“Análisis filogeográfico de *Protalebrella brasiliensis* (Auchenorrhyncha: Cicadellidae: Typhlocybinae) en Argentina.”

Trabajo Final de Grado de la Alumna

Carla Verónica Carreres

El trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención del título de:

LICENCIADA EN GENETICA

Carrera:

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias. Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 26 de Febrero del 2018.

“Análisis filogeográfico de *Protalebrella brasiliensis* (Auchenorrhyncha: Cicadellidae: Typhlocybinae) en Argentina.”

Trabajo Final de Grado de la Alumna

Carla Verónica Carreres

Directora:

Dra. María Inés Catalano

Co-Directora:

Dra. Gabriela Paula Fernández

Carrera

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias. Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 26 de Febrero del 2018.

“Análisis filogeográfico de *Protalebrella brasiliensis* (Auchenorrhyncha: Cicadellidae: Typhlocybinae) en Argentina.”

Trabajo Final de Grado de la Alumna

Carla Verónica Carreres

Aprobado por el tribunal evaluador

.....	.....	.....
Evaluador	**Evaluador**	**Evaluador**
.....		.....
Dra. María Inés Catalano		Dra. Gabriela Paula Fernández
Directora		**Co-Directora**

.....

Carla Verónica Carreres

Alumna

Escuela de Ciencias. Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 26 de Febrero del 2018.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN……6

2. INTRODUCCIÓN……9

2.1. La familia Cicadellidae……10

2.2. Caracterización morfológica de la especie *Protalebrella brasiliensis*……12

2.3. Caracterización mediante marcadores moleculares……14

2.4. Filogeografía……17

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS……29

3.1. Hipótesis……20

3.2. Objetivo general……20

3.3. Objetivos específicos……20

4. MATERIALES Y MÉTODOS……21

4.1. Obtención de las muestras……22

4.2. Identificación de la especie……25

4.3. Observación de caracteres morfológicos……25

4.4. Extracción de ADN……26

4.5. Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)……26

4.6. Análisis de datos……28

4.6.1. Análisis filogenético……29

4.6.2. Obtención de redes de haplotipos……30

5. RESULTADOS……31

5.1. Caracteres morfológicos……32

5.1.1. Manchas centrales ala anterior……32

5.1.2. Sutura de la corona……34

5.1.3. Proceso del *pygofer*……34

5.2. Análisis descriptivo de las secuencias……36

5.3. Análisis filogenético……....37

5.4. Red de haplotipos……41

6. DISCUSIÓN……44

7. CONCLUSIONES……48

8. BIBLIOGRAFÍA……50

9. ANEXO……58

9.1. Protocolos…….....59

9.1.1. Extracción de ADN…….....59

9.1.2. Amplificación de DN…….....61

1. RESUMEN

El orden Hemíptera reúne a un grupo de insectos que presentan un distintivo aparato bucal sucto-picador, que les ha conferido un relevante efecto en su extensa radiación adaptativa.

La familia Cicadellidae, abarca insectos exclusivamente fitófagos, de gran importancia fitosanitaria debido al rol que cumplen en la transmisión, dispersión y reservorio de patógenos como virus, espiroplasmas, bacterias y fitoplasma. Esta familia comprende aproximadamente 22.000 especies descriptas en el mundo, reunidas en 38 subfamilias, particularmente Typhlocybinae es una de las subfamilias más abundantes, con aproximadamente 5.000 especies descriptas. El género *Protalebrella* perteneciente a esta subfamilia, se encuentra representado por cinco especies en nuestro país.

En este trabajo se propuso realizar un análisis filogeográfico de la especie *Protalebrella brasiliensis* en Argentina, caracterizando la variabilidad observada tanto a nivel morfológico, como a nivel molecular a través de un fragmento del gen citocromo oxidasa I (COI), en base a la hipótesis de que existe variación entre los individuos hallados en diferentes áreas geográficas del país.

Para ello se identificaron especímenes provenientes de ocho localidades representativas de tres provincias biogeográficas: pampeana (n=2), del espinal (n=5) y chaqueña (n=7), se buscaron diferencias en caracteres morfológicos y luego se realizó la amplificación de un fragmento de ADN mitocondrial (ADNmt), COI, de 648 pares de bases (pb) de cada uno de los especímenes.

En cuanto a las diferencias morfológicas se identificaron 4 morfotipos para el caracter manchas centrales del ala anterior (M1, M2, M3 y M4). M1 se encontró en las tres provincias biogeográficas bajo estudio, M2 solo en la provincia chaqueña, M3 en las provincias chaqueña y del

espinal y M4 solo en la del espinal. Por otro lado, para el caracter proceso del *pygofer* se identificaron dos morfotipos (Mp1 y Mp2); Mp1 se encontró en las tres provincias biogeográficas, mientras que Mp2 se encontró solo en la provincia chaqueña.

Para el conjunto de secuencias obtenidas se observaron 5 sitios variables (polimórficos) y 5 haplotipos. En la provincia pampeana solo se encontraron secuencias agrupadas en el haplotipo 1 (Hap1), en cambio, tanto la provincia chaqueña como la del espinal presentaron secuencias agrupadas en más de un haplotipo.

No pudo realizarse un análisis filogeográfico exhaustivo debido al pequeño número de muestras (n=14).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. La familia Cicadellidae

La Familia Cicadellidae, una de las 10 familias más diversas de insectos (Hamilton, 1984), comprende aproximadamente 25.000 especies descriptas en el mundo (Freytag & Sharkey, 2002).

La distribución geográfica actual y los escasos fósiles disponibles sugieren un escenario hipotético del tiempo de diversificación de los cicadélidos entre el Cretáceo inferior y mediados del Terciario (Dietrich, 1999). Los cicadélidos más antiguos del Cretáceo inferior de Australia, América del Norte y América del Sur son difíciles de ubicar filogenéticamente debido a que la mayoría carece de sinapomorfias evidentes que los unan con subfamilias modernas (Hamilton, 1990,1992; Oman, 1937; Shcherbakov, 1992). Por otro lado, los cicadélidos del Oligoceno al Mioceno a menudo son indistinguibles de los géneros modernos (Dietrich & Vega, 1995; Scudder, 1890). Los cicadélidos fósiles del Cretáceo superior, Paleoceno y Eoceno son escasos. Sin embargo, algunas subfamilias modernas como por ejemplo Typhlocybinae tienen una distribución Pantropical, sugiriendo que se originaron antes de la ruptura de la Pangea durante el Cretáceo. Otras subfamilias están en gran parte o totalmente ausentes en uno o más continentes, lo que sugiere un origen más reciente (Dietrich, 1999).

En particular la subfamilia Typhlocybinae está conformada exclusivamente por insectos fitófagos e incluye importantes plagas de la agricultura, pudiendo causar daños directos o indirectos. Los daños directos se relacionan con la acción mecánica del aparato bucal al alimentarse y por la toxicidad de la saliva, que puede producir alteraciones fisiológicas y necrosis en las plantas atacadas (Backus *et al*., 2005). Los daños indirectos se relacionan con la transmisión de patógenos,

tales como bacterias, espiroplasmas, fitoplasmas y virus, durante su alimentación (Weintraub & Beanland, 2006). En Argentina, los tiflocibinos están representados por 14 géneros y 66 especies agrupadas en cinco tribus: Alebrini, Dikraneurini, Erythroneurini, Typhlocybini y Empoascini (Catalano, 2011). Sin embargo, esta subfamilia cuenta con escasos registros y un reducido número de contribuciones taxonómicas. Posiblemente esta falencia se deba al pequeño tamaño y a la homogeneidad de los rasgos externos de estos insectos, y también a los insuficientes estudios de conjunto existentes a nivel mundial que incluyan claves y descripciones detalladas de tribus, géneros y especies.

En particular la tribu Alebrini, de distribución Afrotropical, Indomalaya, Neártica, Neotropical y Paleártica (Balme, 2007), se encuentra representada por 34 géneros de los cuales seis se han citado para Argentina (Dworakowska, 1994; Young, 1957)

Uno de los géneros pertenecientes a esta subfamilia es *Protalebrella* (Young, 1952) para el que se mencionan cinco especies presentes en Argentina: *Protalebrella brasiliensis* (Baker, 1899), *Protalebrella prima* (Dworakowska, 1994), *Protalebrella schachovskoyi* (Torres, 1955b), *Protalebrella secunda (*Dworakowska, 1994) y *Protalebrella tertia (*Dworakowska, 1994). La especie más abundante y con distribución más amplia es *Protalebrella brasiliensis*.

2.2. Caracterización morfológica de la especie *Protalebrella brasiliensis*

Los machos presentan un tamaño entre 2,7-3,0 mm y las hembras entre 2,9-3,0 mm (Fig. 1-A).

Son de coloración amarillenta con distintivas manchas castaño oscuro (Fig. 1-A). La corona es amarillenta con una pequeña marca mediana castaña oscura cerca del margen posterior (Fig. 1-B); pronoto castaño oscuro con tres puntos amarillentos en el margen anterior y cuatro bandas longitudinales hacia el margen posterior, escutelo similar al pronoto; ala anterior con una mancha castaña en el margen anal terminando en una areola translúcida; una banda oscura desde el margen costal hasta la sutura claval sobre la vena comisural; mitad apical esfumada con areolas translúcidas (Fig. 1-C).

