
[ 8] 0.014 0.014 0.017 0.014 0.000 0.000 0.000
[ 9] 0.014 0.014 0.017 0.014 0.000 0.000 0.000 0.000
[10] 0.010 0.010 0.000 0.010 0.017 0.017 0.017 0.017 0.017
[11] 0.014 0.014 0.017 0.014 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.017
[12] 0.010 0.010 0.000 0.010 0.017 0.017 0.017 0.017 0.017 0.000 0.017
[13] 0.014 0.014 0.017 0.014 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.017 0.000 0.017
[14] 0.014 0.014 0.017 0.014 0.007 0.007 0.007 0.007 0.007 0.017 0.007 0.017 0.007
[15] 0.017 0.017 0.021 0.017 0.010 0.010 0.010 0.010 0.010 0.021 0.010 0.021 0.010 0.003
[16] 0.113 0.122 0.118 0.113 0.122 0.122 0.122 0.122 0.122 0.118 0.122 0.118 0.122 0.113 0.117
[17] 0.118 0.126 0.122 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.122 0.118 0.122 0.118 0.118 0.122 0.003
[18] 0.118 0.126 0.122 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.122 0.118 0.122 0.118 0.118 0.122 0.003 0.000
[19] 0.118 0.126 0.122 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.122 0.118 0.122 0.118 0.118 0.122 0.003 0.000 0.000
[20] 0.122 0.130 0.126 0.122 0.122 0.122 0.122 0.122 0.122 0.126 0.122 0.122 0.122 0.126 0.007 0.003 0.003 0.003
[21] 0.017 0.017 0.021 0.017 0.010 0.010 0.010 0.010 0.010 0.021 0.010 0.021 0.010 0.003 0.000 0.117 0.122 0.122 0.122 0.126
[22] 0.017 0.017 0.021 0.017 0.010 0.010 0.010 0.010 0.010 0.021 0.010 0.021 0.010 0.003 0.000 0.117 0.122 0.122 0.122 0.126 0.000
[23] 0.021 0.021 0.025 0.021 0.007 0.007 0.007 0.007 0.007 0.025 0.007 0.007 0.003 0.122 0.117 0.117 0.117 0.121 0.003 0.003
[24] 0.149 0.148 0.140 0.149 0.131 0.131 0.131 0.131 0.131 0.140 0.131 0.140 0.131 0.131 0.130 0.105 0.101 0.101 0.101 0.105 0.130 0.130 0.126
[25] 0.149 0.148 0.140 0.149 0.131 0.131 0.131 0.131 0.131 0.140 0.131 0.140 0.131 0.131 0.130 0.105 0.101 0.101 0.101 0.105 0.130 0.130 0.126 0.000
[26] 0.149 0.148 0.140 0.149 0.131 0.131 0.131 0.131 0.131 0.140 0.131 0.140 0.131 0.131 0.130 0.105 0.101 0.101 0.101 0.105 0.130 0.130 0.126 0.000 0.000
[27] 0.149 0.148 0.140 0.149 0.131 0.131 0.131 0.131 0.131 0.140 0.131 0.140 0.131 0.131 0.130 0.105 0.101 0.101 0.101 0.105 0.130 0.130 0.126 0.000 0.000 0.000
[28] 0.149 0.148 0.140 0.149 0.131 0.131 0.131 0.131 0.131 0.140 0.131 0.140 0.131 0.131 0.130 0.105 0.101 0.101 0.101 0.105 0.130 0.130 0.126 0.000 0.000 0.000 0.000
[29] 0.149 0.148 0.140 0.149 0.131 0.131 0.131 0.131 0.131 0.140 0.131 0.140 0.131 0.131 0.130 0.105 0.101 0.101 0.101 0.105 0.130 0.130 0.126 0.000 0.000 0.000 0.000
[30] 0.101 0.109 0.109 0.109 0.101 0.101 0.101 0.101 0.101 0.109 0.101 0.109 0.101 0.101 0.105 0.028 0.025 0.025 0.025 0.028 0.105 0.105 0.101 0.081 0.081 0.081 0.081 0.081
[31] 0.118 0.126 0.122 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.122 0.118 0.122 0.118 0.118 0.122 0.003 0.000 0.000 0.000 0.003 0.122 0.122 0.117 0.101 0.101 0.101 0.101 0.101 0.101 0.025
[32] 0.118 0.126 0.122 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.122 0.118 0.122 0.118 0.118 0.122 0.003 0.000 0.000 0.000 0.003 0.122 0.122 0.117 0.101 0.101 0.101 0.101 0.101 0.101 0.025 0.000
[33] 0.118 0.126 0.122 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.122 0.118 0.122 0.118 0.118 0.122 0.003 0.000 0.000 0.000 0.003 0.122 0.122 0.117 0.101 0.101 0.101 0.101 0.101 0.101 0.025 0.000 0.000
[34] 0.149 0.148 0.140 0.149 0.131 0.131 0.131 0.131 0.131 0.140 0.131 0.140 0.131 0.131 0.130 0.105 0.101 0.101 0.101 0.105 0.130 0.130 0.126 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.081 0.101 0.101 0.101
[35] 0.173 0.173 0.164 0.173 0.155 0.155 0.155 0.155 0.155 0.164 0.155 0.164 0.155 0.155 0.155 0.129 0.125 0.125 0.125 0.129 0.155 0.155 0.150 0.024 0.024 0.024 0.024 0.024 0.104 0.125 0.125 0.125 0.024
[36] 0.110 0.118 0.114 0.110 0.110 0.110 0.110 0.110 0.110 0.114 0.110 0.114 0.110 0.113 0.032 0.028 0.028 0.028 0.032 0.113 0.113 0.109 0.102 0.102 0.102 0.102 0.102 0.102 0.032 0.028 0.028 0.028 0.102 0.125
[37] 0.130 0.139 0.135 0.130 0.130 0.130 0.130 0.130 0.135 0.130 0.135 0.130 0.134 0.043 0.039 0.039 0.039 0.043 0.134 0.134 0.130 0.113 0.113 0.113 0.113 0.113 0.113 0.043 0.039 0.039 0.039 0.113 0.137 0.017
[38] 0.119 0.128 0.128 0.128 0.124 0.124 0.124 0.124 0.128 0.124 0.128 0.124 0.115 0.119 0.136 0.141 0.141 0.141 0.145 0.119 0.119 0.123 0.167 0.167 0.167 0.167 0.167 0.167 0.141 0.141 0.141 0.141 0.167 0.192 0.154 0.175
[39] 0.125 0.133 0.133 0.133 0.125 0.125 0.125 0.125 0.133 0.125 0.133 0.125 0.125 0.125 0.129 0.065 0.069 0.069 0.069 0.072 0.129 0.129 0.133 0.109 0.109 0.109 0.109 0.109 0.046 0.069 0.069 0.069 0.109 0.133 0.065 0.076 0.154
[40] 0.121 0.129 0.129 0.129 0.121 0.121 0.121 0.121 0.129 0.121 0.129 0.121 0.121 0.125 0.061 0.065 0.065 0.065 0.069 0.125 0.125 0.129 0.113 0.113 0.113 0.113 0.113 0.113 0.043 0.065 0.065 0.065 0.113 0.137 0.061 0.073 0.149 0.010
[41] 0.154 0.163 0.154 0.163 0.158 0.158 0.158 0.158 0.154 0.158 0.154 0.158 0.158 0.142 0.137 0.137 0.137 0.141 0.158 0.158 0.154 0.163 0.163 0.163 0.163 0.163 0.163 0.133 0.137 0.137 0.137 0.163 0.189 0.155 0.167 0.130 0.158 0.163
[42] 0.154 0.162 0.163 0.163 0.167 0.167 0.167 0.167 0.163 0.167 0.163 0.167 0.158 0.162 0.149 0.154 0.154 0.154 0.158 0.162 0.162 0.167 0.173 0.173 0.173 0.173 0.173 0.173 0.137 0.154 0.154 0.154 0.173 0.199 0.159 0.181 0.124 0.154 0.158 0.112
[43] 0.117 0.118 0.122 0.117 0.117 0.117 0.117 0.117 0.122 0.117 0.117 0.117 0.121 0.046 0.043 0.043 0.043 0.046 0.121 0.121 0.117 0.118 0.118 0.118 0.118 0.118 0.046 0.043 0.043 0.043 0.118 0.142 0.043 0.054 0.167 0.096 0.092 0.159 0.176
[44] 0.132 0.140 0.141 0.141 0.136 0.136 0.136 0.136 0.141 0.136 0.141 0.136 0.136 0.140 0.137 0.132 0.132 0.132 0.136 0.140 0.140 0.136 0.176 0.176 0.176 0.176 0.176 0.176 0.132 0.132 0.132 0.132 0.176 0.202 0.145 0.158 0.062 0.154 0.150 0.117 0.112 0.145
[45] 0.097 0.105 0.101 0.105 0.097 0.097 0.097 0.097 0.101 0.097 0.101 0.097 0.101 0.061 0.058 0.058 0.058 0.061 0.101 0.101 0.097 0.101 0.101 0.101 0.101 0.101 0.101 0.039 0.058 0.058 0.058 0.101 0.124 0.043 0.061 0.136 0.069 0.069 0.150 0.136 0.073 0.145
[46] 0.021 0.021 0.025 0.025 0.014 0.014 0.014 0.014 0.025 0.014 0.025 0.014 0.007 0.003 0.121 0.126 0.126 0.126 0.130 0.003 0.003 0.007 0.134 0.134 0.134 0.134 0.134 0.109 0.126 0.126 0.126 0.126 0.134 0.159 0.113 0.134 0.123 0.133 0.129 0.162 0.166 0.125 0.145 0.105
[47] 0.201 0.201 0.192 0.192 0.206 0.206 0.206 0.206 0.192 0.206 0.192 0.206 0.201 0.197 0.211 0.211 0.211 0.211 0.215 0.197 0.197 0.197 0.221 0.221 0.221 0.221 0.221 0.221 0.216 0.211 0.211 0.211 0.221 0.248 0.220 0.244 0.200 0.245 0.255 0.211 0.206 0.220 0.215 0.206 0.201
```

Código de taxones: [1] #168 [2] #169, [3] #171, [4] #176, [5] #199, [6] #202, [7] #203, [8] #206, [9] #207, [10] #208, [11] #210, [12] #215, [13] #222, [14] #225, [15] #231cons, [16] #36, [17] #32, [18] #35, [19] #38, [20] #39, [21] #76, [22] #78, [23] #82, [24] #139, [25] #141, [26] #142, [27] #143, [28] #146, [29] #149, [30] #163, [31] #33, [32] #34cons, [33] #162cons, [34] #140cons, [35] #118cons, [36] #43cons, [37] #49cons, [38] #blackburni, [39] #corpulenta, [40] #cuprascens, [41] #helmsi, [42] #ion, [43] #mendacia, [44] #oleadora, [45] #pulchra, [46] #whelani, [47] #out(Odon.conf).

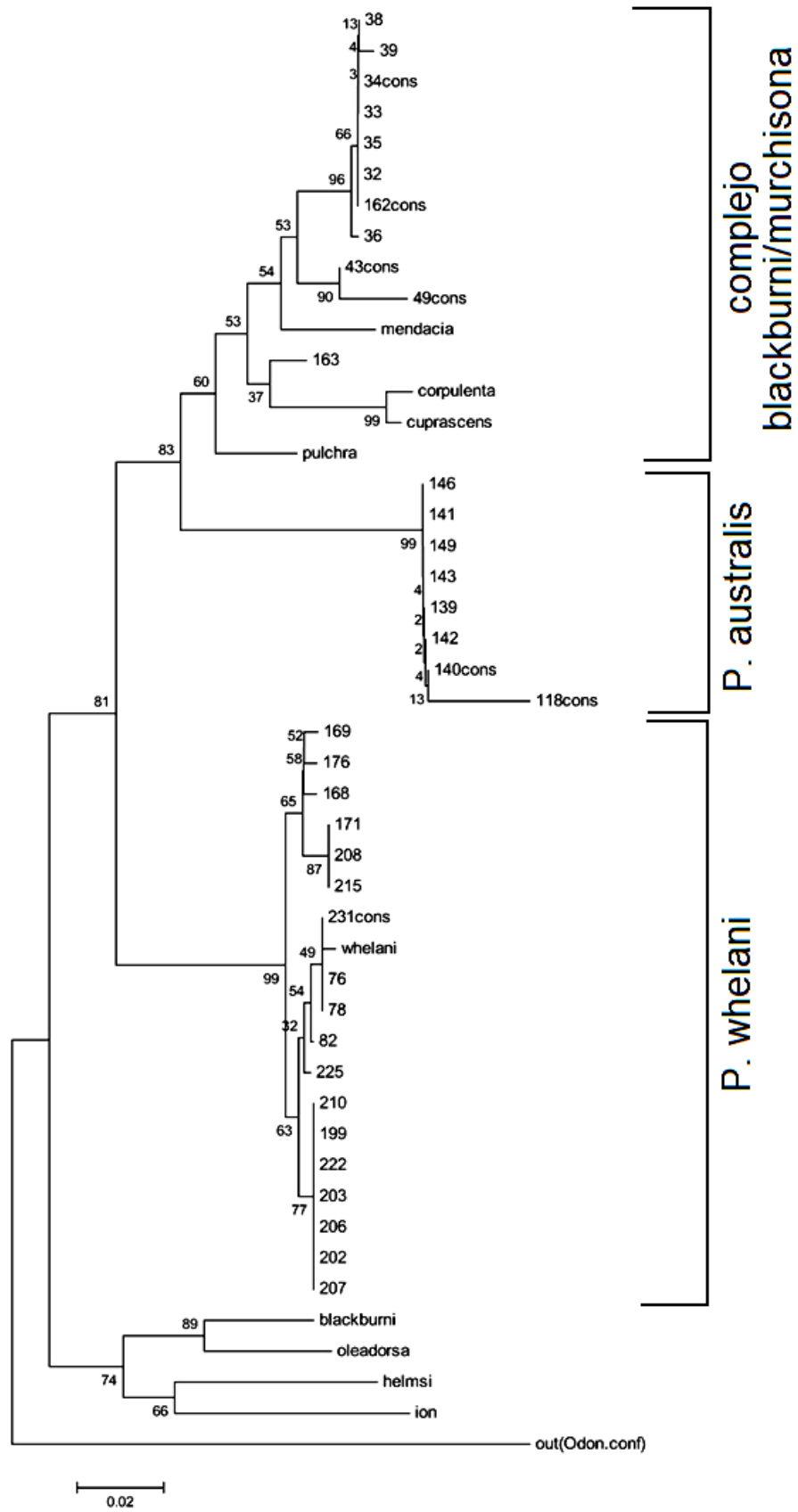


Figura 4.1: Fenograma obtenido tras el análisis de Neighbor-Joining de los datos analizados.

En el complejo de especies formado por *P. pulchra*, *P. corpulenta*, *P. cuprascens*, *P. mendacia* y las muestras identificadas como *P. blackburni*, el ejemplar que responde al código “163”, identificado morfológicamente como *P. blackburni* en base a la puntuadura de los élitros, se muestra como taxón hermano del clado formado por *P. corpulenta* y *P. cuprascens*, siendo este agrupamiento el taxón hermano del resto de *P. blackburni* y *P. mendacia* (Zerm *et al.*, 2007). *P. mendacia* quedaría como grupo hermano de los ejemplares identificados como *P. blackburni* excepto el número 163.

El grupo de especies formado por *P. ion*, *P. helmsi*, *P. oleadora* y *P. blackburni* según Zerm *et al.* (2007) forman un clado basal hermano del resto de las especies analizadas.

4.2.2.- Máxima Parsimonia

El análisis de máxima parsimonia (Figura 4.2) muestra de nuevo la monofilia de los ejemplares identificados como *P. whelani* junto con el representante de la misma especie empleado por Zerm *et al.* (2007) en su análisis. Además también comparte con el análisis de Neighbor-Joining la división de este clado en dos grupos soportados por un elevado *bootstrap* (99%), pero en este caso los grupos son diferentes al análisis anterior.

