

**Coevolución entre la bacteria *Wolbachia pipientis* y los gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus* (Coleoptera, Curculionidae)**

Trabajo Final de Grado  
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 11 de diciembre de 2023

**Coevolución entre la bacteria *Wolbachia pipientis* y los gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus* (Coleoptera, Curculionidae)**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

**VALERIA DANIELA CABRIO**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**



Dra. Marcela Rodriguero  
**Directora**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**



Dra. María Guadalupe del Rio  
**Co-Directora**



Dra. Juliana Sánchez  
**Tutora**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 11 de diciembre de 2023

## **Agradecimientos**

A la Dra. Marcela Rodruigero por confiar en mi desde un primer momento y aceptarme como tesinista.

A la Dra. María Guadalupe del Rio por aceptar formar parte de este proyecto y por su gran ayuda en este trabajo.

Gracias Marce y Guada por su infinita paciencia. Gracias por su predisposición. A pesar de la virtualidad me sentí muy contenida, fueron muy atentas y contestaron todas mis dudas, ayudándome a ir resolviendo cada dificultad que se presentaba. Siempre estuvieron muy presentes, ya sea por una videollamada, mensajes, mails, siendo muy claras en sus explicaciones y aportándome la bibliografía necesaria. Estuvieron en cada detalle y me dieron las herramientas necesarias que me permitieron aprender sobre la historia evolutiva entre *Wolbachia* y los gorgojos de la tribu Naupactini.

Gracias a mi familia por el apoyo incondicional. Gracias mamá, papá y Belu. Sin su contención, amor, educación, comprensión y los recursos que me brindaron hubiera sido imposible transitar este camino. Gracias por confiar en mí desde el primer momento en el que elegí esta carrera. Gracias Belu por ser mi ejemplo y mi mayor motivación.

A Fran, por su compañerismo y apoyo. Gracias por el día a día, por confiar en mí, por escucharme, aconsejarme, por la motivación y ayudarme todos los días a ser un poquito mejor.

A Mica, mi amiga de siempre. Una de las primeras personas que confió en mí para la obtención de este título y es quien me sigue y apoya en todos mis proyectos. Gracias por todo lo compartido y lo que nos falta por compartir.

Quiero dedicar un párrafo especial a mis amigos: Leo, Sofi, Lula, Juli, Noe, Yami, Mai, Cami y a todos mis compañeros que también hicieron posible la obtención de este título. Si hay algo que sin duda los distingue, es el compañerismo. La UNNOBA me dio la posibilidad de conocer excelentes personas y hoy me llevo lo más valioso, que es su amistad. Gracias por el apoyo, las risas, la contención y el tiempo compartido.

Gracias eternamente a la UNNOBA por ofrecer una educación de excelente calidad y tener esa calidad humana que la distingue. En los tiempos que estamos viviendo, resulta urgente agradecer y valorar el sistema público en su totalidad. Sin educación pública, no hubiera podido pensar en obtener un título universitario, con todo lo que eso significa. En particular, contar con la Universidad en la ciudad en donde vivo fue crucial en mi vida personal y profesional, es por ello que sostengo, agradezco y defiendo este sistema.

## RESUMEN

Los gorgojos (Coleoptera: Curculionidae) constituyen el grupo de insectos fitófagos de mayor importancia fitosanitaria en la Argentina y países limítrofes. Particularmente, la tribu Naupactini tiene un enorme impacto en la agricultura por el daño causado a gran variedad de cultivos agrícolas y forestales. El grupo más diverso dentro de Naupactini es el complejo taxonómico *Pantomorus-Naupactus*, el cual incluye varias especies partenogenéticas. La partenogénesis surgió varias veces en forma independiente en este grupo y se encuentra asociada a la presencia de la bacteria *Wolbachia pipientis*, parásito reproductivo de gran cantidad de artrópodos.