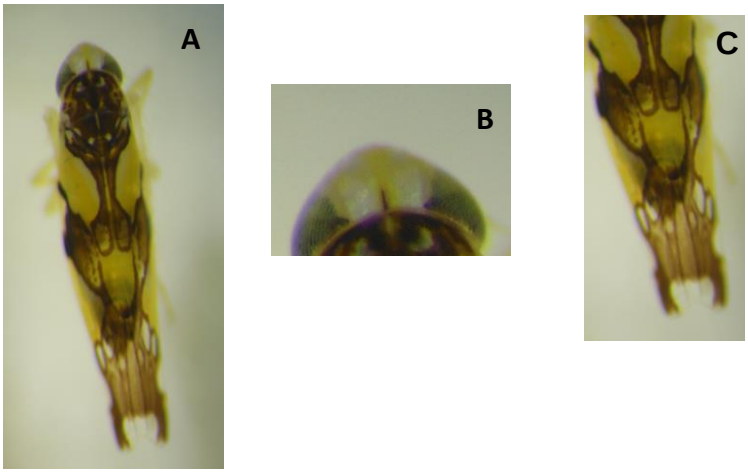

Figura 1. Espécimen recolectado de *Protalebrella brasiliensis:* A. habitus, vista dorsal, macho; B. Corona, donde se observa la sutura; C. Manchas características presentes en alas.

Genitalia del macho: *Pygofer* (Fig. 2), en vista lateral, alargado con un grupo de seis macrosetas en el centro del disco y un proceso dorso-caudal dirigido ventralmente que sobrepasa ampliamente el borde ventral del *pygofer*. Placa subgenital triangular con una hilera longitudinal simple de macrosetas y finas setas en el margen dorsal y el ápice. Estilo corto con lóbulo preapical presente y extensión apical levemente curvada postero-ventralmente. Conectivo en forma de barra transversa. *Aedeagus* con preatrio corto, tallo adelgazado en la mitad apical con pequeñas denticiones en el margen dorsal, gonoporo apical.

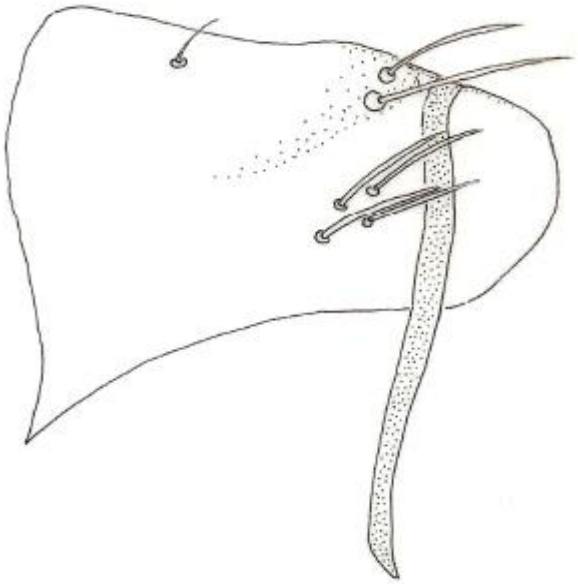

Figura 2. Proceso del *pygofer* en vista lateral. (Tomado de Catalano, 2011)

Las plantas huéspedes son malezas (Young, 1957) y maíz.

Distribución geográfica: EE. UU, Cuba, Haití, República Dominicana, Puerto Rico, Panamá, Islas Vírgenes, Jamaica, Venezuela, Ecuador, Brasil, Paraguay, Bolivia (Young, 1957); Costa Rica, Cuba, Honduras, México, Nicaragua, Perú (Freytag & Sharkey, 2002). En Argentina: Tucumán, Chaco, Santa Fe (Young, 1957); Misiones, Entre Ríos, Córdoba, Mendoza (Catalano, 2011). En el presente trabajo se reporta por primera vez la presencia de dicha especie en la provincia de Buenos Aires.

2.3. Caracterización mediante marcadores moleculares

Los marcadores moleculares nos permiten describir patrones genéticos en las poblaciones naturales a escalas que van desde individuos a especies. A partir de estos patrones, y aplicando la teoría evolutiva y de genética de poblaciones, podemos hacer inferencias sobre los procesos demográficos y evolutivos que han actuado sobre las especies a diferentes escalas temporales (Godoy, 2009).

Entre las ventajas más importantes que presentan los caracteres moleculares podemos citar: son caracteres transmitidos genéticamente, permiten realizar comparaciones a cualquier nivel de diferenciación genética, su valor en los estudios comparativos es el mismo indistintamente del estadio de desarrollo de que se trate y constituye una fuente de datos alternativa cuando la ausencia de caracteres morfológicos o las homoplasias conducen a resultados controversiales (Graur & Li, 2000).

La caracterización genética de las poblaciones naturales se realizó en primera instancia, a través del estudio de polimorfismos genéticos de isoenzimas, que permiten detectar una caída en la

heterocigosis poblacional (Allendorf & Leary, 1986). Posteriormente empezaron a utilizarse marcadores moleculares del ADN, tales como RFLP (análisis de polimorfismos para la longitud de fragmentos de restricción) y RAPD (análisis al azar de polimorfismos del ADN), huellas digitales del ADN y secuenciación del ADN mitocondrial (Soltis *et al*., 1998). Los resultados obtenidos a partir de estas técnicas contribuyen a definir los límites de las poblaciones, estudiar su estructura, revelar patrones de migración, estimar el flujo génico interpoblacional y detectar la posible declinación de las mismas, debido a diferentes cambios en los factores ambientales (Avise & Hamrick, 1996).

El ADN mitocondrial es una molécula circular, cerrada y de doble cadena, compuesta por 16.569 pares de bases (pb) con distinta composición nucleotídica en las dos cadenas (Fig.3). La cadena pesada está constituida mayormente por purinas, mientras que la liviana por pirimidinas (Núñez, 2011).

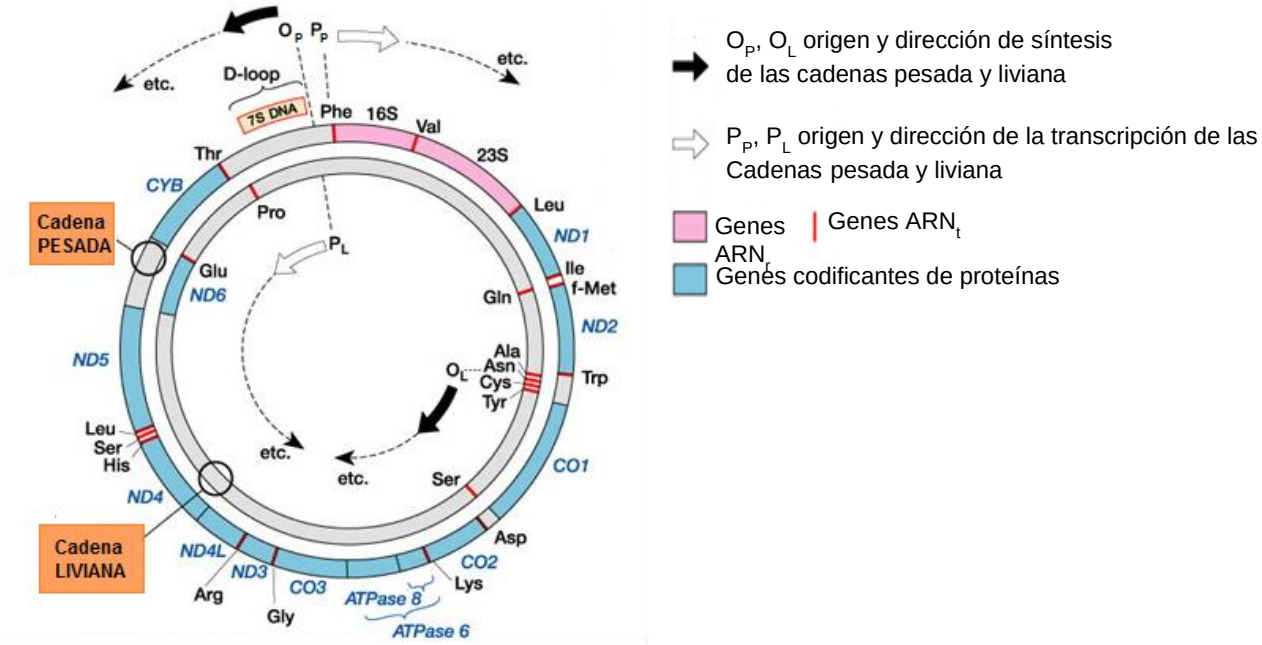

Figura 3. Estructura del ADN mitocondrial (ADNmt). Visualización de las cadenas pesada y liviana, como así también las regiones codificantes y no codificantes.

Presenta dos regiones de ADN, una no codificante (región control o *D-loop*), que tiene como finalidad la regulación de la expresión del ADN mitocondrial, y una región codificante, que representa el 90% del genoma mitocondrial, formada por 37 genes, de los cuales 13 codifican para polipéptidos involucrados en la cadena de fosforilación oxidativa, siendo uno de ellos el complejo enzimático de la citocromo oxidasa I, II y III (COI, II y III) (Complejo IV), mientras que el resto codifican para 22 moléculas de ARN de transferencia y 2 ARN ribosómicos (12S y 16S) (Núñez, 2011).

Dentro de las características más importantes que han llevado a la consolidación del ADNmt como un marcador adecuado para estudios de sistemática molecular (Caterino *et al*., 2000; Moritz & Hillis, 1996), se destaca la organización simple y uniforme que facilita la comparación entre diversos grupos taxonómicos, la alta tasa de sustitución por carecer de reparasas, la facilidad con la que se puede aislar y manipular (Harrison, 1994; Simon *et al*., 1994) y la herencia matrilineal (Giles *et al*., 1980). Además de estas particularidades existen cuatro razones fundamentales que hacen al genoma mitocondrial apropiado para la identificación de especies (Stoeckle *et al*., 2005):

- Número de copias: Generalmente por cada célula existen dos copias del ADN nuclear, sin embargo, hay de 100 a 10.000 genomas mitocondriales. Es más exitoso recuperar el ADNmt de muestras pequeñas o degradadas.

- Gran diferenciación entre especies: Generalmente la diferenciación entre especies animales relativamente cercanas es como promedio de 5 a 10 veces mayor en genes mitocondriales que en nucleares.