Los ejemplares identificados como *P. australis* forman un taxón monofilético y hermano del grupo constituido por *P. corpulenta*, *P. cuprascens*, *P. pulchra*, *P. mendacia* (Zerm *et al.*, 2007) y los ejemplares identificados como *P. blackburni*. Dentro de este grupo nos encontramos con que el clado formado por *P. corpulenta* y *P. cuprascens* es el taxón hermano del grupo formado por *P. pulchra*, *P. mendacia* y los ejemplares identificados en el presente trabajo como *P. blackburni*. El ejemplar 163 se sitúa basalmente dentro de este grupo. *P. pulchra* es el taxón hermano de *P. mendacia* junto con los ejemplares utilizados en este estudio clasificados como *P. blackburni*.

El grupo de especies formado por *P. ion*, *P. helmsi*, *P. oleadora* y *P. blackburni* forman de nuevo un clado basal hermano del resto de las especies analizadas.

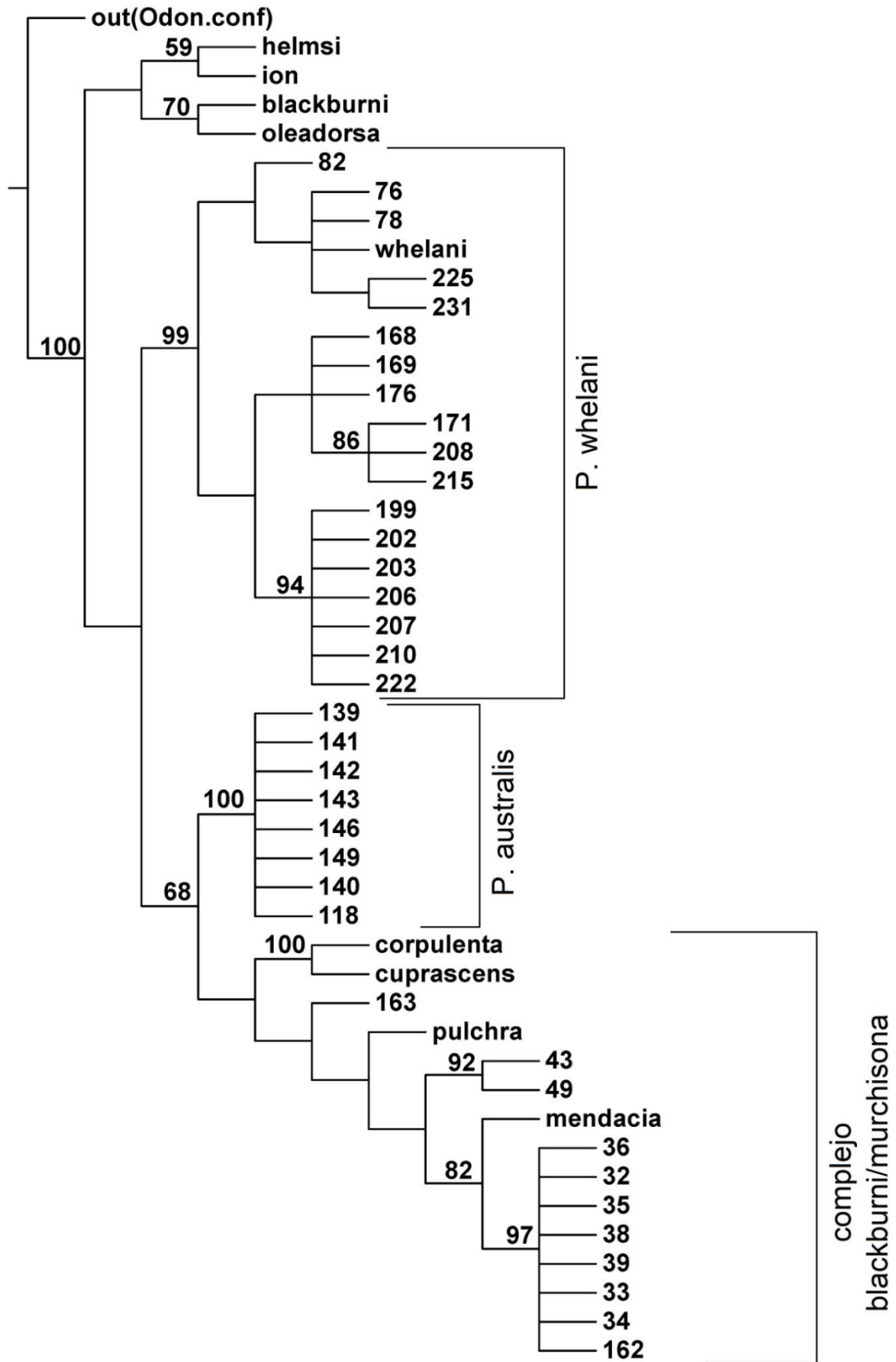


Figura 4.2: Árbol de consenso estricto obtenido en el análisis de Máxima Parsimonia realizado en el programa TNT. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 50%.

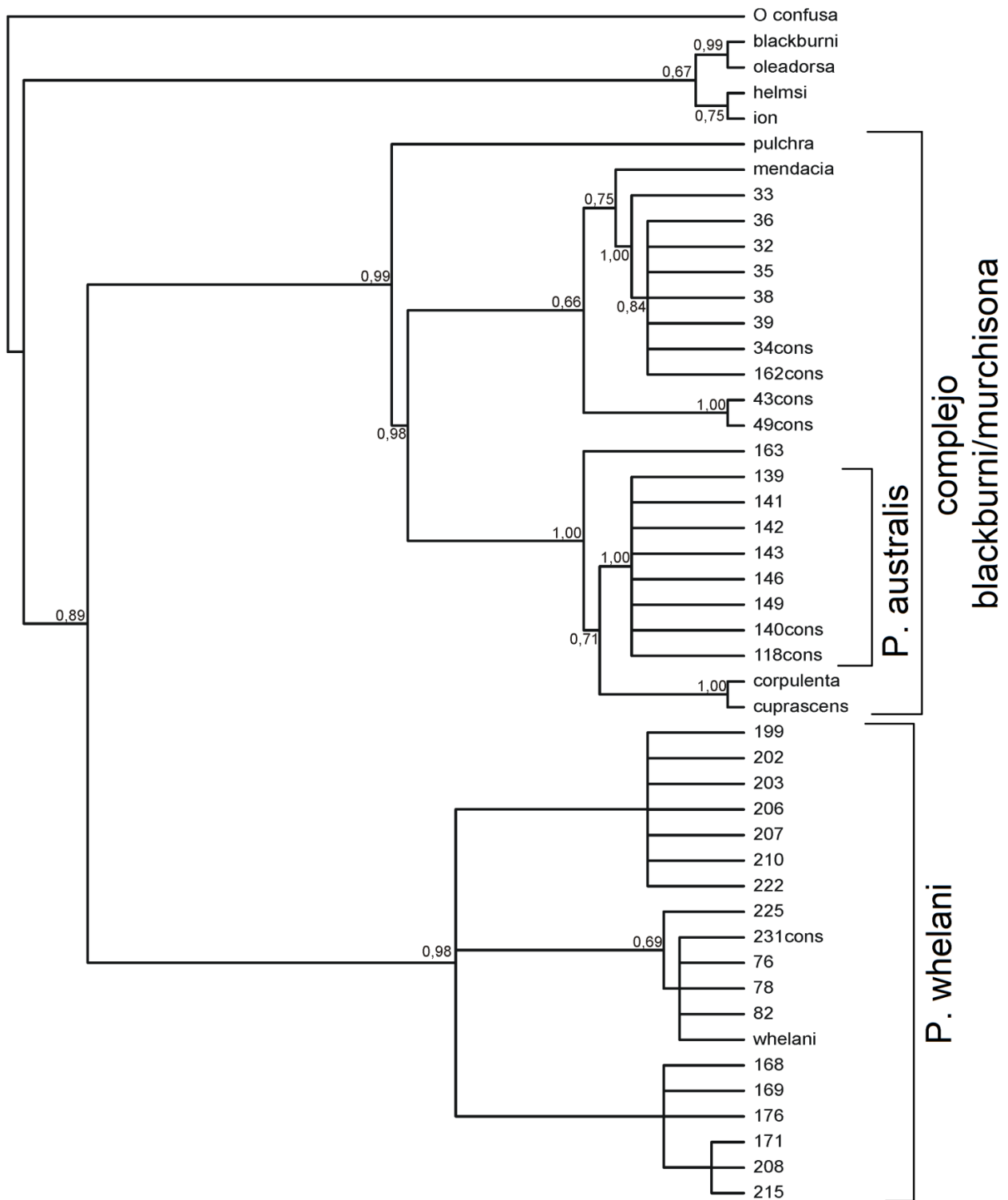


Figura 4.3: Árbol consenso obtenido tras el análisis de Inferencia Bayesiana realizado a partir de las secuencias analizadas. Solamente se muestran los valores de bootstrap superiores al 50%.

4.2.3.- Análisis Bayesiano

En el árbol obtenido tras el análisis bayesiano de la matriz de datos (Figura 4.3) observamos nuevamente la monofilia del clado formado por los ejemplares identificados como *P. whelani* y el

representante de esta especie procedente del análisis de Zerm *et al.* (2007). En esta ocasión los ejemplares de esta especie quedan agrupados en tres subclados monofiléticos soportados por un elevado valor de *bootstrap* (98%).

El grupo hermano de *P. whelani* está conformado por el resto de ejemplares analizados en este trabajo junto con los representantes de *P. pulchra*, *P. mendacia*, *P. corpulenta* y *P. cuprascens* procedentes del análisis de Zerm *et al.* (2007). Dentro de este grupo, la especie *P. pulchra* ocupa una posición basal. El resto de ejemplares se divide en dos clados; uno de ellos está formado por el ejemplar 163, en una posición basal dentro de este subclado, y su taxón hermano formado por los ejemplares asignados a la especie *P. australis* en monofilia recíproca con el clado conformado por *P. corpulenta* y *P. cuprascens*. El segundo clado incluye al resto de ejemplares identificados como *P. blackburni* y el ejemplar de *P. mendacia* utilizado por Zerm *et al.* (2007). Dentro de este clado nos encontramos a los ejemplares 43 y 49 en una posición basal, formando un grupo hermano de los ejemplares de *P. blackburni* restantes y *P. mendacia*, esta última basal a los primeros.

4.3.- Análisis filogeográfico

La relación de haplotipos obtenida por el análisis del conjunto completo de datos muestra una red (Figura 4.4) en el que las tres especies aparecen bien diferenciadas. En la Tabla 3 podemos observar los haplotipos hallados y sus ejemplares representantes. Se ha nombrado cada haplotipo utilizando las dos primeras letras del epíteto específico de la especie a la que pertenecen, más una letra mayúscula identificativa de cada uno de ellos.

Tabla 3: Ejemplares (ver Tabla 1) pertenecientes cada uno de los haplotipos encontrados.

Haplotipo	Especie	Ejemplares
AuF	<i>P. australis</i>	139, 140, 142, 143, 146 y 149
AuA	<i>P. australis</i>	118
BlZ	<i>P. blackburni</i>	163
BlA	<i>P. blackburni</i>	32, 34, 35, 162
BlB	<i>P. blackburni</i>	36
BlC	<i>P. blackburni</i>	39
BlD	<i>P. blackburni</i>	33
BlE	<i>P. blackburni</i>	43
BlF	<i>P. blackburni</i>	49
WhA	<i>P. whelani</i>	199, 202, 203, 206, 207, 210 y 222
WhB	<i>P. whelani</i>	82
WhC	<i>P. whelani</i>	225
WhD	<i>P. whelani</i>	76, 78 y 231
WhE	<i>P. whelani</i>	169
WhF	<i>P. whelani</i>	168
WhG	<i>P. whelani</i>	176
WhH	<i>P. whelani</i>	171, 208 y 215

Los ejemplares asignados a *P. australis* quedan separados de los identificados como *P. whelani* por un mínimo de 48 pasos mutacionales y de los ejemplares de *P. blackburni* de este estudio por 25 pasos. Igualmente, *P. blackburni* y *P. whelani* muestran una separación mínima de 33 pasos.

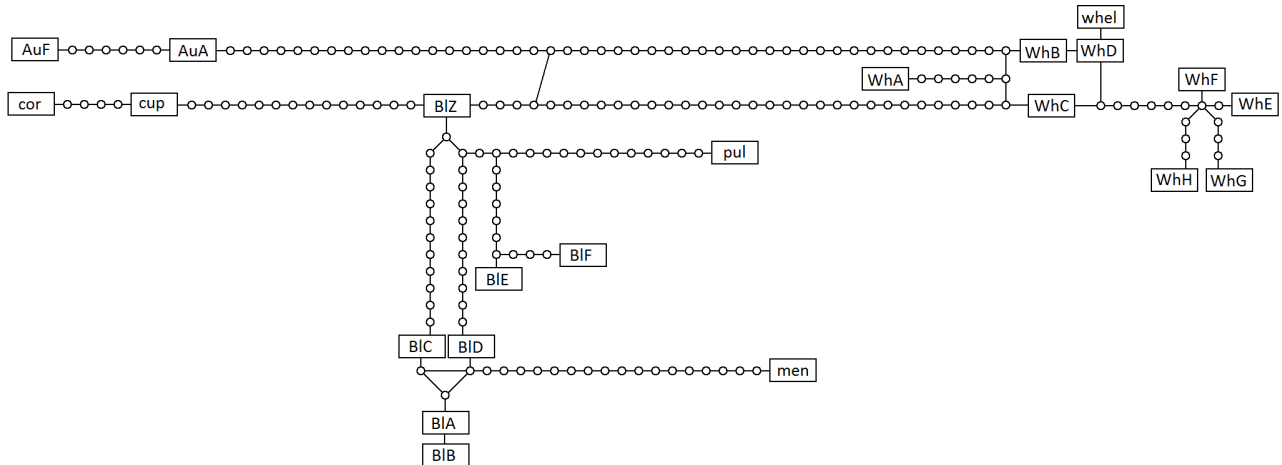


Figura 4.4: Red haplotípica no enraizada obtenida del análisis de la matriz de datos completa. Los ejemplares procedentes del trabajo de Zerm *et al.* (2007) se nombran con las primeras letras del nombre específico (*cor*: *P. corpulenta*, *cup*: *P. cuprascens*, *whel*: *P. whelani*, *pul*: *P. pulchra*, *men*: *P. mendacia*).

Analizando en particular la red haplotípica de *P. australis* nos encontramos con el ejemplar 118 (haplotipo “AuA”) en una posición basal separado de *P. blackburni* por 24 pasos y de *P. whelani* por 47. El resto de ejemplares asignados a esta especie comparten un mismo haplotipo (AuF) y se hallan separados del ejemplar 118 por 7 pasos.

En cuanto a la red correspondiente a *P. whelani* (Figura 4.5) encontramos un grupo de ejemplares (números 199, 202, 203, 206, 207, 210 y 222) que comparten el mismo haplotipo (WhA), separados por 7 pasos del número 225 (haplotipo WhC), el cual se halla a su vez a una distancia de 3 pasos de otro grupo de ejemplares que también comparten haplotipo (76, 78 y 231; haplotipo WhD). Este último grupo se halla a dos pasos tanto del ejemplar 82 (haplotipo WhB) como del utilizado por Zerm *et al.* (2007) (haplotipo “whel”).

En el nodo intermedio a 225 y el grupo del ejemplar 76 se enraza un clado situado a una distancia de 6 pasos mutacionales en el que se encuentran los ejemplares 168, 169 y 176 (haplotipos WhF, WhE y WhG respectivamente) y el grupo formado por los ejemplares 171, 208 y 215 (haplotipo WhH).

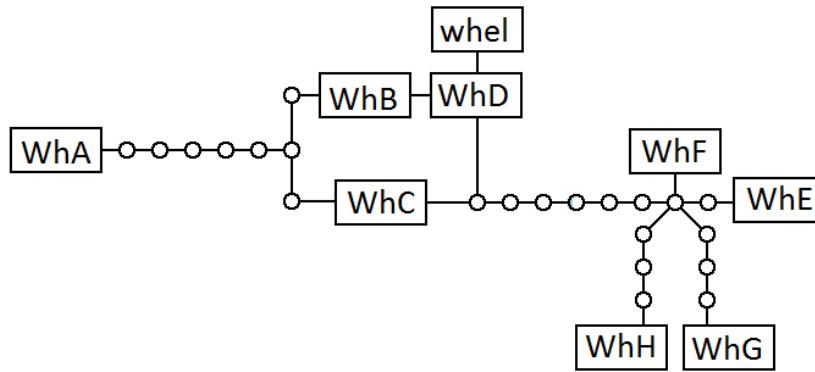


Figura 4.5: Red haplotípica correspondiente a la especie *P. whelani*.