- Poca diferenciación intraespecífica: Esto puede ser un reflejo de la pérdida rápida de polimorfismo ancestral debido a la herencia materna o a un barrido selectivo.

- Ausencia de intrones: En animales los genes mitocondriales, en muy pocas ocasiones, tienen intrones, por lo que la amplificación de estos genes es usualmente más simple que los genes nucleares.

2.4. Filogeografía

Avise y colaboradores introdujeron el término "filogeografía" formalmente en 1987, momento en el que resumían una observación evidente y directa de sus estudios de más de una década: las ramas de algunos árboles de genes intraespecíficos mostraban un patrón geográfico, por lo que estas relaciones entre genealogías de genes y geografía podían referirse simplemente como patrones filogeográficos (Avise *et al*., 1987).

La filogeografía se define, en sentido estricto, como el análisis espacial de los linajes génicos (Avise *et al*., 1987). Este análisis se aplica a niveles intraespecífico o de especies cercanamente emparentadas y surgió en virtud del progreso que han tenido dos aspectos de la biología evolutiva moderna: uno tecnológico, gracias al cual se comenzó a disponer de datos de variabilidad intraespecífica en la forma de secuencias de ADN, y otro conceptual o teórico, que implicó la aplicación de la teoría de la coalescencia al estudio de procesos microevolutivos (Lanteri & Confalonieri, 2002).

Un requisito fundamental para poder establecer genealogías génicas es el uso de marcadores genéticos o secuencias de ADN que no recombinen. Si se trabaja con muestras de genes nucleares provenientes de individuos entre los cuales existe o existió alguna vez flujo génico, es altamente

probable que haya habido recombinación genética durante el apareamiento de cromosomas homólogos en la meiosis. Este proceso puede llegar a desvirtuar profundamente las verdaderas genealogías de las secuencias, motivo por el cual la mayoría de los trabajos de filogeografía utilizan marcadores de herencia citoplasmática no mendeliana, ADNmt y de los cloroplastos (ADNcp), o marcadores nucleares en donde se haya constatado que existe poca o ninguna recombinación genética (Lanteri & Confalonieri, 2002).

Diferentes regiones y genes presentan tasas de evolución variada dentro de un linaje. Por ejemplo, la Región Control (RC) ha sido particularmente útil para análisis filogeográficos en escalas muy pequeñas de tiempo evolutivo, ya que tienen una tasa excepcionalmente alta de sustitución de nucleótidos y altos niveles de polimorfismo intraespecífico. La región que codifica para citocromo b, en cambio, comúnmente se utiliza para determinar relaciones interespecíficas, debido a que es menos variable que la RC (Lunt *et al*., 1998). COI se utiliza con éxito tanto en la identificación de especies como en estudios filogeográficos y filogenéticos de especies emparentadas, por lo que este marcador es adecuado para examinar tanto la variación genética intraespecífica como la interespecífica (Castalanelli *et al*., 2012).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Existe variación a nivel morfológico y molecular en individuos de la especie *Protalebrella brasiliensis* hallados en diferentes áreas geográficas de Argentina.

3.2. Objetivo General

Caracterizar morfológica y molecularmente poblaciones de *Protalebrella brasiliensis* de diferentes áreas geográficas de Argentina.

3.3. Objetivos específicos

- Identificar caracteres morfológicos variables entre poblaciones de *Protalebrella brasiliensis*.

- Caracterizar genéticamente una muestra de individuos de *P. brasiliensis* para un fragmento del gen de la citocromo oxidasa I (COI).

- Realizar un análisis filogeográfico a partir de las secuencias de COI obtenidas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de las muestras

Los especímenes de *Protalebrella brasiliensis* utilizados en este trabajo fueron obtenidos por donación y por colecta propia. El pool de insectos obtenidos por donación (n=48) fue colectado por Dietrich y colaboradores durante la campaña realizada en 2008. Los especímenes se encontraban en etanol absoluto a -20°C y en diferentes tubos que contenían los siguientes datos: coordenadas geográficas de la localidad, fecha, métodos de colecta, vegetación asociada y apellido del colector. Por otro lado, se realizaron muestreos en zonas cultivadas del partido de Pergamino, Provincia de Buenos Aires. Los insectos se capturaron mediante red entomológica de arrastre. La unidad de muestreo consistió en 50 golpes sucesivos de red, extrayendo un promedio de cinco muestras por zona. Una vez obtenidos los ejemplares se introdujo la muestra en frascos, conteniendo en su interior un algodón embebido en acetona y un rótulo identificando: número de muestra, fecha de muestreo, ubicación geográfica y tipo de cultivo o maleza circundante. Los especímenes fueron trasladados al laboratorio, donde se seleccionaron los ejemplares de interés, y se conservaron en seco a -20º C para su posterior estudio.

Del total de especímenes (n=52), sólo 14 fueron utilizados tanto para la observación de los caracteres morfológicos como para el posterior análisis molecular, los 38 especímenes restantes fueron descartados por tres motivos: 1) no se pudo realizar extracción del material genético; 2) no se consiguió amplificar el fragmento de interés o 3) la secuencia obtenida mediante secuenciación no fue "limpia". Los 14 especímenes bajo estudio proporcionan una cobertura geográfica que corresponde a las localidades de Pergamino (Buenos Aires), Capitán Solari (Chaco), Margarita Belén (Chaco), Corrientes Capital (Corrientes), Mburucuyá (Corrientes), General Güemes (Salta), La Banda

(Santiago del Estero) y Termas de Rio Hondo (Santiago del Estero). Las localidades antes mencionadas se distribuyen en las provincias biogeográficas pampeana, chaqueña y del espinal (Fig.4; Tabla 1).

Figura 4. Mapa de distribución de los especímenes utilizados para realizar el análisis. **Provincia pampeana**: Pergamino (Buenos Aires); **Provincia chaqueña**: Capitán Solari (Chaco); Margarita Belén (Chaco); Corrientes Capital (Corrientes); General Güemes (Salta); La Banda (Santiago del Estero); Termas de Rio Hondo (Santiago del Estero); **Provincia del espinal**: Mburucuyá (Corrientes) (Modificada de Cabrera, 1976).

Tabla 1. Lista de especímenes utilizados en el análisis (n=14). Se indica: localidad de colecta y provincia, coordenadas GPS, sexo, nombre utilizado en el análisis, provincia biogeográfica y número de especímenes.

Localidad – Provincia	Coordenadas	Sexo	Nombre utilizado	Provincia biogeográfica
Pergamino- Buenos Aires	33° 56' 07,15" S/ 60° 33' 32,74" O	**H**	**BA71**	Pampeana (n=2)
		M	**BA73**	
General Güemes- Salta	24°53' 38" S/ 64° 59' 35" O	**M**	**S106**	Chaqueña (n=7)
La Banda- Santiago del Estero	27° 45 '40" S/ 64°13' 31" O	**M**	**SE53**	
Termas de Rio Hondo- Santiago del Estero	27° 34' 32" S/ 64° 44' 1" O	**M**	**SE48**	
Margarita Belén- Chaco	27° 16' 51,55" S / 58° 58' 00,9"O	**M**	**CH56**	
		H	**CH63**	
Capitán Solari- Chaco	26° 48' 50" S / 59° 36' 52" O	**M**	**CH4**	
Corrientes Capital- Corrientes	27°27'28,45"S/58°49'29,4"O	**M**	**C79**	
Mburucuyá- Corrientes	28°2'14" S/58°6'14"O	**H**	**C2**	Espinal (n=5)
	28°1'22" S/58°3'37" O	**M**	**C29**	
		H	**C32**	
	28°0'51" S/58°1'31" O	**H**	**C101**	
		M	**C103**	

4.2. Identificación de la especie

La identificación de los ejemplares se realizó a partir de caracteres morfológicos (suturas y escleritos del cuerpo, venación alar, apodemas abdominales tergales y esternales y genitalia de machos). Se utilizó la nomenclatura morfológica de Young (1952) y Dietrich (2005).

Los caracteres morfológicos de los especímenes se observaron bajo lupa binocular estereoscópica Leica MZFLIII. Para la observación de estructuras abdominales y genitalita de machos se removió el último segmento abdominal con la ayuda de agujas histológicas y se aclaró en una solución de KOH 10% a temperatura ambiente (proceso modificado de Oman 1949). La visualización de la genitalia se realizó con un microscopio Leica ICC50 HD, en 10X y las amplificaciones en 40X.

4.3. Determinación de caracteres morfológicos

En el análisis morfológico sólo se consideraron aquellos caracteres en los que se observó variabilidad durante la diagnosis de la especie. Por lo tanto, de cada individuo identificado se observaron en detalle los caracteres morfológicos: presencia/ausencia sutura de la corona, forma de las manchas centrales en las alas anteriores y proceso del *pygofer*, sólo en individuos machos.

4.4. Extracción de ADN

A partir de los insectos obtenidos y preservados, se consiguió la extracción del ADN total de cinco hembras y nueve machos (n=14), de acuerdo con Nishiguchi y colaboradores (2002) (Anexo protocolo), modificado para una mayor obtención del material genético. La extracción se realizó del espécimen completo excepto en los machos, en los cuales el último segmento abdominal fue removido para la observación de las estructuras genitales mencionadas anteriormente.

La calidad del ADN extraído se analizó mediante corrida electroforética en gel de agarosa 1% (1 gr de agarosa/100ml de *Buffer* Tris borato EDTA (TBE) 1X) conteniendo bromuro de etidio en una cc final de 5mg/ml. Las muestras se sembraron junto con el *buffer* de siembra DNA Dye (*EZ-VisionThree*, Amresco). El gel se corrió a 100 *Volts* durante 40 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se visualizó bajo luz ultravioleta en un transiluminador con cámara acoplada (*InGenius, Syngene*). La digitalización de las imágenes se hizo a través del *software GeneSys* V1.4.6.0 (*Syngene*). La concentración de ADN se verificó en ng/ml utilizando el programa *ImageJ* (Abrámoff *et al*., 2004).

4.5. Amplificación por Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

La amplificación del segmento de interés, aproximadamente 648 pb, del gen COI se logró empleando la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Para ello se utilizaron los *primers* LepF (5´-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3´) y LepR (5´-

TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3´) como *forward* y *reverse* respectivamente (Herbert *et al.,* 2004).

Cada reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 20µl conteniendo las siguientes cantidades de reactivos: 25-100 ng de ADN como molde, Cl2Mg 1,5 mM, *primer forward* 0,2µM, *primer reverse* 0,2µM, dNTPs 0,2mM, *buffer* de reacción 1X, Taq T-Plus DNA polimerasa (INBIO) 0,5U y agua estéril ultrapura hasta completar volumen. En todas las reacciones se incluyeron controles negativos, en los que, el ADN molde fue sustituido por una cantidad equivalente de agua estéril. Las condiciones de ciclado, llevadas a cabo en el termociclador programable *Gene Pro Thermal Cycler* (BioerTechnology CO., LTD), se detallan a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de ciclado utilizadas en la reacción de amplificación.

	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	1 min. 30seg	---
Desnaturalización	94	1 min.	35
Asociación	51	1 min. 30seg	
Extensión	74	1 min.	
Extensión final	74	5min.	---

La correcta amplificación fue corroborada mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en *buffer* TBE (1X), PH 8.0 (Fig.5). La misma se reveló con tinción con bromuro de etidio (5mg/ml) incluido en el gel y posterior exposición a luz UV en un transiluminador con cámara acoplada (*InGenius, Syngene*). La digitalización de las imágenes se hizo a través del *software GeneSys* V1.4.6.0 (Syngene). Las muestras se sembraron con el *buffer* de siembra DNA Dye (EZ-Visio Three,

Amresco). Como parámetro de tamaño de los fragmentos obtenidos, se usó un marcador de peso molecular de 100 pb (PB-L). Luego se realizó su cuantificación mediante el programa *Image J*.

Los productos de PCR fueron secuenciados a través del secuenciador automático ABI 3730XL (*Applied Biosystems*) por la empresa MACROGEN (Corea) mediante secuenciación estándar (*Standard-seq single*).

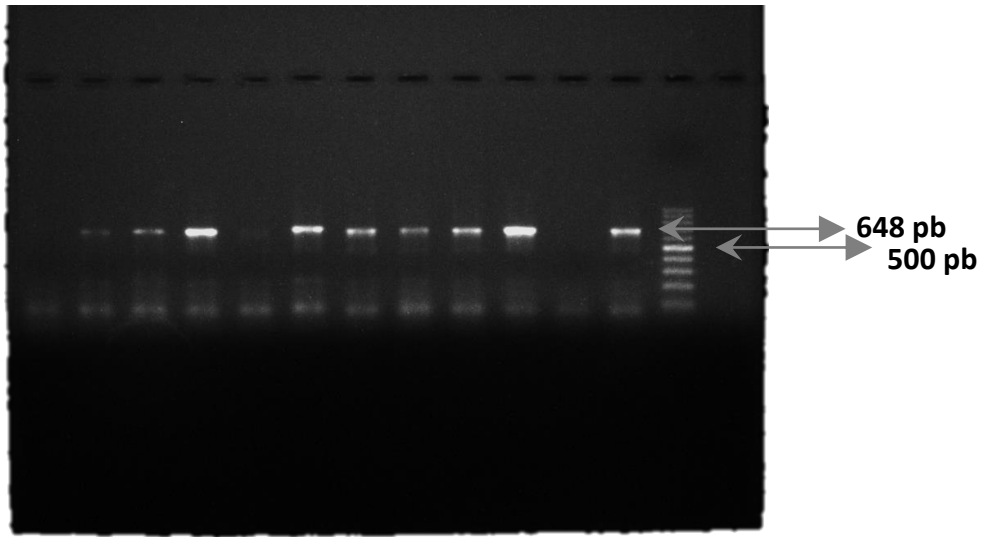

Figura 5. Determinación del tamaño de los fragmentos amplificados por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Calle izquierda: Marcador de PM (100pb). Calles restantes: bandas de 648pb

4.6. Análisis de los datos

Una vez obtenidas las secuencias, los cromatogramas fueron visualizados y editados manualmente empleando el *software* Chromas 2.6.4. (www.technelysium.com.au). El número de sitios variables (polimórficos), *singletons* y haplotipos, así como la diversidad nucleotídica y

haplotípica, se calculó usando el programa informático DnaSP v.5 (*DNA Sequence Polymorphism* versión 5.10.01) (Librado & Rozas, 2009).

Una vez editadas las secuencias fueron alineadas utilizando la herramienta *Muscle* disponible en el programa MEGA 6.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 6.0*) (Tamura *et al*., 2013).

Dado que todos los métodos filogenéticos hacen asunciones acerca del proceso de sustitución del ADN (Felsestein 1988 en Posadas & Crandall, 2001) establecimos el modelo de evolución del ADN que mejor se ajusta a los datos, entre los 24 dispuestos en el análisis implementado con MEGA versión 6.0.

4.6.1. Análisis filogenético

La reconstrucción de la filogenia entre haplotipos fue obtenida empleando dos métodos de agrupamiento clasificados *Neighbor Joining* (NJ) y Máxima verosimilitud (MV) empleando las opciones recomendadas por el programa MEGA 6. Previamente también se estableció, que el modelo de evolución de sustitución nucleotídica que mejor se ajusta a los datos de COI, es el de Tamura Nei (T93).

Como grupo externo se incluyeron secuencias del género *Alebra* tomadas de *GenBank* (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias obtenidas del *Genbank* que integran el *outgroup*. Se indica el nombre científico de la especie, el nombre usado para el análisis, el número de acceso *de GenBank* y sus respectivas citas bibliográficas.

Especie	Nombre abreviado	Número de acceso	Referencia
Alebra sp.	*Alebra* sp.	*KR563323.1*	Hebert *et al*., 2016
Alebra thoracica	*A.thoracica*	*KR581091.1*	Hebert *et al*., 2016
Alebra wahlbergi	*A. Wahlbergi*	*KR044971.1*	Gwiazdowski *et al*., 2015

4.6.2. Obtención de redes de haplotipos

Para inferir las relaciones intraespecíficas entre haplotipos se usó el algoritmo de "Red Mediana de Uniones" (*Median Joining Network*) (Bandelt *et al*., 1999) a partir del *software* PopArt (Leigh & Bryant, 2015) utilizando los parámetros por defecto. Esta aproximación utiliza el criterio de máxima parsimonia para estimar genealogías intraespecíficas tomando en cuenta fenómenos propios del nivel poblacional como la coexistencia en una genealogía, de genes derivados y ancestrales, o la ocurrencia de eventos de recombinación. El criterio de optimización, por máxima parsimonia, introduce vectores medios que representan haplotipos intermedios ausentes (Polzin *et al*., 2003).

5. RESULTADOS

5.1. Caracteres morfológicos

5.1.1. Manchas centrales en ala anterior

Mediante la observación del carácter "manchas centrales", los especímenes fueron agrupados de acuerdo con la similitud en la forma de las mismas. La muestra BA71 presentó las alas rotas, por lo que no se pudo realizar la observación de dicho carácter y fue excluída del análisis morfológico. De este modo los 13 especímenes analizados fueron agrupados en cuatro morfotipos (Fig.6).

MORFOTIPO 1 (M1): Manchas alargadas con terminación caudal redondeada (BA73, C2, C29, C32, CH63, S106 y SE48).

MORFOTIPO 2 (M2): Manchas alargadas con terminación caudal recta (CH4 y SE53).

MORFOTIPO 3 (M3): Manchas con forma poco definida, terminación caudal recta y extremo apical sin cerrar (CH56, C79 y C103).

MORFOTIPO 4 (M4). Manchas alargadas con bordes finos y terminación caudal recta (C101).