Dentro del complejo *blackburni/murchisona* (Figura 4.6) nos encontramos al ejemplar 163 (haplotipo BIZ) ocupando una posición basal dentro de este grupo. A 15 pasos mutaciones de él se halla la especie *P. cuprascens* (“cup”) y, a 5 pasos de esta última, *P. corpulenta* (“cor”). A 17 pasos del ejemplar 163 se encuentra también el ejemplar de Zerm *et al.* (2007) de la especie *P. pulchra* (“pul”), en la misma rama que lleva, a 10 pasos del ejemplar 163, a un haplotipo no hallado del cual se distancian los ejemplares 43 (haplotipo BIE) y 49 (BIF) en 1 y 4 pasos mutacionales respectivamente. Por otra parte se presenta un círculo en el que están implicados los haplotipos BIC (ejemplar 39) y BID (ejemplar 33), ambos a 13 pasos mutaciones de distancia del ejemplar 163. A 3 pasos de estos dos últimos haplotipos se hallan los ejemplares 32, 34, 35 y 162 (haplotipo BIA), separado por un paso del haplotipo BIB (ejemplar 36). Entre los haplotipos BIA, BIC y BID se forma un nuevo círculo, del cual se separa por 18 pasos mutacionales el ejemplar de *P. mendacia* procedente del trabajo de Zerm *et al.* (2007).

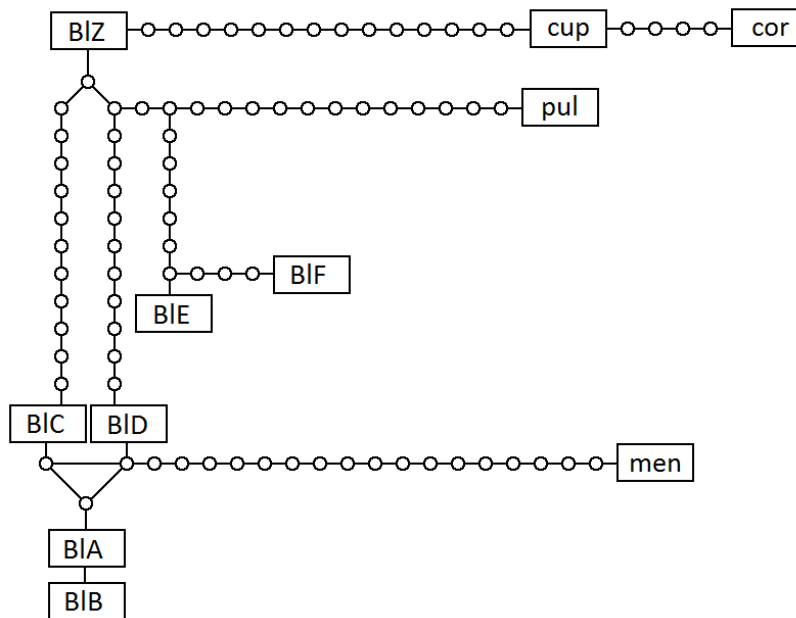


Figura 4.6: Red haplotípica correspondiente a la especie *P. blackburni* y el resto de las especies del complejo *blackburni/murchisona*.

4.4.- Análisis cariotípico

Se ha podido determinar la fórmula meiótica para 17 individuos, pertenecientes a las tres especies analizadas (Tabla 4).

Tabla 4: Fórmulas meóticas de los ejemplares analizados

Especie	Ejemplar (Tabla 1)	Fórmula (n)
<i>P. blackburni</i>	32	10 + III
	33	10 + III
	34	10 + III
	35	10 + III
	36	10 + III
	38	10 + III
	39	10 + III
<i>P. australis</i>	141	11 + XY
<i>P. whelani</i>	76	12 + XY
	78	12 + XY
	82	12 + XY
	176	12 + XY
	203	12 + XY
	207	12 + XY
	208	12 + XY
	215	??? (menor que otras <i>P. whelani</i>)
	225	12 + XY
231	12 + XY	

En los ejemplares analizados de la especie *P. blackburni* se halló un cariotipo que responde a la fórmula de 10 pares de cromosomas más un trivalente ($n = 10+III$) (Figura 4.7, A-F). Este trivalente presenta forma de V, con un elemento en el vértice y otros dos en los extremos opuestos. El elemento del vértice (neoY) posee dos brazos de similar longitud, uno de ellos ligeramente mayor que el otro.

Los ejemplares de *P. australis* del Lago Barker F muestran un cariotipo compuesto por 11 pares de autosomas más el par XY ($n = 11+XY$) (Figura 4.7, G-J). El ejemplar 118 se encontraba en un estado avanzado de gametogénesis, por lo que de él no pudieron obtenerse resultados cromosómicos.

Por otro lado, los ejemplares de *P. whelani* muestran un cariotipo de tipo con 12 pares de autosomas más un par heteromórfico que se identifica como XY ($n = 12+XY$) (Figura 4.7, K-L), excepto el ejemplar 215, cuya fórmula, aunque no ha podido determinarse con exactitud, parece poseer un número menor de cromosomas.

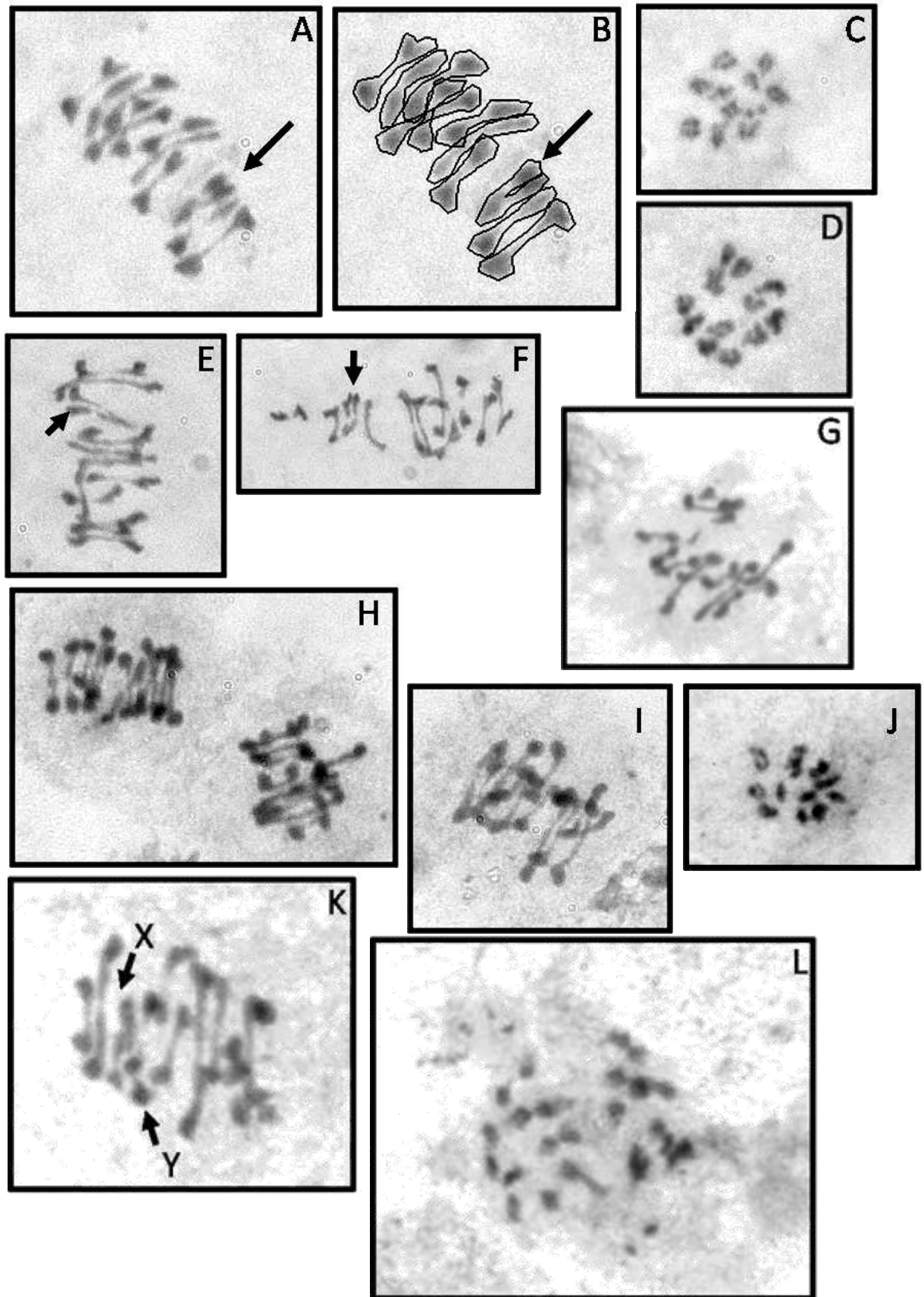


Figura 4.7: Microfotografías de las preparaciones cromosómicas. A: Metafase I de *P. blackburni* mostrando el trivalente (flecha). B: La imagen anterior interpretada separando cada pareja de cromosomas y el trivalente (flecha). C: Metafase II de *P. blackburni* compuesta por 11 cromosomas. D: Metafase II de *P. blackburni* compuesta por 12 cromosomas. E y F: Metafases I de *P. blackburni*, con el trivalente (flechas). G, H e I: Metafase I de *P. australis*. J: Metafase II de *P. australis*. K: Metafase I de *P. whelani*, con un par XY (flechas). L: Metafases II de *P. whelani*.

5.- Discusión

5.1.- Filogenia del género *Pseudotetracha*

En todos los análisis (Figura 5.1), en lo que se refiere a los ejemplares analizados en este trabajo, podemos observar tres grupos bien diferenciados correspondientes a las tres especies determinadas en base a los datos morfológicos (Figura 3.1).

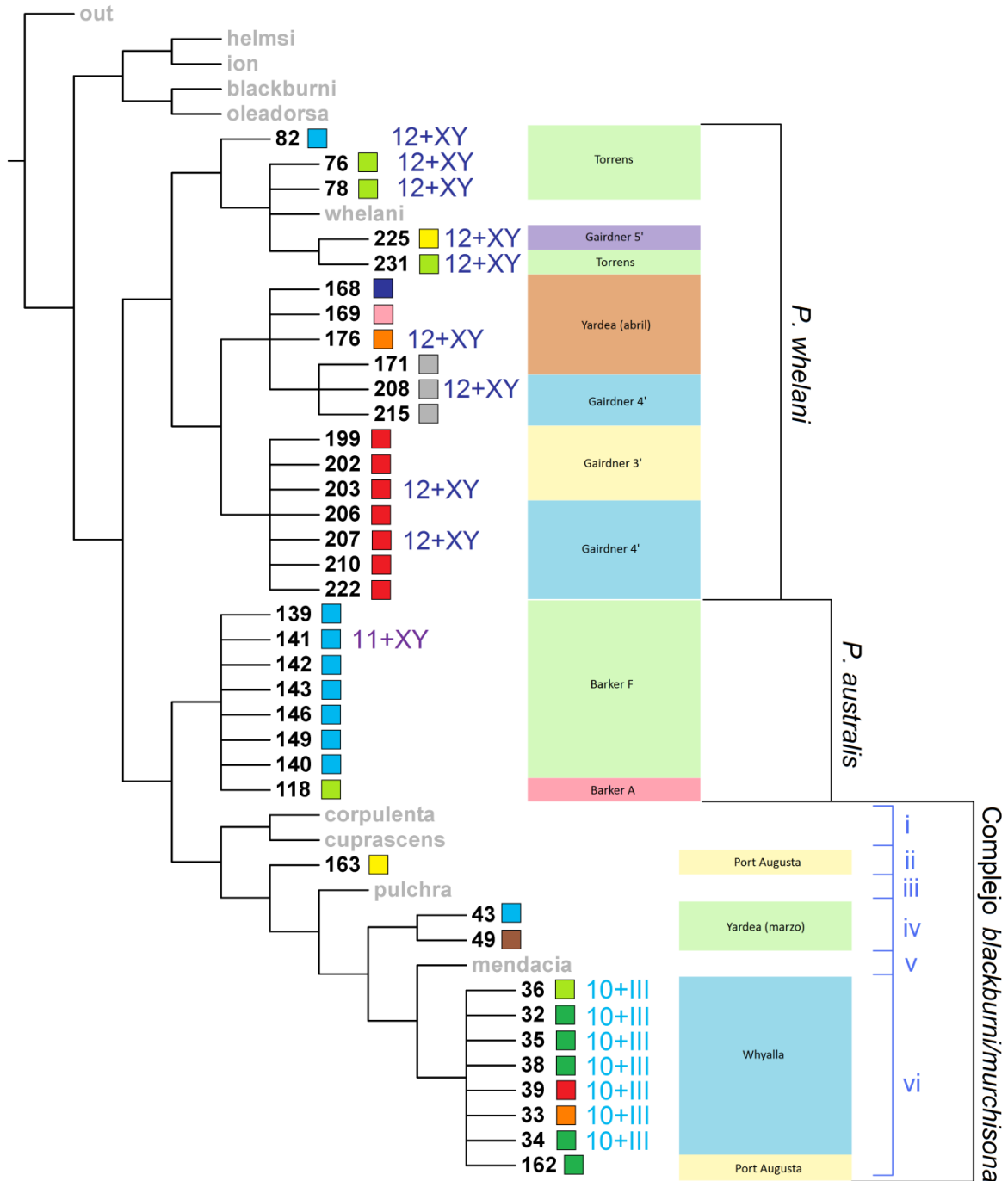


Figura 5.1: Árbol consenso de Máxima Parsimonia sobre el cual se han representado, de izquierda a derecha, los haplotipos de cada ejemplar (cuadros coloreados; véase la leyenda en las figuras 5.2, 5.3 y 5.4), los datos cromosómicos obtenidos, la localidad de captura y la especie asignada en base a la morfología.

Los ejemplares asignados a *P. whelani* se recuperan en todos los casos (Figuras 4.1, 4.2 y 4.3) agrupados en un clado monofilético junto al representante de esta especie empleado por Zerm *et al.* (2007) en su estudio.

Los ejemplares identificados como *P. blackburni* forman parte de un grupo que comprende además de ellos a los representantes de las especies *P. mendacia*, *P. pulchra*, *P. corpulenta* y *P. cuprascens*. Estas especies, según la monografía de Sumlin (1997) basada en la morfología, conforman un complejo de especies relacionadas muy próximas, el llamado “complejo *blackburni/murchisona*”. Llama la atención que el ejemplar de *P. blackburni* del trabajo de Zerm *et al.* (2007) se sitúa en el extremo completamente opuesto de los árboles obtenidos. Zerm *et al.* (2007) utilizan esta posición para negar la existencia del complejo *blackburni/murchisona* (Sumlin, 1997). Sin embargo, atendiendo a nuestros resultados obtenidos de los 11 ejemplares de *P. blackburni* analizados, la hipótesis de la existencia del complejo *blackburni/murchisona* propuesta por Sumlin (1997) se ve corroborada al formar todos sus miembros un clado monofilético y los ejemplares de *P. blackburni* analizados en este trabajo realmente ocupan el lugar asignado por dicho autor, mientras que el ejemplar de Zerm *et al.* (2007) ocupa una posición incoherente con los datos morfológicos. Entre las explicaciones más plausibles de este hecho se encuentra una posible identificación errónea del ejemplar por parte de Zerm *et al.* (2007). Esto no sería descartable *a priori*, ya que según Vilgalys (2003) aproximadamente un 20% de las secuencias en las bases de datos públicas pertenecen en realidad a un organismo distinto al que se refieren. Otras explicaciones alternativas podrían ser una contaminación de la muestra o un etiquetado erróneo, rotulando como *P. blackburni* lo que en realidad era una muestra de ADN de *P. oleadora* o una especie próxima a ésta.

Los ejemplares asignados a la especie *P. australis* conforman un grupo monofilético bien diferenciado, por lo que podemos afirmar que realmente constituyen un taxón homogéneo. En base a la morfología (Sumlin, 1997), los ejemplares analizados pertenecen al taxón *P. australis*. Los datos moleculares obtenidos en este trabajo son los primeros disponibles para esta especie, ya que su estudio no fue abordado en el trabajo de Zerm *et al.* (2007), y tampoco existen secuencias de esta especie en las bases de datos.

El análisis filogeográfico ha permitido obtener una red de haplotipos que resulta ser relativamente incompleta (Figura 4.4), debido a la escasez de datos (haplotipos) derivada del reducido número de muestras. Esto nos ha impedido realizar un análisis cladístico anidado, que nos permita extraer conclusiones apropiadas acerca de la estructura e historia evolutiva de las diferentes

poblaciones. No obstante, la red haplotípica obtenida nos permite observar la clara separación de *P. australis*, *P. whelani* y el complejo *blackburni/murchisona*. Cada uno de estos grupos de haplotipos se verá con detalle en los siguientes apartados.

5.2.- *Pseudotetreacha whelani*

Esta especie se muestra en todos los análisis filogenéticos (Figuras 4.1, 4.2 y 4.3) dividida en tres clados bien diferenciados y siempre monofiléticos:

- Clado A: formado por los ejemplares 76, 78, 82, 225, 231 y whelani.
- Clado B: formado por los ejemplares 168, 169, 171, 176, 208 y 215.
- Clado C: formado por los ejemplares 199, 202, 203, 206, 207, 210 y 222.

Los ejemplares del clado A fueron capturados en la localización Lago Torrens (Figura 5.2), excepto el ejemplar 225, procedente del relativamente cercano Lago Gairdner 5', y el ejemplar del análisis de Zerm *et al.* (2007) cuyo origen se halla en la Laguna Iron Stone, cuya localización no ha podido ser determinada en base a la cartografía empleada (Google Earth™). La red haplotípica los sitúa como un grupo intermedio entre el clado C, más próximo al punto de divergencia de las tres especies y, por lo tanto, presumiblemente el grupo más primitivo, y el clado B.

Las diferentes poblaciones de *P. whelani* estudiadas parecen tener su origen en el Clado A, pues es el más cercano al resto de especies según la red haplotípica (Figura 4.4). Estos ejemplares fueron capturados en la Laguna Island y otros lagos menores colindantes. La red haplotípica indicaría que hubo dos fenómenos de dispersión: uno de ellos dirigido al Lago Everard (localizaciones Gairdner 4' y 3') a través del norte del Lago Gairdner, dando lugar a la población portadora del haplotipo WhA; y el otro hacia el sur del Lago Gairdner (localización Yardea-Abril), dando lugar a una población en la que se presentan los haplotipos WhE, WhF, WhG y WhH. Al menos éste último habría sufrido un nuevo fenómeno de dispersión, colonizando algunos de sus miembros localidades tan alejadas como la llamada Gairdner 4', situada en el extremo opuesto del lago, a más de 100 kilómetros de distancia.

Otra hipótesis que explicaría este hecho sería la posible existencia de una antigua población de *P. whelani* con una amplia distribución poseedora de un polimorfismo haplotípico ancestral, que posteriormente, con la aridificación de Australia, quedó dividida en poblaciones aisladas en cada uno de los lagos. También puede explicarse por un fenómeno de homoplasia, una convergencia en

la secuencia a través de cambios nucleotídicos diferentes que han dado el mismo resultado.

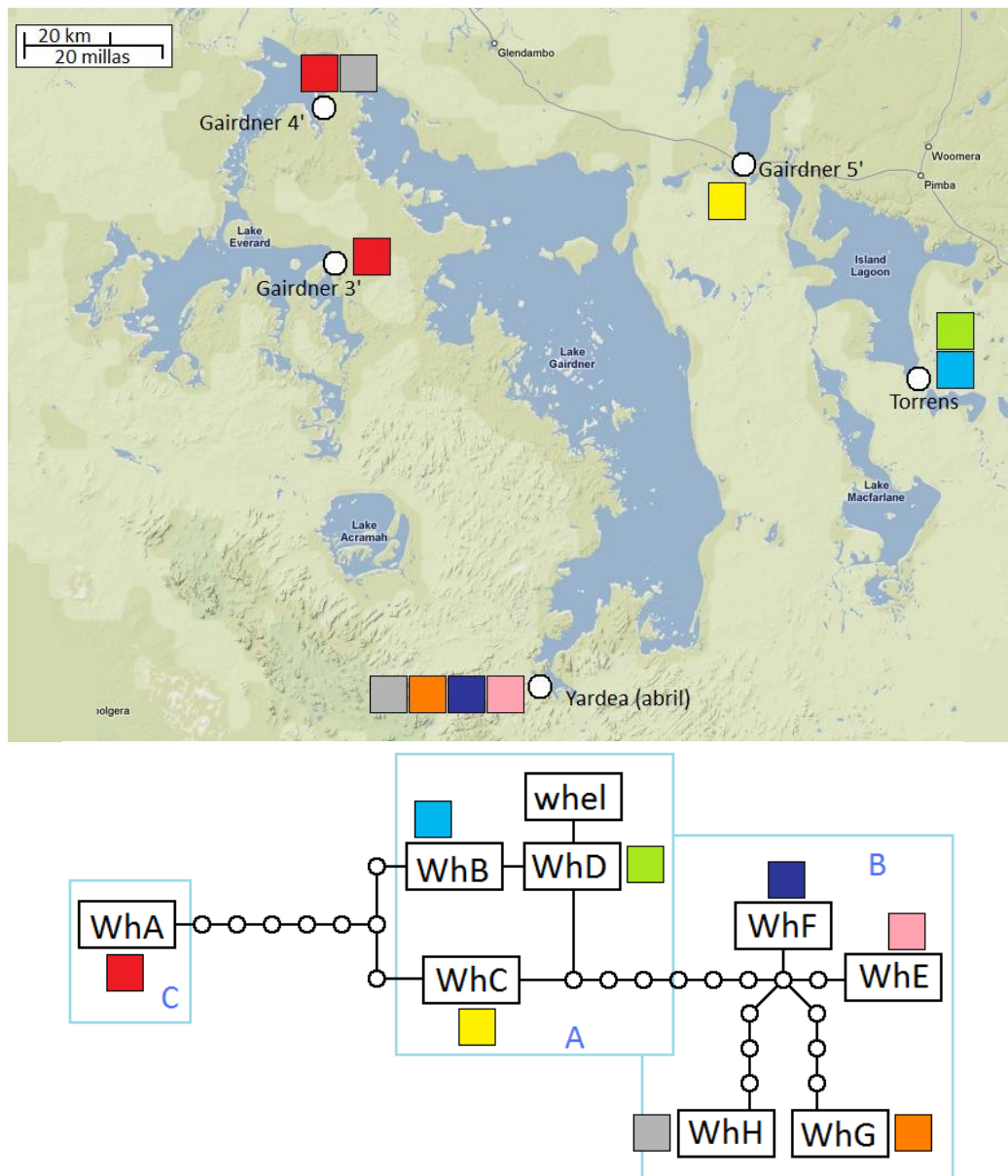


Figura 5.2: Filogeografía de los ejemplares analizados de *P. whelani*. A) Localización espacial de los haplotipos encontrados. B) Red haplotípica de los mismos. Se muestran englobados en recuadros azules los tres clados diferenciados en los análisis filogenéticos.

En cuanto al número cromosómico y sistema de cromosomas sexuales se ha hallado en diferentes ejemplares una fórmula cariotípica de 12 autosomas más un par de heterosomas del tipo XY (Figura 4.7, K-L) en todas las poblaciones, datos que corroboran los resultados previamente obtenidos por Galián y Hudson (1999). El posible número cromosómico reducido en el ejemplar 215 no puede ser explicado debido a la falta de imágenes en las que sus cromosomas se muestren claramente separados; pero se debe tener en cuenta la posibilidad de que se deba a malas condiciones de conservación de la gónada o ser resultado de un artefacto en la preparación.

5.3.- *Pseudotetracha australis*

Esta especie ha sido colectada solamente en dos localidades (Figura 5.3), ambas localizadas en una laguna costera, el Lago Alexandrina, denominado Lago Barker por los recolectores. El número de muestras es muy reducido, tan sólo contamos con ocho ejemplares. De ellos, siete (haplotipo AuF) pertenecen a la localidad Barker F y uno (AuA) a la localidad Barker A. El lugar de captura y el haplotipo muestran una correspondencia exacta en todos los casos, aunque debido al reducido tamaño de la muestra no podemos descartar que cada haplotipo se halle en más lugares y/o que en cada localidad haya más de un haplotipo. Será necesario un futuro estudio más extenso sobre esta especie para aclarar con certeza el estatus genético de cada una de las poblaciones.

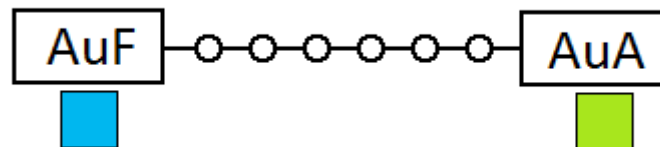
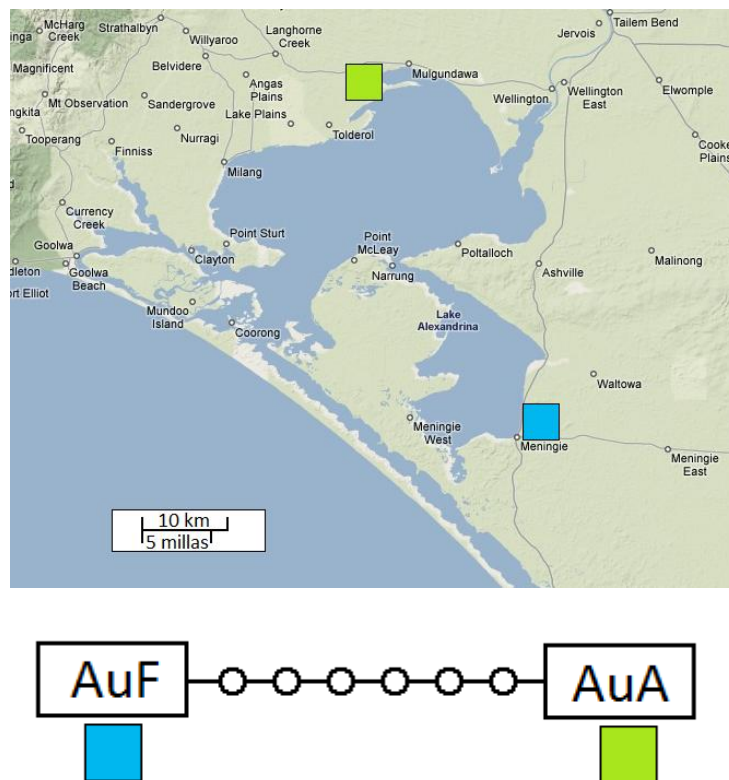


Figura 5.3: Relaciones filogeográficas para los ejemplares analizados de *P. australis*. A) Localización espacial de los haplotipos encontrados. B) Red haplotípica.

Tan sólo se han hallado datos cromosómicos para ejemplares de la localidad Barker F (Figura 5.1), pertenecientes al haplotipo WhF, siendo estos los primeros datos citogenéticos obtenidos para esta especie (Figura 4.7, G-J). Los ejemplares analizados presentan una fórmula cariotípica del tipo 11+XY. En la localidad Barker A no ha sido posible obtener datos cromosómicos debido al avanzado estado de madurez de las gónadas del único ejemplar perteneciente a esta población. Futuros estudios sobre ejemplares de esta población y de otras no analizadas permitirán determinar si la fórmula 11+XY es representativa de la especie.

5.4.- *Pseudotetracha blackburni* y relaciones con otras especies del complejo *blackburni/murchisona*.

Como ya se ha indicado anteriormente, nuestros resultados confirman la validez del complejo *blackburni/murchisona* propuesto por Sumlin (1997) en base a la morfología. Dentro de este grupo se sitúan siempre las especies *P. corpulenta* y *P. cuprascens* como taxones hermanos, en todos los casos ocupando una posición basal, al igual que el ejemplar 163 de *P. blackburni*. Este último se revela en la red haplotípica como raíz de todo el grupo (Figuras 4.4, 4.6 y 5.4).

En general, podemos distinguir seis grupos claramente separados (Figura 5.1) en este complejo de especies comunes a todos los análisis realizados:

- i) *P. corpulenta* y *P. cuprascens* (Zerm *et al.*, 2007).
- ii) Ejemplar 163 (asignado morfológicamente a *P. blackburni* según Sumlin, 1997).
- iii) *P. pulchra* (Zerm *et al.*, 2007).
- iv) Ejemplares 43 y 49 (asignados morfológicamente a *P. blackburni* según Sumlin, 1997).
- v) *P. mendacia* (Zerm *et al.*, 2007).
- vi) *P. blackburni* (ejemplares 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39 y 162).

La posición de *P. pulchra* varía según el análisis empleado. El análisis de Neighbor-Joining y la Inferencia Bayesiana sitúan a *P. pulchra* en una posición basal respecto a todo el grupo, a diferencia de lo obtenido por Zerm *et al.* (2007). Sin embargo, tanto el análisis de Máxima Parsimonia como la red haplotípica la incluyen en el grupo formado por los ejemplares de *P. blackburni* analizados en este trabajo y el ejemplar de *P. mendacia* de Zerm *et al.* (2007), coincidiendo en este caso con el resultado de estos autores. Esta diferencia se debe probablemente al uso de diferentes algoritmos por cada uno de los análisis. Debido a que el estudio de Zerm *et al.* (2007) está realizado con dos fragmentos mitocondriales y uno nuclear, y en el presente estudio tan solo se utiliza un fragmento mitocondrial, se podría admitir que la posición correcta es la segunda.

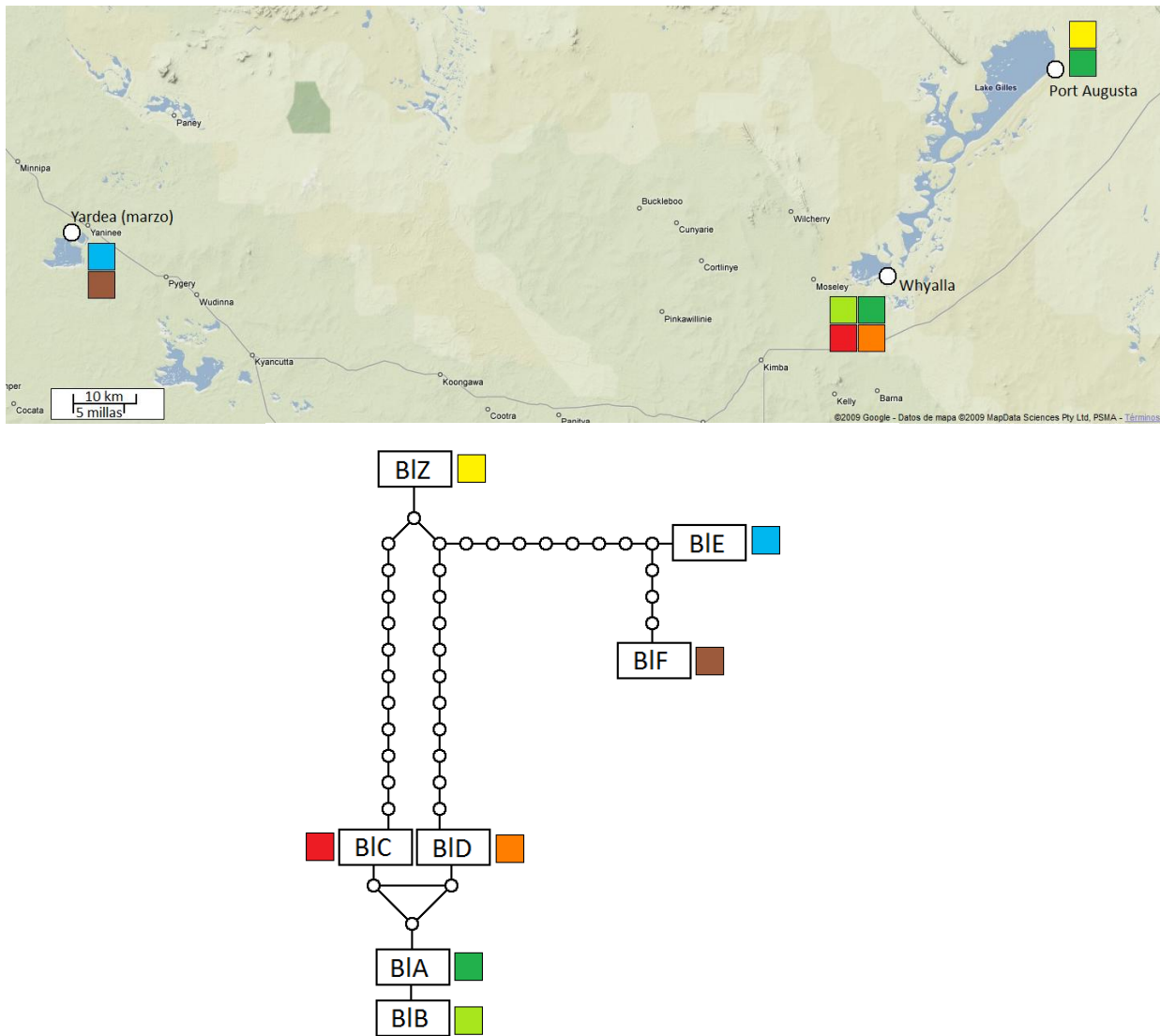


Figura 5.4: Relaciones filogeográficas para los ejemplares analizados de *P. blackburni*. A) Localización espacial de los haplotipos encontrados. B) Red haplotípica.