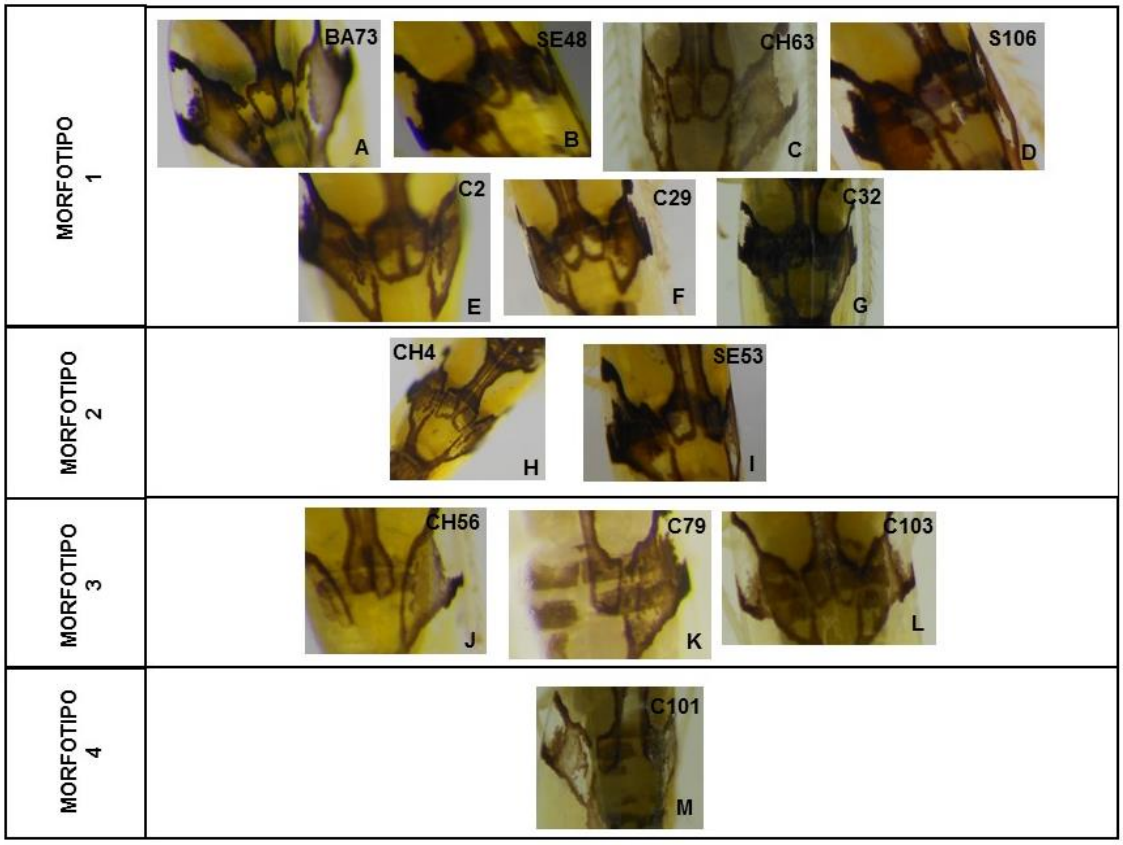

Figura 6. Sección del ala anterior de los especímenes de *Protalebrella brasiliensis* observados. **A. Provincia pampeana; B-D. Provincia chaqueña; E-G. Provincia del espinal:** especímenes correspondientes al morfotipo M1; **H-I. Provincia chaqueña**: especímenes correspondientes al morfotipo M2; **J-K: Provincia chaqueña; L. Provincia del espinal**: especímenes correspondientes al morfotipo M3; **M. Provincia del espinal**: espécimen correspondiente al morfotipo M4.

Este es el caracter donde más variación se observó, siendo estas diferencias no solo entre individuos de diferentes áreas geográficas sino también entre individuos provenientes de la misma región. En el conjunto de muestras provenientes de la provincia del espinal se encontraron tres de los cuatro morfotipos observados, correspondiendo a los morfotipos M1 (C2, C29 y C32), M3 (C103) y

M4 (C101); en las muestras provenientes de la provincia chaqueña se observaron individuos pertenecientes a los morfotipos M1 (SE48, CH63 y S106), M2 (SE53 y CH4) y M3 (CH56 y C79) y en la provincia pampeana los individuos muestreados presentaron el morfotipo M1 (BA73).

5.1.2. Sutura de la corona

No se encontraron diferencias en este carácter.

5.1.3. Proceso del *pygofer*

Al observar la genitalia en seis de los nueve machos obtenidos (las restantes tres se perdieron durante el procedimiento de remoción del último segmento abdominal) se encontraron diferencias de tamaño y forma en el proceso del *pygofer*. De acuerdo con las diferencias observadas fueron agrupados en dos morfotipos:

MORFOTIPO 1 (Mp1): Proceso largo y estilizado.

MORFOTIPO 2 (Mp2): Proceso corto y robusto.

En los especímenes BA73, C29, SE53, C103 y CH4, el proceso es aproximadamente dos veces el tamaño del *pygofer.* En BA73 y C103 la terminación del proceso es recta, en cambio, en C29 y SE53 es curvada, en CH4 el proceso se encuentra quebrado (Fig.7). A pesar de esta diferencia en la terminación del proceso los cinco especímenes fueron agrupados en el morfotipo Mp1.

El espécimen C79, presenta un proceso marcadamente más corto que el resto, correspondiendo al morfotipo Mp2 (Fig.7).

El morfotipo Mp1 se observó en las tres provincias biogeográficas, en cambio el morfotipo Mp2 se observó solo en la provincia chaqueña (Fig.7).

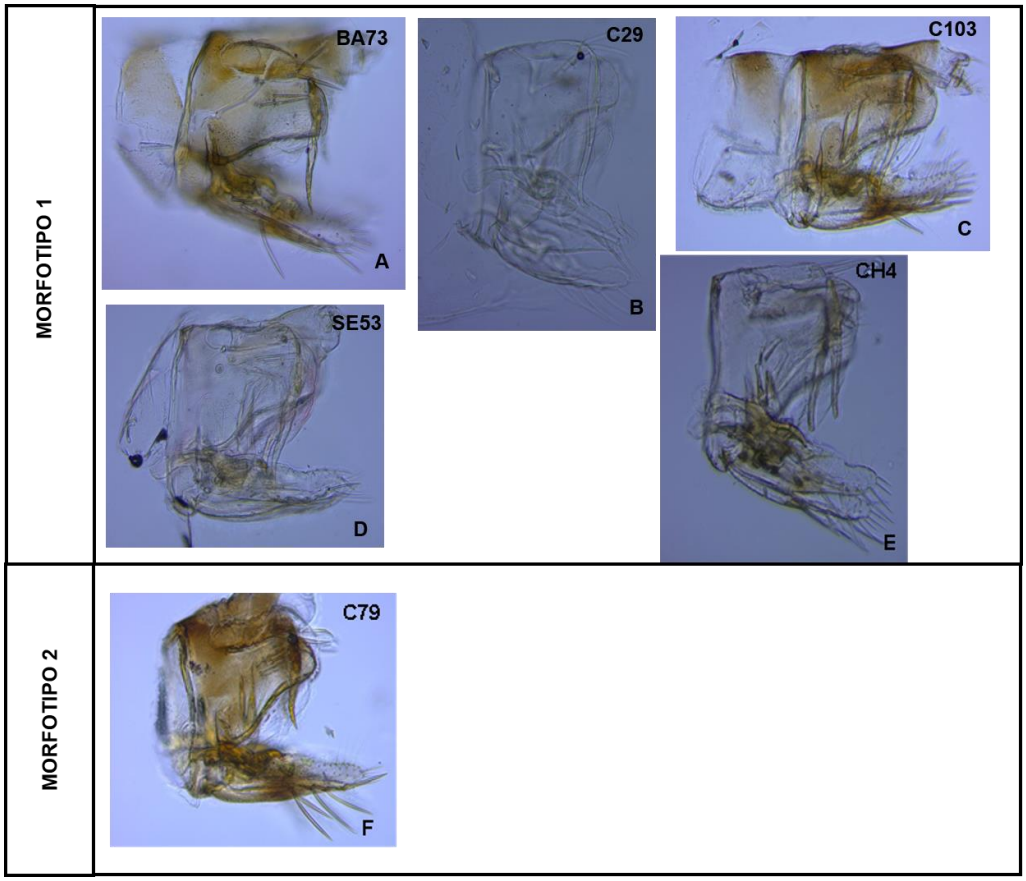

Figura 7. Genitalia de individuos macho de *Protalebrella brasiliensis.* ***A.*** **Provincia pampeana; B-C: Provincia del espinal; D-E. Provincia chaqueña*:*** genitalia de especímenes pertenecientes al morfotipo Mp1***;*** **F. Provincia chaqueña*:*** genitalia de especimen perteneciente al morfotipo Mp2.

5.2. Análisis descriptivo de las secuencias

De un total de diecinueve muestras, catorce fueron amplificadas y secuenciadas con éxito para un fragmento de 595pb del gen COI (Fig.8; Tabla 3). También se incluyeron tres secuencias de *GenBank* correspondientes al género *Alebra*: *Alebra* sp. *(*Hebert *et al.*, 2016)*, Alebra thoracica (*Hebert *et al*., 2016) y *Alebra wahlbergi (*Gwiazdowski *et al.,* 2015), utilizadas como *outgroup* en los análisis filogenéticos.

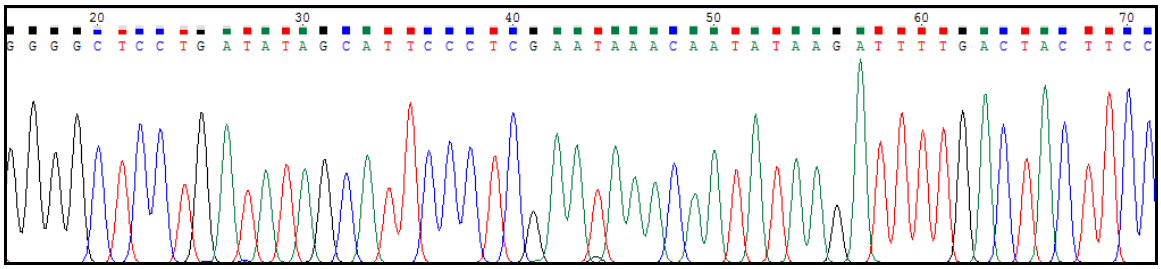

Figura 8*.* Sección de un cromatograma (20-70pb aproximadamente) de una secuencia editada de COI (595pb) para la muestra CH4, en la cual puede verse la calidad de la secuencia. Cada nucleótido es asignado con un color y una letra: A: Adenina, G: Guanina, C: Citocina y T: Timina.

Las secuencias obtenidas para las 14 muestras fueron agrupadas en cinco haplotipos, para los que se observaron cinco sitios variables, de los cuales 3 fueron sitios de mutación única (*singleton*) (Tabla 4).

Tabla 4. Sitios variables de los haplotipos obtenidos a partir del fragmento de COI analizado (595pb).

HAPLOTIPOS	SITIOS VARIABLES				
	226	**229**	**358**	**457**	**478**
Hap1	C	T	C	A	A
Hap2	.	.	.	G	.
Hap3	.	.	.	.	G
Hap4	T	.	T	G	.
Hap5	.	C	.	.	.