Los ejemplares 43 y 49, ambas de la población de Yardea-marzo, se muestran en todos los análisis como taxones hermanos, siempre como grupo hermano del resto de los ejemplares de *P. blackburni* analizados en este trabajo (excepto el ejemplar 163) y el ejemplar de *P. mendacia* de Zerm *et al.* (2007). En este último grupo nos encontramos ejemplares tanto de la población de Whyalla como de Port Augusta. Cada una de estas poblaciones muestra un polimorfismo haplotípico, e incluso un haplotipo (BIA) se comparte entre ambas. Sin embargo, al observar la localización geográfica (Figura 5.4) se advierte que ambas localidades se hallan en el mismo lago, el Lago Gilles. Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a la existencia de un polimorfismo en este lago, cuyos haplotipos sin embargo no se comparten con los ejemplares de Yardea-marzo. No obstante, debido al escaso número de ejemplares analizados y los resultados encontrados en *P. whelani* no podríamos descartar que en cada una de estas poblaciones existieran más haplotipos, algunos de los cuales podrían estar compartidos.

La posición filogenética y en la red haplotípica del ejemplar número 163 plantea un problema. Este ejemplar, estudiado morfológicamente siguiendo la clave de identificación de Sumlin (1997), presenta las características correspondientes a la especie *P. blackburni* (Figura 5.5). Sin embargo, los análisis moleculares lo sitúan en una posición basal del complejo *blackburni/murchisona*, como taxón hermano de un grupo que no sólo comprende a ejemplares de *P. blackburni* sino también a representantes de otras especies. Estos datos nos conducen a proponer dos posibles explicaciones a este hecho: (a) Que se trate de un híbrido entre *P. blackburni* y otra especie de este complejo (probablemente *P. murchisona*, la única que no ha sido analizada molecularmente), habiendo heredado la morfología de *P. blackburni* y el ADN mitocondrial de la otra especie; o (b) que corresponda a una entidad separada (especie no descrita), y con morfología similar a *P. blackburni*, y no recogida por lo tanto en la monografía de Sumlin (1997).

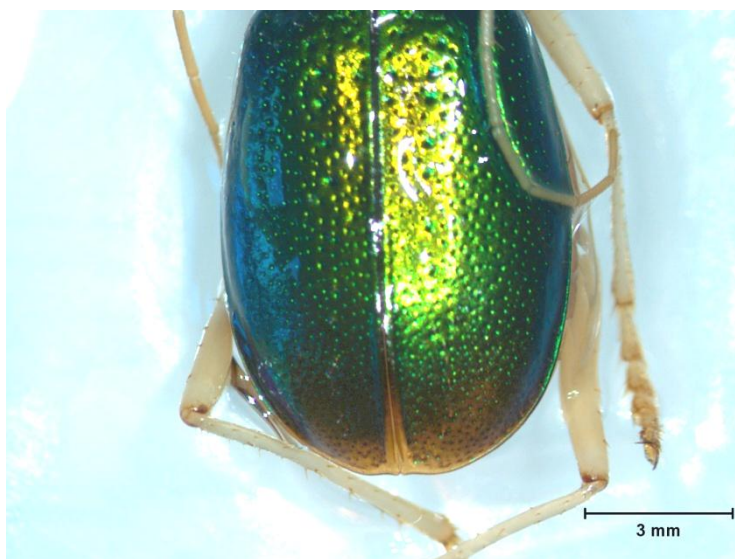


Figura 5.5: Detalle de los élitros del ejemplar número 163, en el que se aprecia su patrón de puntuadura alcanzando los ápices.

Llama la atención la situación de *P. mendacia* (Zerm *et al.*, 2007) incluida en todos los análisis entre los ejemplares de *P. blackburni* (Figuras 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4). Esto podría indicar dos posibles situaciones: (a) El ejemplar etiquetado como *P. mendacia* por Zerm *et al.* (2007) en realidad pertenece a la especie *P. blackburni* (véase el caso del ejemplar de *P. blackburni* de Zerm *et al.*, 2007, comentado en el apartado 5.1), o (b) realmente pertenece al taxón *P. mendacia*, en cuyo caso o bien *P. mendacia* sería candidata a cambiar su estatus taxonómico para ser considerada subespecie de *P. blackburni*, o bien los ejemplares 43 y 49 pertenecerían a una entidad separada (especie críptica) no descrita, muy similar morfológicamente a *P. blackburni*.

La red haplotípica de este grupo de especies muestra un círculo de 27 pasos mutacionales (Figura 5.4), situación posiblemente debida al hecho de que fue necesario forzar al análisis hacia un límite de conectividad elevado para poder unir todos nuestros haplotipos en una única red. Esto es también la causa del círculo que aparece entre los grupos de haplotipos de las tres especies analizadas (Figura 4.4).

El cariotipo de los ejemplares de la localidad Whyalla presenta una fórmula cariotípica compuesta por diez bivalentes autosómicos más un trivalente (Figura 4.7, A-F). Esto representaría un sistema de cromosomas sexuales múltiples en cicindélidos dentro de la tribu Megacephalini, con origen independiente del sistema propio de la tribu Cicindelini (Galián *et al.*, 2002) y fruto de una reorganización cromosómica reciente.

5.5.- Evolución cariotípica en el género *Pseudotetracha* y la tribu Megacephalini

Los resultados citogenéticos obtenidos en el presente trabajo para la especie *P. blackburni* nos revelan la presencia de un sistema de cromosomas sexuales múltiples. Este sistema de determinación cromosómica del sexo no ha sido observado hasta ahora en ningún miembro de la tribu Megacephalini, teniendo presente que los datos obtenidos por Proença *et al.* (1999) para la especie *Megacephala megacephala* no deberían ser tenidos en cuenta, ya que estaban basados solamente en observaciones de la segunda división meiótica, por lo que la existencia de un sistema múltiple fue inferida a partir de estas imágenes, sin observación real de una figura en trivalente en la primera división meiótica.

Tabla 5: Datos de número cromosómico y sistema de cromosomas sexuales en diferentes especies de la tribu Megacephalini.

Especie	n	Referencias
<i>Grammognatha euphratica</i>	15 + X0	Serrano et al 1986, Galián et al 1995
<i>Megacephala megacephala</i>	12 + XXY??	Proença et al 1999
<i>Phaeoxantha cruciata</i>	15 + X0	Proença et al 2005
<i>Pseudotetracha australis</i>	11 + XY	Este trabajo
<i>Pseudotetracha blackburni</i>	10 + III	Este trabajo
<i>Pseudotetracha whelani</i>	12 + XY	Galián y Hudson 1999
<i>Tetracha brasiliensis</i>	5 + XY	Proença et al 2002
<i>Tetracha rutilans</i>	12 + X0	Proença et al 2005
<i>Tetracha sobrina</i>	14 + X0	Proença et al 2005

El origen de este sistema no puede ser determinado con la escasez actual de datos citogenéticos en este género —y para el resto de Megacephalini, grupo en el cual sólo se conocen datos cromosómicos para 9 especies (Tabla 5) (Serrano *et al.*, 1986; Galián y Hudson, 1999; Proença *et al.*, 2005; este trabajo)—. La carencia de datos citogenéticos tanto de los ejemplares que ocupan una posición más basal en el árbol filogenético (163, 43 y 49) como de especies próximas no permite determinar la naturaleza del cariotipo ancestral del cual deriva. Futuros estudios citogenéticos en el complejo *blackburni/murchisona* permitirán determinar el origen y evolución del trivalente hallado, así como su papel en los fenómenos de especiación dentro de este grupo (Rieseberg, 2001; White, 1978). Sin embargo, se podrían proponer dos modelos hipotéticos que expliquen su formación, partiendo por un lado de un cariotipo con 11 pares de autosomas más un único heterosoma (X) o bien partiendo de un cariotipo con 11 pares de autosomas más un par de heterosomas XY (Figura 5.6).

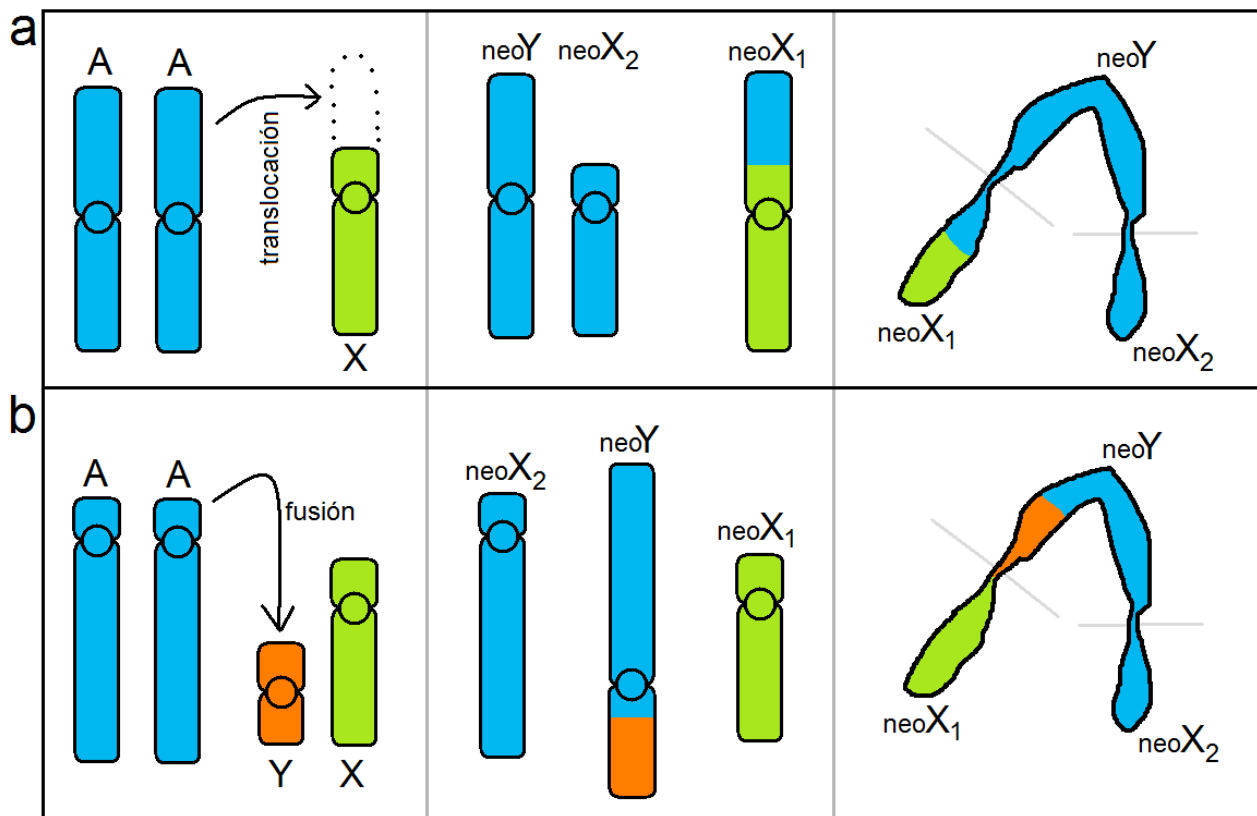


Figura 5.6: Hipótesis planteadas (ver explicación en el texto) para explicar el origen del trivalente hallado en *P. blackburni*. En la primera columna se muestra el sistema original y la reorganización que habría tenido lugar, en la segunda columna el resultado de la misma, y en la tercera la interpretación del trivalente en términos de los elementos originales que lo componen.

En el primer caso (Figura 5.6, A) un fragmento de un autosoma se habría translocado al único heterosoma existente. Entonces su pareja actuaría como neoY, mientras que el nuevo cromosoma translocado actuarían como neoX₁ y el fragmento restante del primitivo autosoma quedaría como neoX₂.

En el segundo caso (Figura 5.6, B) habría tenido lugar un fenómeno de fusión de un autosoma con el cromosoma Y. En ese caso, el cromosoma recién formado actuaría como neoY, emparejándose en la meiosis tanto con el antiguo X (ahora neoX₁) como con el elemento del par autosómico no fusionado (neoX₂). Este proceso implica la pérdida de un centrómero en el nuevo cromosoma, así como la formación de un hipotético cromosoma B que no ha sido detectado, aunque podría haber desaparecido a lo largo de las generaciones (Camacho *et al.*, 2000).

Adicionalmente cabe mencionar el efecto potencial de incorporar genes al sistema de cromosomas sexuales en cuanto al hecho de reducir su recombinación en los heterosomas. Aunque el sistema observado tiene las características de un sistema quiasmático, el papel de esta conexión podría ser más relevante en cuanto a permitir el reparto correcto de los cromosomas que forman el trivalente en la meiosis que en cuanto a la generación de nuevas combinaciones génicas.

El sistema de cromosomas sexuales múltiples de tipo quiasmático detectado en *P. blackburni* sería de reciente formación, ya que no se observa en otras especies próximas como hemos visto para *P. australis* (n = 11+XY) o para *P. whelani* (n = 12+XY). Así mismo, representa un caso aislado, con nada en común con el antiguo sistema de cromosomas sexuales múltiples aquiasmático ampliamente distribuido por la tribu Cicindelini (Galián *et al.*, 2002).

Tratados en conjunto, los datos citogenéticos en Megacephalini (Figura 5.7; Tabla 4) muestran una tendencia a la reducción del número cromosómico, al menos en el linaje australiano *Pseudotetracha* (Galián y Hudson, 1999; este trabajo) y el americano *Tetracha* (Proença *et al.*, 2002; Proença *et al.*, 2005). Esta tendencia a la reducción también se repite en la tribu Cicindelini (Galián *et al.*, 2002; Galián *et al.*, 2007). Ambos grupos derivarían por reducción del supuesto cariotipo ancestral hipotetizado para el suborden Adephaga compuesto por 18 pares de autosomas más un único heterosoma (n = 18+X0) (Galián y Lawrence, 1993; Serrano y Galián, 1998), el cual a su vez procedería del cariotipo ancestral hipotético de los coleópteros, consistente en 9 pares de autosomas más un par XY (n = 9+XY).

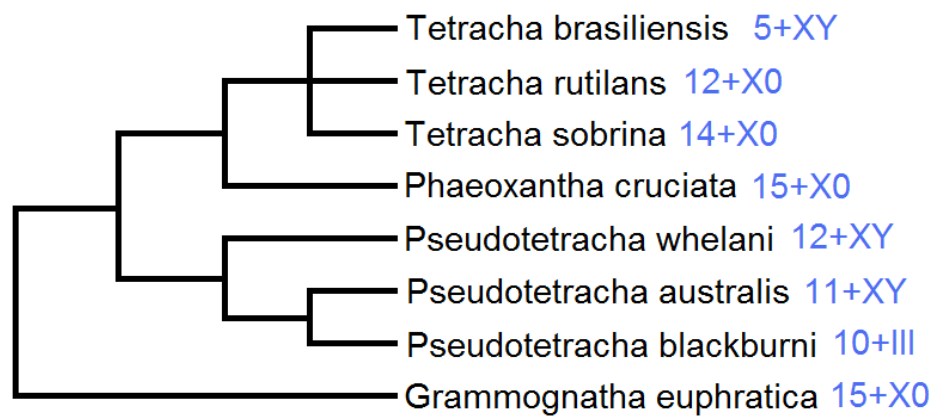


Figura 5.7: Datos cromosómicos conocidos en Megacephalini, localizados sobre el árbol obtenido por Zerm et al. (2007).

La alternancia en sistemas X0 y XY observada en la tribu Megacephalini permite hipotetizar sobre la intervención de los cromosomas sexuales en las reorganizaciones cromosómicas que conducen a la reducción numérica del cariotipo observada en las especies analizadas de la tribu. Así, repetidos ciclos de incorporación de pares autosómicos al sistema de cromosomas sexuales y la posterior pérdida del cromosoma Y podría proponerse como el proceso de ortoselección cariotípica que habría marcado la dinámica evolutiva en la tribu Megacephalini. La incorporación de autosomas al sistema de cromosomas sexuales junto a la reducción en el nivel de recombinación genética en los híbridos debido a esta incorporación tendría un doble efecto: por un lado conduce a la reducción numérica (mediante ortoselección) y por otra parte lleva a la reducción del nivel de recombinación, lo cual podría conducir a la selección de grupos de ligamiento (grupos de genes coadaptados) relacionada con la alta especialización de las especies de Megacephalini. La obtención de nuevos datos citogenéticos en esta tribu permitirá poner a prueba esta hipótesis.

5.6.- Código de barras y taxonomía del ADN en la tribu Megacephalini

La secuencia analizada ha revelado ser de utilidad para ser usada como código de barras de ADN para identificación taxonómica, ya que ha permitido confirmar que los ejemplares de *P. whelani* analizados en este trabajo quedan agrupados en todos los análisis (Figuras 4.1, 4.2 y 4.3) junto al ejemplar procedente del estudio de Zerm et al. (2007). Sin embargo, a la hora de aplicar esta metodología a los ejemplares de la especie *P. blackburni*, han surgido los habituales problemas asociados a la fase temprana de esta técnica de identificación cuando se comienza a aplicar a un grupo de organismos: la escasez de datos moleculares para grupos poco conocidos y la indentificación errónea de taxones en las bases de datos (Vilgalys, 2003).

Además de la falta de secuencias disponibles para Megacephalini, el gen empleado en este estudio (citocromo oxidasa III), elegido para poder comparar nuestros datos con los de Zerm *et al.* (2007), está escasamente representado en las bases de datos, por lo que su validez para utilizarlo como código de barras de ADN en la identificación de ejemplares queda relegado a aquellos grupos en los que se dispone de su secuencia, como es el caso de la tribu Megacephalini. Sin embargo, estudios recientes (Vialle *et al.*, 2009) han demostrado que en ciertos casos el uso de este gen es más apropiado que otros más comunes, como la citocromo oxidasa I.

Por otro lado, actualmente los representantes de la tribu Megacephalini en Australia se encuentran muy poco estudiados a todos los niveles, al igual que muchos otros grupos de organismos. Se estima que todavía queda un relativamente elevado número de especies por descubrir. El principal motivo de este desconocimiento es el hábitat en el que viven estos insectos: zonas extremadamente áridas y frecuentemente alejadas de asentamientos humanos, las cuales sólo son muestreadas ocasionalmente durante un reducido número de expediciones de recolección. El desconocimiento que existe acerca de estos organismos y la existencia inferida de taxones por describir convierten a este grupo en un ejemplo ideal para aplicar los métodos de la taxonomía del ADN.

De hecho, determinados grupos de cicindélidos ya han sido objeto de estudios de taxonomía del ADN, como es el caso del trabajo de Pons *et al.* (2006) en el género *Rivacindela*, perteneciente a la tribu Cicindelini. Para ello estos autores emplearon las secuencias de tres genes mitocondriales: citocromo oxidasa I, apoenzima citocromo b y rRNA 16S. Con este análisis estimaron la existencia de 48 especies, algunas de ellas no descritas.

En este trabajo el ejemplar número 163 (Figura 5.5), asignado a la especie *P. blackburni* según la morfología (Sumlin, 1997), se revela como una entidad separada. Cabe la posibilidad de que este ejemplar represente a una especie críptica hasta ahora desconocida, indiferenciable de *P. blackburni* en cuanto a los caracteres diagnóstico tradicionales. Así mismo, si se considera a *P. mendacia* como una especie independiente de *P. blackburni*, se podría considerar a los ejemplares 43 y 49 como otra entidad separada y posible especie no descrita. El análisis de estos ejemplares utilizando otros genes, tanto nucleares como mitocondriales, y añadiendo individuos que se capturen en futuras expediciones, ayudará a comprender mejor la taxonomía y la diversidad del género *Pseudotetracha*.

6.- Resumen y conclusiones

6.1.- Resumen

Se ha realizado un estudio de tres especies del escasamente estudiado género australiano *Pseudotetracha* Fleutiaux, 1894, perteneciente a la tribu Megacephalini, a varios niveles: citogenético, filogenético y filogeográfico.

El estudio citogenético se llevó a cabo por observación directa bajo microscopía óptica de preparaciones obtenidas mediante el método de *squash*, determinando en base a las observaciones tanto de la primera como de la segunda división meiótica el número de autosomas y el sistema de cromosomas sexuales. Se confirma el dato obtenido por Galián y Hudson (1999) acerca de *P. whelani*, con 12 pares de autosomas más un par de heterosomas XY. *P. australis* posee una fórmula meiótica del tipo $n=11+XY$, mientras que *P. blackburni* presenta 10 pares de autosomas más un trivalente fruto de una translocación o fusión en la que están implicados los heterosomas. Puestos en conjunto con los datos citogenéticos disponibles en la bibliografía para otros miembros de la tribu Megacephalini, los resultados de este trabajo evidencian un posible proceso de ortoselección cartiotípica por ciclos repetidos de incorporación de autosomas al par de heterosomas y pérdida del cromosoma Y, hipótesis que requerirá de una ampliación en el conjunto de datos citogenéticos disponibles de este grupo de organismos para poder ser validada.

Además se extrajo ADN de los ejemplares para proceder con análisis filogenéticos (utilizando los métodos de Neighbor-Joining, Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana) y contruir la red haplotípica. El análisis filogenético de las tres especies, junto con las secuencias procedentes del trabajo de Zerm *et al.* (2007), confirma la posición de *P. whelani* según el árbol obtenido por estos autores. En todos los análisis esta especie queda dividida en tres clados, concordantes con los resultados del análisis filogeográfico. Estos tres agrupamientos tienen además una base geográfica, cuya explicación requiere invocar o bien la posible existencia de un antiguo polimorfismo ancestral en la población, la cual sufrió una fragmentación frente a condiciones ambientales desfavorables, o alternativamente la existencia de al menos tres fenómenos pasados de dispersión a larga distancia.

Así mismo, los resultados filogenéticos y filogeográficos para la especie *P. australis* también son congruentes, existiendo una correspondencia exacta en cuanto a filogenia, haplotipo y localización geográfica. Sin embargo, la escasez de ejemplares impide sacar conclusiones bien soportadas para esta especie.

Los métodos filogenéticos demostraron que no todos los ejemplares asignados morfológicamente a la especie *P. blackburni* pueden ser considerados como tales en base a la taxonomía del ADN, como es el caso del ejemplar 163, y lo mismo se puede decir de los ejemplares 43 y 49 si se considera a *P. mendacia* como especie válida. No obstante, se debe tener en cuenta que estos resultados se basan en el análisis de un único gen, y las hipótesis propuestas deberán ser puestas a prueba mediante nuevos análisis filogenéticos utilizando más genes tanto nucleares como mitocondriales.

6.2.- Conclusiones

- Las especies *P. whelani* y *P. australis* y el complejo de especies *blackburni/murchisona* tal como fue definido por Sumlin (1997) forman grupos monofiléticos bien diferenciados y constituyen por lo tanto taxones válidos.
- La negación de la existencia del complejo *blackburni-murchisona* por parte de Zerm *et al.* (2007) basándose en datos moleculares resulta ser incongruente con los resultados obtenidos en este trabajo, posiblemente debido a una identificación errónea del ejemplar empleado por estos autores o a un descuido en la manipulación de este individuo.
- Los primeros datos moleculares para la especie *P. australis* apuntan a una situación muy próxima al complejo *blackburni-murchisona*.
- *P. whelani* se divide en tres grupos, congruentes con la localización geográfica de los individuos que lo componen. Los ejemplares más basales se sitúan en los alrededores de la Laguna Island. La distribución de los haplotipos indica bien la existencia de un polimorfismo ancestral o bien diversos eventos de dispersión a larga distancia.
- El cariotipo hallado para la especie *P. whelani* concuerda con los resultados obtenidos por Galián y Hudson (1999), consistentes en 12 pares de autosomas más un par de heterosomas XY.
- Los resultados citogenéticos para la especie *P. australis*, para la cual no se tenían datos cromosómicos, indican que posee 11 pares de autosomas más un par de heterosomas XY.
- El ejemplar 163, morfológicamente asignado a *P. blackburni*, se revela separado del resto de ejemplares de esta especie, conformando una entidad independiente que posiblemente represente una especie no descrita, la cual ocuparía una posición basal dentro del complejo de especies *blackburni/murchisona*.
- La situación de *P. mendacia* indica que o bien debería revisarse su estatus taxonómico para

ser considerada subespecie de *P. blackburni* o bien se debe considerar a los ejemplares 43 y 49 como otra entidad independiente de *P. blackburni*. Además, los datos filogeográficos en este grupo apuntan a que estos dos individuos conforman un grupo de haplotipos bien separado del resto de haplotipos de *P. blackburni*.

- La posición de *P. pulchra* según Zerm *et al.* (2007) se ve soportada por el análisis de Máxima Parsimonia realizado en este trabajo.
- Los datos citogenéticos para *P. blackburni* muestran una fórmula meiótica formada por 10 pares de autosomas más un trivalente fruto de una reorganización cromosómica, constituyendo un sistema de determinación cromosómica del sexo por un sistema de cromosomas sexuales múltiples, nunca antes observado en la tribu Megacephalini. Este sistema de cromosomas sexuales tendría un origen reciente y características diferentes al ampliamente distribuido en la tribu Cicindelini. Su origen puede hipotetizarse a partir de una translocación en un cariotipo con meiofórmula $11+X0$ o bien mediante una fusión en un sistema $11+XY$, ambas reorganizaciones implicando a los heterosomas.
- Los datos citogenéticos disponibles para la tribu Megecephalini muestran una tendencia a la reducción del número cromosómico, en la que intervendrían los heterosomas. Se puede hipotetizar un proceso de ortoselección cariotípica, consistente en repetidos ciclos de incorporación de pares autosómicos a los heterosomas y pérdida del cromosoma Y.
- El hecho de incorporar genes a los heterosomas implicaría una reducción en su tasa de recombinación, lo cual, junto con la reducción del número cromosómico, podría favorecer los procesos de especiación y estar relacionado con la alta especialización de las especies de la tribu Megacephalini.
- La secuencia empleada es apropiada para estudios de código de barras de ADN, a pesar de la presencia de problemas relacionados con la escasez de datos en este grupo y los errores en bases de datos.
- La taxonomía del ADN se revela como una técnica apropiada para el estudio del género *Pseudotetracha*, en el que se estima que queda un amplio número de especies por descubrir, como podría ser el caso del ejemplar 163 y, posiblemente, los individuos 43 y 49.

7.- Bibliografía

- Abellán, P., Gómez-Zurita, J., Millán, A., Sánchez-Fernández, D., Velasco, J., Galián, J., Ribera, I. 2006. Conservation genetics in hypersaline inland waters: mitochondrial diversity and phylogeography of an endangered Iberian beetle (Coleoptera: Hydraenidae). *Conservation Genetics* 8: 79-88.
- Australian Faunal Directory. Department of the Environment, Water, Heritage and the Arts, Australian Government. http://www.environment.gov.au/biodiversity/abrs/online-resources/fauna/afd/taxa/megacephala_corpulenta/checklist#selected
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Baker, R.J., Bickman, W.J. 1986. Speciation by monobranched centric fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 8245-8248.
- Brooker, P C. 1982. Robertsonian translocations in *Mus musculus* from N.E. Scotland and Orkney. *Heredity* 48: 305-309.
- Camacho, J.P., Sharbel, T.F., Beukeboom, L.W. 2000. B-Chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 355: 163-178.
- Carson, H.L. 1970. Chromosome tracers of the origin of species. *Science* 168: 1414-1418.
- Chaudoir, M. de, 1865. *Catalogue de la collection de cicindélètes de M. le Baron de Chaudoir*. J. Nuys, Bruselas.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.
- Coyne, J.A., Orr, H.A. 1998. The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 353: 287-305.
- Crowson, R.A. 1981. *The biology of the Coleoptera*. Academic Press, London.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein, J., Kishino, H. 1993. Is there something wrong with the bootstrap on phylogenies? A reply to Hillis and Bull. *Systematic Biology* 42: 193-200.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.
- Ferreira, A., Cella, D.M., Tardivo, J.R., Virkki, N. 1984. Two pairs of chromosomes: a new low record for Coleoptera. *Revista Brasileira de Genética* 7: 231-239.
- Fleutiaux, E. 1894. Supplement au "Catalogus Coleopterorum" de Gemminger et Harold, Vol. V, 1869. *Annales de la Société Entomologique Belge* 1894: 687-691.

- Fleutiaux, E. 1895. Descriptions de deux espèces Nouvelles De Cicindelidae (Col.). Bulletin de la Société Entomologique de France 95: 245–246.
- Futuyma, D.J., Mayer, G.C. 1980. Non-allopatric speciation in animals. Systematic Zoology 29: 254-271.
- Galián, J., Hogan, J.E., Vogler, A.P. 2002. The origin of multiple sex chromosomes in tiger beetles. Molecular Biology and Evolution 19: 1792-1796.
- Galián, J., Hudson, P. 1999. Cytogenetic analysis of Australian tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae): Chromosome number, sex-determining system and localisation of rDNA genes. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 37: 1-6.
- Galián, J., Lawrence, J.F. 1993. First karyotypic data on a cupedid beetle (Coleoptera: Archostemata) showing achiasmatic meiosis. Entomological News 104: 83-87.
- Galián, J., Proença, S.J.R., Vogler A.P. 2007. Evolutionary dynamics of autosomal-heterosomal rearrangements in a multiple-X chromosome system of tiger beetles (Cicindelidae). BMC Evolutionary Biology 7: 158.
- Galián, J., Serrano, J., De La Rúa, P., Petitpierre, E., Juan, C. 1995. Localization and activity of rDNA Genes in tiger beetles (Coleoptera: Cicindelinae). Heredity 74: 524-530.
- Giers, E. 1977. Die Nicht-Homologen-Assoziation multipler Geschlechtschromosomen in der Spermatogeneis von *Cicindela hybrida*. Tesis Doctoral, Universidad de Muenster, Alemania.
- Goloboff, P., Farris, J., Nixon, K. 2003. T.N.T.: Tree analysis using new technology. Programa y documentación, disponibles desde los autores, y en www.zmuc.dk/public/phylogeny.
- Gómez-Zurita, J., Petitpierre, E., Juan, C. 2000. Nested cladistic analysis, phylogeography and speciation in the *Timarcha goettingensis* complex (Coleoptera, Chrysomelidae). Molecular Ecology 9: 557-570.
- Google Earth™, 2005-2009, Google Inc. (<http://earth.google.es>).
- Grant, V. 1981. Plant speciation. Columbia University Press.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., Dewaard, J. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B 270: 313-321.
- Hewitt, G. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B 359: 183-195.
- Hewitt, G. M. & Barton, N. H. 1980 The structure and maintenance of hybrid zones as exemplified by *Podisma pedestris*. En: Blackman, R. L., Hewitt, G. M., Ashburner, M. (Eds.). Insect Cytogenetics. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hey, J. 1997. Mitochondrial and nuclear genes present conflicting portraits of human origins. Molecular Biology and Evolution 14: 166-172.