La diversidad haplotípica (Hd) observada fue de 0,725 con una varianza de 0,007 y un desvío estándar de 0,086. La diversidad nucleotídica (Pi) fue de 0,002, mientras que el número medio de diferencias nucleotídicas (*k*) fue de 1,187.

5.3. Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos obtenidos por las metodologías Máxima Verosimilitud (MV) y *Neighbor Joining* (NJ) presentaron diferente topología. Sin embargo, mediante ninguna de las dos las muestras analizadas presentaron una agrupación en clados indicativa de quiebre filogeográfico concordante con segregación geográfica.

En el árbol obtenido mediante MV se observaron cuatro agrupaciones apoyadas por valores de soporte para los nodos relativamente altos: 64% para las secuencias agrupadas en el Hap3, 38% para las secuencias agrupadas en el Hap1, 32% para las secuencias agrupadas en Hap2 y Hap4 y 100%

para la secuencia perteneciente al Hap5 (Fig. 9), siendo esta última la secuencia más cercana al *outgroup*. Por otro lado, las secuencias que integran el Hap3 son las más alejadas del *outgroup.*

Se observan cuatro agrupaciones. A una la constituyen las secuencias que integran el haplotipo Hap3, las cuales provienen de la provincia chaqueña (SE53, CH56 y C79) y del espinal (C2 y C103). A una segunda agrupación la conforman las secuencias que integran el haplotipo Hap1, las cuales provienen de la provincia chaqueña (C63 y SE48), del espinal (C29 y C32) y pampeana (BA71 y BA3). A la tercera agrupación la integran los haplotipos Hap2 y Hap4, los cuales están conformados por una única secuencia correspondientes a la región chaqueña (CH4) y del espinal (C101) respectivamente. La última agrupación corresponde al haplotipo Hap5, este tiene una secuencia única proveniente de la provincia chaqueña (S106).

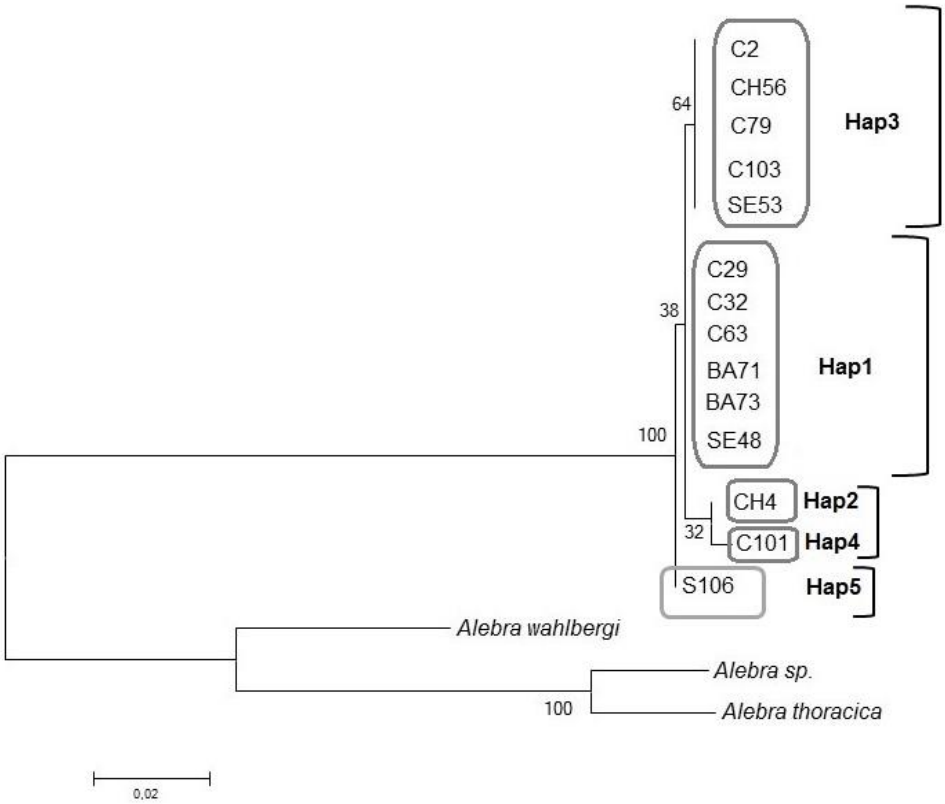

Figura 9. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Máxima verosimilitud a partir del fragmento de COI analizado (595pb) para las secuencias de *Protalebrella brasiliensis* y el *outgroup, A.wahlbergi, A. thoracica y Alebra* sp. Se indican las secuencias agrupadas en cada haplotipo obtenido (Hap1, Hap2, Hap3, Hap4 y Hap5).

En el árbol obtenido mediante *NJ* las secuencias se agruparon de forma diferente al obtenido con MV. Al igual que lo observado en el árbol MV el Hap3 es el más alejado del *outgroup;* dicha agrupación está apoyada por un valor de soporte al nodo del 63%. Las secuencias que integran los haplotipos Hap1, Hap3 y Hap5 forman un grupo más conspicuo (con un valor de soporte del 58%) que no incluye a aquellas secuencias pertenecientes a los haplotipos Hap2 y Hap4. En este caso la

secuencia más cercana al *outgroup* pertenece al haplotipo Hap4. Los valores de soporte obtenidos por esta metodología son todos mayores al 50% lo que indicaría que el árbol filogenético obtenido es más robusto (Fig.10).

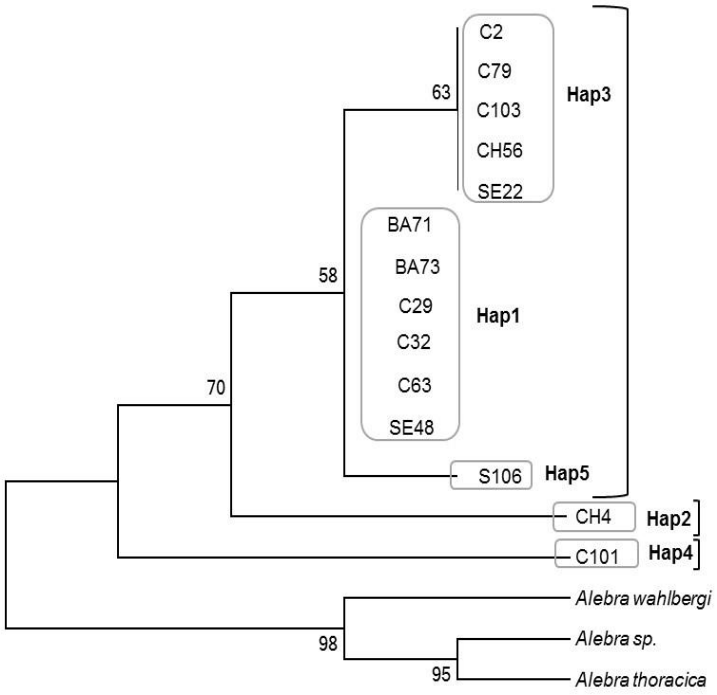

Figura 10. Árbol filogenético obtenido a partir del fragmento de COI analizado (595pb) para las secuencias de *Protalebrella brasiliensis* y el *outgroup, A. wahlbergi, A. thoracica y Alebra* sp., mediante el método *Neighbor Joining*. Se indican las secuencias agrupadas en cada haplotipo (Hap1, Hap2, Hap3, Hap4 y Hap5) obtenido.

5.4. Red de haplotipos

Las relaciones filogenéticas intraespecíficas entre los cinco haplotipos obtenidos (a partir de un total de 14 secuencias) fueron representadas en una red de haplotipos (Fig.11), en la cual no se observa diferenciación genética concordante con segregación geográfica.

En la red de haplotipos puede observarse, además de un bajo número de haplotipos (baja variabilidad genética para el marcador utilizado), la baja diferenciación entre ellos: sólo una mutación diferencia a Hap1 (haplotipo central) de los haplotipos Hap5, Hap2 y Hap3 y dos mutaciones de Hap4 (Fig.11).

Los haplotipos Hap1 y Hap3 fueron los más frecuentes en la muestra. En el haplotipo central (Hap1) se agruparon secuencias provenientes de las tres provincias biogeográficas bajo estudio, por otro lado, en el Hap3 se agruparon secuencias provenientes de la provincia chaqueña y del espinal (Tabla 5).

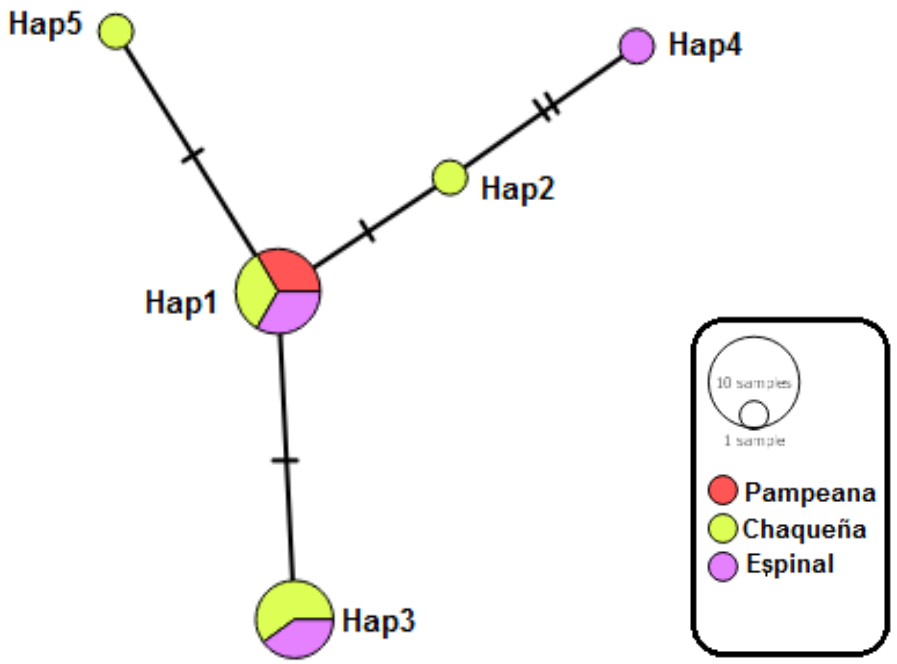

Figura 11. Red de haplotipos (*Median Joining network*) obtenida en base a las secuencias de COI (595pb, n=14). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia haplotípica su color corresponde a la provincia biogeográfica en la cual se los encuentra (pampeana, chaqueña o espinal). Las líneas cortas transversales sobre las líneas que conectan haplotipos indican el número de mutaciones que los diferencian.

Tabla 5. Haplotipo, frecuencia, identificación de las muestras y provincia biogeográfica para cada haplotipo de COI obtenido (Hap1- Hap5).

Haplotipo	N° de secuencias/ haplotipo	Muestra	Provincia biogeográfica
Hap1	6	BA71 BA73	Pampeana
		CH63 SE48	Chaqueña
		C29 C32	Espinal
Hap2	1	CH4	Chaqueña
Hap3	5	C79 CH56 SE53	Chaqueña
		C2 C103	Espinal
Hap4	1	C101	Espinal
Hap5	1	S106	Chaqueña

6. DISCUSIÓN

Los cambios más importantes que han ocurrido en las ciencias biológicas en los últimos años han surgido, principalmente, de la aplicación de técnicas moleculares del ADN para abordar una gran variedad de problemas. El enfoque molecular, asociado con el filogenético, ha tenido un gran impacto en las clasificaciones biológicas, el modo de interpretar procesos evolutivos, el estudio de las vías de dispersión de distintos organismos (filogeografía) y la estimación de edades geológicas mediante relojes moleculares (Avise, 1994). Bajo esta premisa, en este trabajo se propuso estudiar la filogeografía de *Protalebrella brasiliensis* (Baker, 1899), dado que es una especie de amplia distribución en nuestro país para la cual se cuenta sólo con la descripción original y citas de distribución (Catalano,2011; Freytag & Sharkey, 2002; Young, 1957).

En relación a los análisis morfológicos se observaron diferencias en dos de los tres caracteres estudiados, en las machas centrales de las alas anteriores y en el proceso del *pygofer*. En función de las diferencias observadas en las manchas centrales de las alas anteriores, fue posible agrupar a los especímenes en cuatro morfotipos y en función de las diferencias en el proceso del *pygofer*, fueron agrupados en dos morfotipos. Variaciones morfológicas similares a estas se han observado en otros tiflocibinos tales como *Zygina nivea* y *Z. flammigera* para los que fueron descriptos polimorfismos en la coloración del cuerpo y en el tamaño del segundo complejo esternal (Catalano *et al.,* 2011; Günthart, 1979).

El análisis molecular realizado en el presente trabajo permitió hacer una primera caracterización genética para *Protalebrella brasiliensis* a partir del uso de un fragmento de COI ampliamente utilizado en estudios de cuño filogeográfico. La utilidad y efectividad de COI en este tipo de trabajos han sido reconocidas en varios grupos de insectos, como dípteros (Andrade-Souza *et al*., 2017), hemípteros (Luo & Agnarsson, 2017), lepidópteros (Lukhtanov, 2017) y arácnidos (Harrison *et al*., 2017), entre otros. Las 14 secuencias analizadas provenientes de las tres provincias

biogeográficas involucradas en este estudio (Pampeana, Chaqueña y Espinal) se agruparon en cinco haplotipos (Hap1, Hap2, Hap3, Hap4 y Hap5) presentando un reducido grado de polimorfismo y baja diferenciación genética entre ellas. En la provincia pampeana solo se encontró el haplotipo Hap1, sin embargo, no podemos inferir que este haplotipo sea el único presente, ya que el número de individuos incluidos en el análisis fue muy bajo (n=2). En la provincia chaqueña se encontraron los haplotipos Hap1, Hap2, Hap3 y Hap5 y en la provincia del espinal se encontraron los haplotipos el Hap1, Hap3 y Hap4.

En base a nuestros resultados no se observó correlación entre la morfología y variabilidad genética para el fragmento génico analizado. En estudios previos realizados en Colombia en *Empoasca spp*. se llevó a cabo la identificación de morfotipos y su correlación a nivel molecular mediante RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Arroyo et al., 2015). Estos autores tampoco observaron correlación entre los niveles de variación obtenidos a partir de los datos morfológicos y los genéticos.

El análisis de la filogenia intraespecífica y las redes de haplotipos para las secuencias de COI no muestran una estructuración en clados que se correspondan con las tres provincias biogeográficas consideradas. Para la región neotropical, que constituye un área heterogénea que abarca desde ambientes de vegetación semidecidua hasta praderas y bosques secos (Costa, 2003), varios autores han visualizado patrones de distribución disyuntos de especies y subespecies, evidenciando una partición latitudinal a partir de datos de anfibios, reptiles y aves (Martins *et al.,* 2007). Este patrón, también ha sido descripto para mamíferos no voladores (Costa, 2003), serpientes (Grazziotin *et al.,* 2006), lagartos (Glor *et al.,* 2001), anfibios (Sousa *et al.,* 2010) y especies de murciélagos (Ditchfield, 2000; Martins *et al.,* 2007) empleando una aproximación filogenética. A pesar de que esto no fue observado en nuestro estudio, no es posible descartar la hipótesis de estructuración geográfica,

debido al reducido tamaño de muestra (n=14) y a la baja cobertura de individuos por provincia biogeográfica. Otra limitante para poder realizar un análisis filogeográfico más exhaustivo es la ausencia de secuencias disponibles en *GenBank* pertenecientes al género *Protalebrella*.

La aplicación de marcadores moleculares con mayor tasa de mutación, como los SNPs y microsatélites, probablemente ayuden a dilucidar los patrones de variación genética a nivel poblacional, así como explorar el tipo de relación subyacente entre la variabilidad morfológica y genética para esta especie tan poco conocida.

7. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se observaron diferencias morfológicas en manchas centrales de las alas anteriores y proceso del *pygofer*. Sin embargo, estas diferencias no se relacionan con una distribución geográfica en particular.

- En cuanto al análisis del fragmento de COI se observó un reducido grado de polimorfismo y baja diferenciación genética entre las secuencias obtenidas. No fue observada una estructuración en clados genéticos que se corresponda con las provincias biogeográficas.

- En base a los resultados morfológicos y moleculares se observó que no hay correlación entre la variación morfológica evaluada y la variabilidad genética para el fragmento génico analizado.

- Se requieren de nuevos estudios para avanzar tanto en el conocimiento de la variabilidad de esta especie como de su distribución biogeográfica.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abrámoff MD, Magalhães PJ & Ram SJ. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International.* 11(7): 36-42.

2. Allendorf W & Leary RF. 1986. Heterozygosity and fitnes in natural populations of animals. In: SOULÉ, M. E. (ed.). Conservation biology: the science of scarcity and diversity. *Sinauer Associates, Sunderland, MA*: 57-76.

3. Andrade-Souza V, Silva JG & Hamada N. 2017. Phylogeography and population diversity of *Simulium hirtipupa* Lutz (Diptera: Simuliidae) based on mitochondrial COI sequences. *PLoS ONE 12(12)*: e0190091

4. Arroyo PW, Pérez-H A, Díaz-Soto J & Beltrán HJ. 2015. Identificación de morfotipos de *Empoasca* spp. (Hemiptera: Cicadellidae) en agro-ecosistemas de ñame y yuca (Sucre, Colombia). *Revista Colombiana de Entomología .41 (2)*: 163-169.

5. Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA & Saunders NC. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridege between population genetic and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 18:489-522.

6. Avise JC. 1994. Molecular markers, natural history, and evolution. *(ed Springer) Chapman and Hall, New York*:511pp

7. Avise JC & Hamrick JL (eds.). 1996. Conservation genetics, case histories from nature. Chapman and Hall, New York.

8. Backus E, Serrano M & Ranger C. 2005. Mechanisms of hopperburn: anoverview of insect taxonomy, behavior, and physiology. *Annual Review of Entomology*. 50: 125-151.

9. Baker C. 1899. On *Alebra* and related genera. *Psyche.* 8: 401-405.

10. Balme GR. 2007. Phylogeny and Systematics of the Leafhopper Subfamily

Typhlocybinae (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae*). PhD, Faculty of North Carolina State University.*

11. Bandelt HJ, Foster P & Rohl A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16:37-48.

12. Cabrera AL. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería (2)1: 85 pp.

13. Castalanelli MA, Baker AM, Munyard KA, Grimm M & Groth DM. 2012. Molecular phylogeny supports the paraphyletic nature of the genus *Trogoderma* (Coleoptera: Dermestidae) collected in the Australasian ecozone. *Bulletin of Entomological Research*. 102: 17–28.

14. Catalano MI. 2011. Cicadélidos vectores de fitoplasmas a cultivos de importancia económica en la Argentina. Sistemática y bioecología (Insecta: Auchenorrhyncha: Cicadellidae). *Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP:* 134pp.

15. Caterino MS, Cho S & Sperling FA. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review Entomology.*45: 1-54.

16. Costa LP.2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogegraphy* .30: 71-86

17. Dietrich CH & Vega FE. 1995. Leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) from Dominican amber. *Annals of the Entomology Society of America*.88: 263-270.

18. Dietrich CH. 1999. The role of the grasslands in the diversification of leafhoppers (Homoptera:Cicadellidae): a phylogenetic perspective. *Proceedings. Fifteenth North American Prairie Conference*: 44-48.

19. Dietrich C. 2005. Keys to the families of Cicadomorpha and subfamilies and tribes of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). *Florida Entomologist.* 88: 502-517.