- Horn, W. 1910. Coleoptera Adepaga, Fam. Carabidae, Subfam. Cicindelinae. En: Wytzman, P.,

(Ed.). Genera Insectorum. Desmet-Vereneuil, Bruselas.

- Huber, R.L. 1994. A new species of *Tetracha* from the west coast of Venezuela, with comments on genus-level nomenclature (Coleoptera: Cicindelidae). *Cicindela* 26: 49–75.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Hunt, T., Bergsten, J., Levkanicova, Z., Papadopoulou, A., StJohn, O., Wild, R., Hammond, P.M., Ahrens, D., Balke, M., Caterino, M.S., Gómez-Zurita, J., Ribera, I., Barraclough, T.G., Bocakova, M., Bocak, L., Vogler, A.P. 2007. A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science* 318: 1913-1916
- Jeannel, R. 1942. Coléoptères Carabiques, Part 1. *Faune France* 39: 1-571.
- King, M. 1993. *Species evolution: The role of chromosome change*. Cambridge University Press.
- Knisley B., Schultz T.D. 1997. *The biology of tiger beetles and a guide to the species of the south atlantic states*. Virginia Museum of Natural History, Martinsville.
- Lewis, H. 1966. Speciation in flowering plants. *Science* 152: 167-172.
- Maddison, D.R., Moore, W., Baker, M.D., Ellis, T.M., Ober, K.A., Cannone, J.J., Gutell, R.R. 2009. Monophyly of terrestrial adephagan beetles as indicated by three nuclear genes (Coleoptera: Carabidae and Trachypachidae). *Zoologica Scripta* 38: 43-62.
- McCairns, R.F., Freitag, R., Rose, H.A., McDonald, F.J.D. 1997. Taxonomic revision of the Australian Cicindelidae (Coleoptera), excluding species of *Cicindela*. *Invertebrate Taxonomy* 11: 99-687.
- Morgan-Richards, M. 1997. Intraspecific karyotype variation is not concordant with allozyme variation in the Auckland tree weta of New Zealand, *Hemideina thoracica* (Orthoptera: Stenopelmatidae). *Biological Journal of the Linnaean Society* 60: 423-442.
- Morgan-Richards, M., Wallis, G. P. 2003. Degree of cytogenetic differentiation fails to predict hybrid zone width in the weta *Hemideina thoracica* (Orthoptera: Anostostomatidae). *Evolution* 57: 849-861.
- Morgan-Richards, M., Trewick, S. A., Wallis, G. P. 2000. Characterization of a hybrid zone between two chromosomal races of the weta *Hemideina thoracica* following a geologically recent volcanic eruption. *Heredity* 85: 586-592.
- Navarro, A., Barton, N.H. 2003. Chromosomal speciation and molecular divergence - accelerated evolution in rearranged chromosomes. *Science* 300: 321-324.
- Pearson, D. L., Vogler A. P. 2001. *Tiger beetles: the evolution, ecology, and diversity of the cicindelids*. Cornell University Press.
- Pearson, D.L., Blum, M.S., Jones, T.H., Fales, H.M., Gonda, E., White, B.R. 1988. Historical perspective and the interpretation of ecological patterns: defensive compounds of tiger

- beetles (Coleoptera: Cicindelidae). *American Naturalist* 132: 404-416.
- Pearson, P.L. 1973. Banding patterns chromosome polymorphism and primate evolution. *Progress in Medical Genetics* 2: 174-197.
- Petitpierre, E. 1996. Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 25: 115-133.
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gómez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D., Vogler, A.P. 2006. Sequence-based species delimitation for undescribed insects. *Systematic Biology* 55: 595-609.
- Proença, S.J.R., Collares-Pereira, M.J., Serrano, A.R.M. 2005. Chromosome evolution in tiger beetles: karyotypes and localization of 18S rDNA loci in Neotropical Megacephalini (Coleoptera, Cicindelidae). *Genetics and Molecular Biology* 28: 725-733.
- Proença, S.J.R., Galián, J. 2003. Chromosome evolution in the genus *Cicindela*: physical mapping and activity of rDNA loci in the tiger beetles species in *Cicindela littoralis* And *C. flexuosa* (Coleoptera). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 41: 1-6.
- Proença, S.J.R., Serrano, A.R.M., Collares-Pereira, M.J. 1999. First record on the cytotaxonomy of cicindelids (Insecta, Coleoptera) from an afrotropical region. *Caryologia* 52: 37-47.
- Proença, S.J.R., Serrano, A.R.M., Collares-Pereira, M.J. 2002. Cytogenetic variability in genus *Odontocheila* (Coleoptera, Cicindelidae): karyotypes, C-Banding, NORs and localisation of ribosomal genes of *O. confusa* And *O. nodicornis*. *Genetica* 114: 237-245.
- Proença, S.J.R., Serrano, A.R.M., Collares-Pereira, M.J. 2003. An unusual karyotype with low chromosome number in Megacephalini, a basal group of tiger beetles (Coleoptera, Cicindelidae): Cytogenetic characterisation by C-banding and location of rDNA genes. *Hereditas* 137: 202-207.
- Rieseberg, L.H. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 351-358.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. Mrbayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rothfels, K.H. 1980. Chromosomal variability and speciation in blackflies. En: Blackman, R.L., Hewitt, G.M., Ashburner, M. (Eds.). *Insect cytogenetics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Savolainen, V., Cowan, R.S., Vogler, A.P., Roderick, G.K., Lane, R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: An introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 360: 1805-1811.
- Schneider, M.C., Rosa, S.P., Almeida, M.C., Costa, C., Cella, D.M. 2004. Chromosomal similarities and differences among four Neotropical Elateridae (Conoderini and Pyrophorini) and other

- related species, with comments on the NOR patterns in Coleoptera. *Journal Of Zoological Systematics and Evolution Research* 45: 308-316.
- Searle, J.B. 1998. Speciation, chromosomes, and genomes. *Genome Research* 8: 1-3.
- Serrano, J. & Galian, J. 1998. A review of karyotypic evolution and phylogeny of carabid beetles (Insecta: Coleoptera). En: Ball, G.E., Casale, A., Vigna-Taglianti, A. (Eds.), *Phylogeny and classification of Caraboidea*. ATTI, Torino.
- Serrano, J. 1981. Chromosome numbers and karyotypic evolution of Caraboidea. *Genetica* 55: 51-60.
- Serrano, J., Galián, J., Ortiz, A. 1986. Cicindelid beetles without multiple sex chromosomes (Coleoptera, Caraboidea). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 28: 235-239.
- Shaw, D.D., Moran, C., Wilkinson, P. 1980. The mechanism of speciation in the genus *Caledia*. En: Blackman, R.L., Hewitt, G.M., Ashburner, M. (Eds.). *Insect cytogenetics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Shull, V.L., Vogler, A.P., Baker, M.D., Maddison, D.R., Hammond, P.M. 2001. Sequence alignment of 18S ribosomal RNA and the basal relationships of adepghan beetles: evidence for monophyly of aquatic families and the placement of Trachypachidae. *Systematic Biology* 50: 945-969.
- Sites, J.W., Moritz, C. 1987. Chromosomal evolution and speciation revisited. *Systematic Zoology* 36: 153-174.
- Smith, S.G., Virkki, N. 1978. *Animal cytogenetics*. Gebrüder Borntraeger, Berlín.
- Sumlin, W.D. 1992. Studies on the Australian Cicindelidae X: Notes on *Megacephala* and *Cicindela* with the description of a new species (Coleoptera). *Cicindelidae: Bulletin of Worldwide Research* 4: 27-29.
- Sumlin, W.D. 1997. Studies on the Australian cicindelidae XII: Additions to *Megacephala*, *Nickerlea* and *Cicindela* with notes (Coleoptera) *Cicindelidae: Bulletin of Worldwide Research* 4: 1-56.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Templeton, A.R. 1981. Mechanisms of speciation - a population genetic approach. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12: 23-48.
- Templeton, A.R. 2006. *Population genetics and microevolutionary theory*. John Wiley & Sons, New Jersey.
- Vialle, A., Feau, N., Allaire, M., Didukh, M., Martin, F., Moncalvos, J.M., Hamelin, R.C. 2009. Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota. *Molecular Ecology Resources* 9: 99-113.

- Vilgalys, R. 2003. Taxonomic misidentification in public DNA databases. *New Phytologist* 160: 4-5.
- Vogler, A.P., Monaghan, T. 2007. Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45: 1-10.
- Vogler, A.P., Pearson, D.L. 1996. A molecular phylogeny of tiger beetles (Cicindelidae): Congruence of mitochondrial and nuclear rDNA sets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6: 321-338.
- White, M.J.D. 1978. *Models of speciation*. W.H. Freeman & Company.
- Yoshida, H.T., Sagai, T. (1973) Similarity of Giemsa banding patterns of chromosomes in several species of the genus *Rattus*. *Chromosoma* 41: 93–101.
- Zerm, M., Wiesner, J., Ledezma, J., Brzoska, D., Drechsel, U., Cicchino, A.C., Rodríguez, J.P., Martinsen, L., Adis, J., Bachmann, L. 2007. Molecular phylogeny of Megacephalina Horn, 1910 tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 42: 211-219.

ANEXO I: Alineamiento del fragmento de la citocromo oxidasa III (365 pares de bases) analizado en todos los ejemplares analizados. El punto indica igualdad de base.

```

[           111 111 111 122 222 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555 556 666 666 666 777 777 777 ]
[         123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 ]
#168      TCT TCT CAC CTC AGG AAT TAC AGT TAC TTG GGC TCA TCA TAG CCT CAT AGA AAA TAA TTA CAA GCA AGC CTT TCA AGG
#169      ... ..
#171      ... ..
#176      ... .. G.. .. A.. ..
#199      ... .. C.. .. A.. ..
#202      ... .. C.. .. A.. ..
#203      ... .. C.. .. A.. ..
#206      ... .. C.. .. A.. ..
#207      ... .. C.. .. A.. ..
#208      ... .. C.. .. A.. ..
#210      ... .. C.. .. A.. ..
#215      ... .. C.. .. A.. ..
#222      ... .. C.. .. A.. ..
#225      -.. .. T.. ..
#231      ... .. T.. ..
#36       ... .. T.. T.. .. A.. C.. A.. .. T.. .. T.. .. .A. T.. ..
#32       ... .. T.. T.. .. A.. C.. A.. .. T.. .. T.. A.. .A. T.. ..
#35       ... .. T.. T.. .. A.. C.. A.. .. T.. .. T.. A.. .A. T.. ..
#38       ... .. T.. T.. .. A.. C.. A.. .. T.. .. T.. A.. .A. T.. ..
#39       ... .. T.. T.. .. .CG G.. C.. A.. .. T.. .. T.. A.. .A. T.. ..
#76       ... .. T.. ..
#78       ... .. T.. ..
#82       -.. .. T.. .. A.. ..
#139      ... .. T.. T.. .. A.. C.. T.. .. T.. A.. .. G..
#141      ... .. T.. T.. .. A.. C.. T.. .. T.. A.. .. G..
#142      ... .. T.. T.. .. A.. C.. T.. .. T.. A.. .. G..
#143      ... .. T.. T.. .. A.. C.. T.. .. T.. A.. .. G..
#146      ... .. T.. T.. .. A.. C.. T.. .. T.. A.. .. G..
#149      ... .. T.. T.. .. A.. C.. T.. .. T.. A.. .. G..
#163      ... .. T.. T.. .. ?.. A.. C.. T.. .. T.. A.. .. T.. ..
#33       ... .. ?.. T.? .. A.. C.. T.. .. T.. A.. .A. T.. ..
#34       ... .. T.. T.. .. A.. C.. A.. .. T.. .. T.. A.. .A. T.. ..
#162      ... .. T.. T.. .. A.. C.. A.. .. T.. .. T.. A.. .A. T.. ..
#140      ... .. T.. T.. .. A.. C.. T.. .. T.. A.. .. G..
#118      ... .. T.. T.. .. A.. C.. T.. .. T.. A.. .. G..
#43       ... .. T.. T.. .. .?. .. ?.. A.. .. T.. .. T.. A.. .. T.. ..
#49       --- --- -.. T.. ?A .?. -. .?. .?G G.. ?? ?.. ? ?.. .. K?. .?R ... ?.. .. T?. A.. G?? T.. .?. ?..
#blackburni ... .. A.. .. G.. .. A.. C.. A.. .. C.. .. T.. .. T.. ..
#corpulenta ... .. T.. T.. .. C.. .. A.. .. A.. .. C.. .. T.. .. T.. C.. ..
#cuprascens ... .. T.. T.. .. C.. G.. A.. .. A.. .. C.. .. T.. .. T.. ..
#helmsi     C.. .. T.. T.. .. C.. C.. A.. .. .T. A.. .. C.. T.. A.. .. C.. ..
#ion        ... .. A.. .. A.. C.. A.. C.. .. TT. A.. .. C.. T.. .. T.. ..
#mendacia   ... C.. T.. T.. .. A.. C.. .. T.. T.. .. C.. T.. A.. ..
#oleadora   ... .. T.. A.. G.. .. C.. C.. A.. .. C.. T.. A.. .. C.. C.. T.. A.. .. T.. ..
#pulchra    ... .. T.. T.. .. .T. .. A.. C.. A.. .. T.. .. T.. A.. .. T.. G.. ..
#whelani    ... .. T.. ..
#out(odon.conf) .T. A.. T.. T.. C.. .. A.. A.. A.. .. C.. TT. A.. .. TT. T.. .. TC. A.. ..

```

	788	888	888	889	999	999	999	000	000	000	011	111	111	112	222	222	222	333	333	333	344	444	444	445	555	555	
[
[901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	
#168	ACT	CTT	ATT	TAC	AGT	CCT	ATT	AGG	AGC	ATA	CTT	TAC	AGC	CCT	TCA	AGC	ATA	TGA	ATA	CTT	TGA	ATC	CCC	ATT	TAC	TAT	
#169
#171	T..
#176
#199	G..	G..	G..	C..
#202	G..	G..	G..	C..
#203	G..	G..	G..	C..
#206	G..	G..	G..	C..
#207	G..	G..	G..	C..
#208	T..
#210	G..	G..	G..	C..
#215	T..
#222	G..	G..	G..	C..
#225	G..	G..	?	?
#231	G..	G..
#36	...	T..	.C.	...	T..	C..	T..	C..	G..	C..
#32	...	T..	.C.	...	T..	C..	T..	C..	G..	C..
#35	...	T..	.C.	...	T..	C..	T..	C..	G..	C..
#38	...	T..	.C.	...	T..	C..	T..	C..	G..	C..
#39	...	T..	.?	...	T..	C..	T..	C..	G..	C..
#76	G..	G..
#78	G..	G..
#82	G..	G..
#139	...	TA.	AT.	...	G..	G..	...	C..	C..	G..	...	C..	G..	...	C..	G..	...
#141	...	TA.	AT.	...	G..	G..	...	C..	C..	G..	...	C..	G..	...	C..	G..
#142	...	TA.	AT.	...	G..	G..	...	C..	C..	G..	...	C..	G..	...	C..	G..
#143	...	TA.	AT.	...	G..	G..	...	C..	C..	G..	...	C..	G..	...	C..	G..
#146	...	TA.	AT.	...	G..	G..	...	C..	C..	G..	...	C..	G..	...	C..	G..
#149	...	TA.	AT.	...	G..	G..	...	C..	C..	G..	...	C..	G..	...	C..	G..
#163	...	T?	A.	...	?	...	C..	T..	?
#33	...	T..	.C.	...	T..	C..	T..	C..	G..	C..
#34	...	T..	.C.	...	T..	C..	T..	C..	G..	C..
#162	...	T..	.?	...	T..	C..	T..	C..	G..	C..
#140	...	TA.	AT.	...	G..	G..	...	C..	C..	G..	...	C..	G..	...	C..	G..
#118	...	TA.	AT.	...	G..	G..	...	C..	C..	G..	...	C..	G..	...	C..	?
#43	...	T..	T..	C..	G..	T..	C..	...	C..	...	C..	...	C?	C..	...	C..
#49	?	T..	.?	...	T..	T..	...	C..	G..	??	C?	?	...	C..	...	C..	...	C..	C..	...	C..