20. Ditchfield AD.2000. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial ADN variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology*. 9: 1307-1318

21. Dworakowska I. 1994. Some Alebrini of Western Hemisphere (Insecta: Auchenorrhyncha-Cicadellidae-Typhlocybinae). *Entomologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden.* 56 (I): 1-30.

22. Freytag PH & Sharkey MJ. 2002. A preliminary list of the leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) of Colombia. *Biota Colombiana*. 3 (2): 235-283.

23. Giles RE, Blanc H, Cann HM & Wallace DC.1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 77: 6715-6719.

24. Glor RE, Vitt LI & Larson A. 2001. A molecular phylogenetic analysis of diversification in Amazonian Anolis lizards*. Molecular Ecology. 10*: 2661-2668.

25. Godoy JA. 2009. La genética. Los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18 (1):23-33.

26. Graur D & Li WH. 2000. In Fundamentals of Molecular Evolution. *Sinaurer Asociates*: 1-481.

27. Grazziotin FG, Monzel M, Echeverrigaray S & Bonatto SL. 2006. Phylogeography of the Bothrops jararaca complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology.* 15: 3969-3982.

28. Günthart H.1979. Biotaxonomic experiments proving Zygina pruni Edwards 1924 is a synonym of Zygina (Flammigeroidia) flammigera (Fourcroy 1785) (Hom. Auch. Cicadellidae, Typhlocybinae). *Bulletin de la Société Entomologique Suisse* 52: 13-17

29. Gwiazdowski RA, Foottit RG, Maw HEL & Hebert PDN. 2015. The Hemiptera (Insecta) of Canada: constructing a reference library of DNA barcodes. *PloS one* 10(4): e0125635.

30. Hamilton K. 1984. Thetenth largest family? En: *Tymbal Auchenorrhyncha Newsletter 3:* 4-5.

31. Hamilton KGA. 1990. Homoptera. *In* Grimaldi DA, ed. Insects from the Santana Formation, Lower Cretaceous, of Brazil. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 195: 82-122.

32. Hamilton KGA. 1992. Lower Cretaceos Homoptera from the Koonwarra fossil bed in Autralia, with a new superfamily and synopsis of Mesozoic Homoptera. *Annals of the Entomological Society of America.* 85: 423-430.

33. Harrison R. 1994. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Tree* 4:6-11.

34. Harrison SE, Harvey MS, Cooper SJB, Austin AD & Rix MG .2017. Across the Indian Ocean: A remarkable example of trans-oceanic dispersal in an austral mygalomorph spider. *PLoS ONE* 12(8): e0180139

35. Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH & Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly Astraptesfulgerator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (41): 14812–14817.

24. Hebert PDN, Ratnasingham S, Zakharov EV, Telfer AC, Levesque-Beaudin V, Milton MA, Pedersen S, Jannetta P & deWaard JR, 2016. Counting animal species with DNA barcodes: Canadian insects. *Philosophical Transactions Royal Society B 371 (1702)* http://rstb.royalsocietypublishing.org/

26. Lanteri A & Confalonieri V. 2002. Filogegrafía: Objetivos, Métodos y Ejemplos. *Zoología*: 185-193.

27. Librado P & Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25:1451-1452.

28. Lukhtanov VA & Dantchenko AV. 2017. A new butterfly species from south Russia revealed through chromosomal and molecular analysis of the Polyommatus (Agrodiaetus) damonides complex (Lepidoptera, Lycaenidae). *Comparative Cytogenetics* 11(4): 769–795.

29. Leigh JW & Bryant. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*.DOI: 10.1111/2041-210X.12410.

30. Lunt DH, Whipple LE & Hyman BC. 1998. Mitochondrial ADN variable number tendem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology.* 7: 1441-1455.

31. Luo Y & Agnarsson I. 2018. Global mtDNA genetic structure and hypothesized invasion history of a major pest of citrus, Diaphorina citri (Hemiptera: Liviidae). *Ecology and Evolution.* 8:257–265.

32. Martins FM, Ditchfield D, Meyer D & Morgante JS. 2007. Mitochondrial ADN phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). *Journal of zoological Systematic & Evolution Research.*45: 372-378.

33. Moritz C & Hillis DM. 1996. Molecular systematics context and controversies. *Molecular Systematics.* 2: 1-13.

34. Nishiguchi MK, Doukakis P, Egan M, Kizirian D, Aloysius P, Prendini L, Rosenbaum HC, Torres E, Wyner Y, DeSalle R & Giribet G, 2002. *DNA Isolation Procedures*: 272-273pp.

35. Núñez DC. 2011. Análisis de ADN mitocondrial y de polimorfismos genéticos de los cromosomas autosómicos y sexuales de la población mestiza de Nicaragua. Universidad de Zaragoza. *Departamento de anatomía patológica, medicina legal y forense y toxicológica*: 1-210.

36. Oman P. 1937. New Eupterygine leafhoppers from Puerto Rico (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico.* 21: 567-571.

37. Oman, P. 1949. The Nearctic leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae). A generic classification and check list. *Memoirs of the Entomological Society of Washington.* 3:1-253.

38. Polzin T & Daneschmand SV. 2003. On steiner trees and minimum spaning trees in hypergraphs. *Operations research letters.* 31: 12.20.

39. Posadas D & Crandall KA.2001. Intraespecific gene geanologies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution.* 16:37-45.

40. Scudder SH.1890. Homoptera in the Tertiary insects of North America. United state *geological survey of the territories .* 13:1-663.

41. Shcherbakov D.1992. The earliest leafhoppers (Hemiptera: Karajassidae n.fam.) from the Jurassic of Karatau. Neues Jahrbuch für geologie und paläontologie . (1): 39-51.

42. Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H & Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of con- Served polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America.* 87:651-701.

43. Soltis DE, Soltis PS & Doyle IJ. 1998. Molecular systematics of plants II: DNA sequencing. *Kluwer Academic Publishing, Boston, Dordrecht y Londres.*

44. Sousa R, Teixeiria M jr., Cassimiro J, Camacho A & Trefaut M. 2010. A new species of Dendrophryniscus (Amphibia, Anura, Bufonidae) from the Atlantic Rainforest of southern Bahia, Brasil*. Zootaxa*: 36-44.

45. Stoeckle M, Waggoner PE & Ausubel JH. 2005. Barcoding life, llustrated. http://barcoding.si.edu/

46. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* 30(12):2725-2729.

47. Torres B. 1955b. *Protalebrella schachovskoyi* nueva especie de Typhlocybinae. *Neotropica.* 1 (6): 89-92.

48. Weintraub P & Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review Entomology.* 51: 91-111.

49. Young D. 1952. A reclassification Western Hemisphere Typhlocybinae (Homoptera, Cicadellidae). *Kansas University Science Bulletin.* 35: 217 pp.

50. Young D. 1957. The leafhopper tribe Alebrini (Homoptera: Cicadellidae). *Proceedings of the United States National Museum.* 107: 127-277.

9. ANEXO

9.1. Protocolos

9.1.1. Extracción de ADN

El protocolo de extracción de ADN utilizado para obtener el ADN total se modificó de Nishiguchi y colaboradores (2002) de la siguiente manera:

1) Extracción:

- Precalentar el CTAB (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, β-Mercaptoetanol 0.2%, EDTA 20 mM, Tris-HCl pH 8 100 mM, H2O c.n.) a 60 ºC en baño María.
- Colocar el tejido en un tubo de 1.5 ml.
- Añadir 100 µl de CTAB.
- Morterear bien el tejido, hasta que quede una solución homogénea.
- Agregar 400 µl de CTAB.
- Añadir 15 µl de Proteínasa K.
- Incubar, previo vortex y spin, a baño María a 60 ºC overnight.

2) Limpieza:

- Añadir 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
- Invertir gentilmente por 2 minutos.
- Centrifugar 20 minutos a 13.000 rpm.

- Transferir el sobrenadante a otro tubo cuantificando el volumen transferido.

3) Precipitación:

- Añadir 2/3 de etanol absoluto al sobrenadante y 0.1 vol. de AcNa 3 M pH 5.2.
- Dejar precipitando 1 hora en freezer a -80 ºC, previo vortex y spin.

4) Lavado:

- Centrifugar 20 minutos a 13.000 rpm.
- Descartar cuidadosamente el sobrenadante.
- Añadir 500 µl de etanol 70% frio.
- Centrifugar 20 minutos a 13.000 rpm.
- Descartar cuidadosamente el sobrenadante.

5) Secado:

- Secar lo que haya quedado del sobrenadante en placa a 37 ºC con los tubos abiertos.
- Resuspender el pellet en 20 µl de TE 1X.
- Incubar los tubos cerrados, previo vortex y spin, en estufa a 60 ºC por 20 minutos mínimo para la completa dilución.

9.1.2. Amplificación de ADN

Las condiciones de la mix para realizar la PCR con los *primers* LepF y LepR, fueron modificadas de Hebert *et al*., 2004. Para un volumen final de 20 µl se usó:

- Buffer: 5 µl
- Cl2Mg: 3 µl
- Taq polimerasa: 1 µl
- dNTPs: 1 µl
- *Primer Reverse*: 1 µl
- *Primer Foward*: 1 µl
- Molde: según cc. de ADN de cada muestra para llegar a 20 ng.
- Agua: cantidad necesaria.

El protocolo del termociclador es:

1) Desnaturalización inicial: Un ciclo de 1min 30seg. a 94 ºC.

2) 35 ciclos de:

- Desnaturalización: 1min a 94C°
- Asociación: 1min. 30 seg. a 51°C.
- Extensión: 1 min. a 74°C.

3) Extensión final: 5 min. a 74°C.

VILLALÓN
José
Gastón
ECANA
Location:
UNNOBA
Date:
2018.04.20
10:21:54 -0300