#blackburni	G..	.C.	AA.	T..	...	G..	T..	T..A	C..	...	T..	...	C..
#corpulenta	...	TA.	A.	T..	...	G..	C..	A.	C..	...	C..	...	C..	C..	C..	C..
#cuprascens	...	TA.	A.	T..	...	G..	C..	A.	C..	...	C..	...	C..	C..	C..	C..
#helmsi	T..	TC.	AA.	T..	G..	...	T..	T.A	...	T..	...	C..
#ion	...	GC.	T..	...	AA.	TC.	...	T..	...	C..A	C..	...	T..	...	C..
#mendacia	...	T..	...	C..	...	T..	...	C..	T..	C..
#oleadoraC.	AA.	TC.	...	T..	C..A	T..	...	C..
#pulchraC.	T..	C..	T..	C..
#whelani	G..	G..	T..
#out(odon.conf)	.T.	AC.	T..	...	AT.AT	T..	T..	...	T..	G..	T.A	C..	...	A..	...	C..	A..	...

```

[      111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 122 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 ]
[      555 666 666 666 677 777 777 778 888 888 888 999 999 999 900 000 000 001 111 111 111 222 222 222 233 333 ]
[      789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 ]
#168   CGC AGA CTC AGT TTA CGG ATC CAC ATT TTT TAT AGC AAC CGG ATT TCA TGG ACT TCA CGT AAT TAT TGG AAC AAC ATT
#169   ... ..
#171   ... .. G..
#176   ... .. T..
#199   ... .. G..
#202   ... .. G..
#203   ... .. G..
#206   ... .. G..
#207   ... .. G..
#208   ... .. G..
#210   ... .. G..
#215   ... .. G..
#222   ... .. G..
#225   T.. .. T..
#231   T.. .. T..
#36    T.. .. T.. T.. A.. T.. .. T.. .. C.. .G.. .. T.. .. C.. .. T.. .. T.. ..
#32    T.. .. T.. T.. A.. T.. .. T.. .. C.. .G.. .. T.. .. C.. .. T.. .. T.. ..
#35    T.. .. T.. T.. A.. T.. .. T.. .. C.. .G.. .. T.. .. C.. .. T.. .. T.. ..
#38    T.. ?.. T.. T.. A.. T.. .. T.. .. C.. .G.. .. T.. .. C.. .. T.. .. T.. ..
#39    T.. ?.. T.. T.. A.. T.. .. T.. .. C.. .?. .. T.. .. C.. .. T.. .. T.. ..
#76    T.. .. T.. .. T.. ..
#78    T.. .. T.. ..
#82    T.. .. T.. ..
#139   T.. T.. .. C.. .. T.. .. T.. .. C.. .. T.. .. C.. T.. .. T.. .. C.. G.. T.. ..
#141   T.. T.. .. C.. .. T.. .. T.. .. C.. .. T.. .. C.. T.. .. T.. .. C.. G.. T.. ..
#142   T.. T.. .. C.. .. T.. .. T.. .. C.. .. T.. .. C.. T.. .. T.. .. C.. G.. T.. ..
#143   T.. T.. .. C.. .. T.. .. T.. .. C.. .. T.. .. C.. T.. .. T.. .. C.. G.. T.. ..
#146   T.. T.. .. C.. .. T.. .. T.. .. C.. .. T.. .. C.. T.. .. T.. .. C.. G.. T.. ..
#149   T.. T.. .. C.. .. T.. .. T.. .. C.. .. T.. .. C.. T.. .. T.. .. C.. G.. T.. ..
#163   T.. T.. .. T.. .. T.. ?.. T.. .. ?.. .. ?.. .. T.. .. T.. .. ?.. ..
#33    T.. .. T.. T.. A.. T.. .. T.. .. C.. .. T.. .. C.. .. T.. .. T.. ..
#34    T.. .. T.. T.. A.. T.. .. T.. .. C.. .G.. .. T.. .. C.. .. T.. .. T.. ..
#162   T.. ?.. T.. T.. A.. T.. .. T.. .. C.. .G.. .. T.. .. C.. .. T.. .. T.. ..
#140   T.. T.. .. C.. .. T.. .. T.. .. C.. .. T.. .. C.. T.. .. T.. .. C.. G.. T.. ..
#118   ?.. ?.. .. C.. .. T.. .. T.. .. C.. .. T.. .. C.. T.. .. T.. ?.. .. G.. G.. T.. ..
#43    T.. T.. T.. T.. .. T.. .. ?.. .. .A.. .. T.. .. T.. ..
#49    T.. T.. T.. T.. .. T.. .. C.. .. .M.. .. ?.. .. T.. ..
#blackburni T.. .. G.. A.. T.. .. T.. .. A.. .. C.. C.. ..
#corpulenta T.. C.. .. T.. .. T.. .. T.. .. G.. T.. .. T.. ..
#cuprascens T.. C.. .. T.. .. T.. .. T.. .. T.. .. G.. G.. T.. .. T.. ..
#helmsi    T.. .. T.. A.. T.. .. T.. T.. .. .G.. .. T.. .. C.. .. T.. .. C.. ..
#ion       T.. .. C.. C.. T.. G.. T.. T.. C.. .G.. .. A.. .. C.. C.. .. T.. ..
#mendacia  T.. .. T.. T.. .. T.. .. C.. .G.. .. T.. .. T.. .. T.. ..
#oleadora  T.. .. A.. T.. .. T.. .. C.. G.. .. A.. .. C.. .. T.. ..
#pulchra   ... .. T.. .. T.. .. C.. .. T.. .. C.. C.. .. T.. ..
#whelani   T.. .. T.. .. T.. ..
#out(odon.conf) T.. T.. T.. C.. A.. T.. .. A.. .. C.. .. A.. .. C.. C.. CT. A.. T.. .. T.. C..

```

[222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	222	223	333	333	333	333]
[333	334	444	444	444	555	555	555	566	666	666	667	777	777	777	888	888	888	899	999	999	990	000	000	000	111]
[567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012]
#168	CCT	ACT	AGT	ATG	TCT	TAT	GCG	ACA	CTG	ACT	TAA	TCA	CTT	TTC	ACC	AAT	TCA	TCA	TTT	TGG	CTT	TGA	AGC	AGC	AGC	CTG	
#169	T..	
#171	C..	
#176	
#199	T..	
#202	T..	
#203	T..	
#206	T..	
#207	T..	
#208	C..	?	...	
#210	T..	
#215	C..	
#222	T..	
#225	G..	T..	?	
#231	...	T..	T..	
#36	TT.	.T.	C..	CC.	...	T..	.T.	.T.	...	C..	...	C..	C..	...	T..	
#32	TT.	.T.	C..	CC.	...	T..	.T.	.T.	...	C..	...	C..	C..	...	T..	
#35	TT.	.T.	C..	CC.	...	T..	.T.	.T.	...	C..	...	C..	C..	...	T..	
#38	TT.	.T.	C..	CC.	...	T..	.T.	.T.	...	C..	...	C..	C..	...	T..	
#39	??.	.T.	C..	CC.	...	T..	.T.	.T.	...	C..	...	C..	C..	...	T..	
#76	...	T..	T..	
#78	...	T..	T..	
#82	...	T..	T..	
#139	...	G..	CC.	A..	C..	.T.	.T.	...	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	T..	A..	...	
#141	...	G..	CC.	A..	C..	.T.	.T.	...	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	T..	A..	...	
#142	...	G..	CC.	A..	C..	.T.	.T.	...	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	T..	A..	...	
#143	...	G..	CC.	A..	C..	.T.	.T.	...	C..	?	C..	C..	C..	C..	C..	C..	T..	A..	...	
#146	...	G..	CC.	A..	C..	.T.	.T.	...	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	T..	A..	...	
#149	...	G..	CC.	A..	C..	.T.	.T.	...	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	T..	A..	...	
#163T?	?	...	C..	CC.	..?	??.	.T.	.T.	C..	...	?	...	?	...	?	...	?	...	C..	...	T..	...	?	...	
#33T.	C..	CC.	...	T..	.T.	.T.	...	C..	...	C..	C..	...	T..	
#34	TT.	.T.	C..	CC.	...	T..	.T.	.T.	...	C..	...	C..	C..	...	T..	
#162	TT.	.T.	C..	CC.	...	T..	.T.	.T.	...	C..	...	C..	C..	...	T..	
#140	...	G..	CC.	A..	C..	.T.	.T.	...	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	T..	A..	...	
#118G	G..	...	CC.	A.S	C..	.T.	.T.	...	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	C..	T..C.	...	A..	...	
#43T.	C..	CC.	A..	T..	.T.	.T.	...	C..	T..	
#49T.	?	...	C..	CC.	A..	T..	.T.	.T.	...	C..	...	?	C..	...	T..	
#blackburni	.T.	.A.	...	T..T.	A..T.	...	T..	...	C..	A..	C..	T..	...	
#corpulentaT.	C..	CC.	A..	T..	.T.	.T.	C..	C..	C..	A..	...	
#cuprascensT.	C..	CC.	A..	T..	.T.	.T.	C..	C..	C..	
#helmsi	...	GA.	C..	.T.	A..	...	T..	.T.	...	C..	...	C..	C..	C..	A..	...	T..	T..	
#ionA.	C..	CTC	A..	G..T.	C..	C..	G..	G..	...	A..	
#mendaciaT.	C..	CC.	...	C..	.T.	.T.	T..	C..	C..	
#oleadora	.T.	.A.	C..	.T.	A..T.	T..	...	C..	C..	...	A..	...	C..	T..	
#pulchraT.	...	C..	CC.	A..	T..T.	C..	C..	T..	
#whelani	...	T..	T..	
#out(odon.conf)	...	T..	A..	T..	...	T..	.A.	A..	...	T..T.	...	C..	T..	C..	A..

```

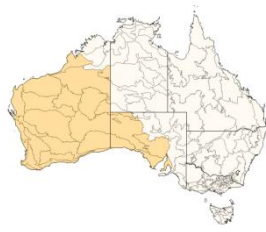
[      333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 33]
[      111 111 122 222 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555 556 666 66]
[      345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 45]
#168   ATA CTG ACA TTT TGT TGA TGT AGT ATG ATT ATT CCT CTA TAT TTC AAT CTA CT
#169   ... T.. ... ..
#171   ... T.. ... ..
#176   ... T.. ... ..
#199   ... T.. ... ..
#202   ... T.. ... ..
#203   ... T.. ... ..
#206   ... T.. ... ..
#207   ... T.. ... ..
#208   ... T.. ... ..
#210   ... T.. ... ..
#215   ... T.. ... ..
#222   ... T.. ... ..
#225   ... T.. ... ..
#231   ... T.. ... ..
#36    ... .. C.. C.. ... .. G.. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#32    ... .. C.. C.. ... .. G.. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#35    ... .. C.. C.. ... .. G.. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#38    ... .. C.. C.. ... .. G.. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#39    ... .. C.. C.. ... .. G.. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#76    ... T.. ... ..
#78    ... T.. ... ..
#82    ... T.. ... ..
#139   ... T.. ... C.. C.. C.. ... .. T.. ... .. T.. ... C.. ... G.. T.. ..
#141   ... T.. ... C.. C.. C.. ... .. T.. ... .. T.. ... C.. ... G.. T.. ..
#142   ... T.. ... C.. C.. C.. ... .. T.. ... .. T.. ... C.. ... G.. T.. ..
#143   ... T.. ... C.. C.. C.. ... .. T.. ... .. T.. ... C.. ... G.. T.. ..
#146   ... T.. ... C.. C.. C.. ... .. T.. ... .. T.. ... C.. ... G.. T.. ..
#149   ... T.. ... C.. C.. C.. ... .. T.. ... .. T.. ... C.. ... G.. T.. ..
#163   ... .. C.. C.. ... ?.. ?.. ... .. T.. ... C.. ... T?. ..
#33    ... .. C.. C.. ... .. G.. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#34    R.. ... .. C.. C.. ..W .S. G.. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#162   ... .. C.. C.. ... .. G.. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#140   ... T.. ... C.. C.. C.. ... .. T.. ... .. T.. ... C.. ... G.. T.. ..
#118   ... T.. ... C.. C.. CA. ... .. TG. ..A .. T.. ..C C?. ... G.. T.. ..
#43    ... .. C.. C.. ... .. ?.. ... T.. ... C.. ... T.. ..
#49    ... .. C.. C.. ... .. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#blackburni ... .. C.. C.. ... .. ... .. A.. ... C.. ... T.. T.
#corpulenta ... .. C.. A.. ... .. T.. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#cuprascens ... .. C.. A.. ... .. C.. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#helmsi    ... .. C.. ... C.. ... .. G.. ... .. A.. C.. ... T.. ..
#ion       G.. ... .. C.. ... C.. ... .. ... .. C.. C.. ... ..
#mendacia  ... .. C.. C.. ... .. ... .. T.. G.. C.. ... T.. ..
#oleadora  ... .. C.. C.. ... .. ... .. ... .. C.. ... T.. T.
#pulchra  .C. ... .. C.. A.. ... .. ... .. T.. ... C.. ... T.. ..
#whelani   ... T.. ... ..
#out(odon.conf) ... T.. ... .. .C. T.. ... T.. ... C.. C.. T.. ..

```

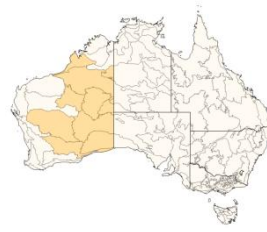

ANEXO II: Mapas de distribución de las 19 especies del género *Pseudotetracha* (fuente: Australian Faunal Directory), basándose en datos bibliográficos de lugares de recolección.



P. australis



P. blackburni



P. canninga



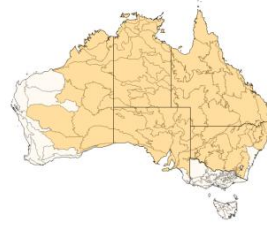
P. castelnaui



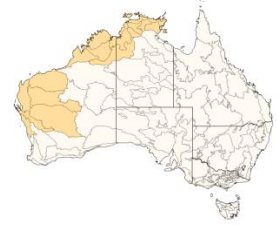
P. corpulenta



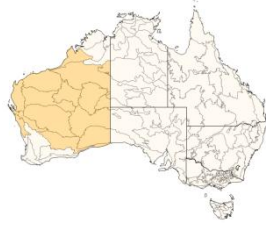
P. cuprascens



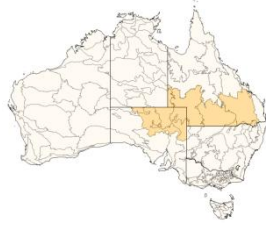
P. cylindrica



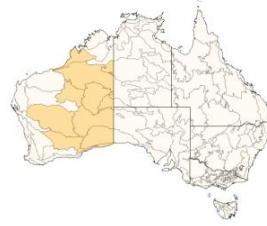
P. greyanus



P. helmsi



P. howittii



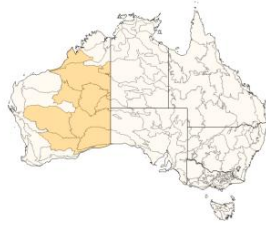
P. ion



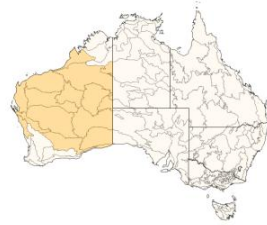
P. kimberleyensis



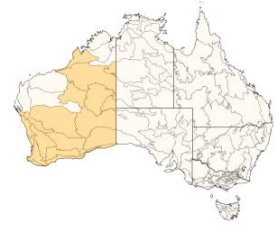
P. marginicollis



P. mendacia



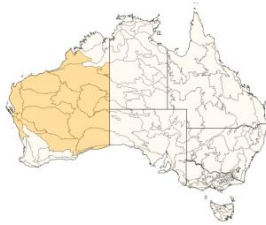
P. murchisona



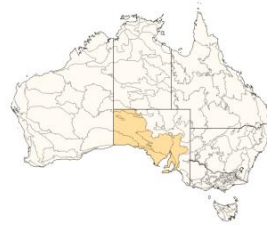
P. oleadorsa



P. pulchra



P. spenceri



P. whelani