A fin de comprender la evolución de la infección con *Wolbachia* en el complejo *Pantomorus-Naupactus* se llevó a cabo un análisis cofilogenético. Para ello, primeramente, se reconstruyó la filogenia de las cepas de *Wolbachia* a partir de las secuencias de los cinco genes utilizados en el sistema de tipificación multilocus o MLST (por sus siglas en inglés, *Multilocus System Typing*), que permite identificar las cepas de esta bacteria, mediante el programa MrBayes. Para reconstruir la filogenia del complejo *Pantomorus-Naupactus* se utilizaron dos conjuntos de datos, uno morfológico y otro molecular compuesto por secuencias mitocondriales. Ambas fuentes de caracteres se analizaron de manera combinada, utilizando enfoques bayesianos y de máxima parsimonia. En base a las filogenias obtenidas de los análisis anteriores, se estudió la historia evolutiva entre *Wolbachia* y los gorgojos hospedadores mediante métodos cofilogenéticos de ajuste global y basados en eventos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la evolución entre *Wolbachia* y los gorgojos de la tribu Naupactini ha sido en gran parte independiente, aunque existe una marcada preferencia de un grupo de bacterias por la familia Curculionidae. La diversidad de hospedadores infectados por de *Wolbachia* en Curculionidae resulta de procesos históricos que involucran altas tasas de transferencia horizontal interespecífica, atribuyéndose este evento, al menos en parte, a la presencia de cepas superpropagadoras.

## ÍNDICE

<b>1-INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1.1 Hospedadores: gorgojos .....	9
1.2 Asociado: <i>Wolbachia pipientis</i> .....	11
<b>2-HIPÓTESIS Y PREDICCIÓN</b> .....	17
<b>3-OBJETIVOS</b> .....	17
3.1 Objetivo general .....	17
3.2 Objetivos específicos.....	18
<b>4-MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
4.1 Análisis filogenético de <i>Wolbachia</i> .....	18
4.2 Análisis filogenético de <i>Pantomorus-Naupactus</i> .....	22
4.3 Análisis cofilogenético.....	23
4.3.1.- Métodos de ajuste global. ....	24
4.3.1.1.- ParaFit .....	24
4.3.1.2.- PACo .....	26
4.3.2.- Métodos basados en eventos .....	29
4.3.2.1.- Jane .....	29
<b>5-RESULTADOS</b> .....	30
5.1 Análisis filogenético de <i>Wolbachia pipientis</i> .....	30
5.2 Análisis filogenético del hospedador .....	33
5.2.1 Análisis bayesiano: .....	33
5.2.2 Análisis por Máxima Parsimonia: .....	34
5.3 Análisis cofilogenético.....	35
5.3.1 Reconstrucción cofilogenética entre <i>Wolbachia</i> y gorgojos del complejo <i>Pantomorus-Naupactus</i> por métodos de ajuste global. ....	35
5.3.2 Reconstrucción cofilogenética entre <i>Wolbachia</i> y gorgojos de la tribu Naupactini por métodos basados en eventos. ....	37
<b>6-DISCUSSION Y CONCLUSIONES</b> .....	41
<b>7-PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	48
<b>8-BIBLIOGRAFÍA</b> .....	49
<b>9- ANEXOS</b> .....	66
9.1 ANEXO 1. Tabla S1. Matriz de 45 caracteres morfológicos de 31 especies de gorgojos del complejo <i>Pantomorus- Naupactus</i> , incluyendo las unidades evolutivas recientemente reportadas para la especie nominal <i>N. cervinus</i> (Rodriguero <i>et al.</i> , 2013). En las columnas se enumeran del 0– 44 los caracteres morfológicos y en las filas las especies de gorgojos. Matriz realizada por María Guadalupe del Rio. ....	66
9.2 ANEXO 2. Lista de caracteres morfológicos. ....	68

# 1-INTRODUCCIÓN

La coevolución es la base sobre la que se organizan los procesos evolutivos que establecen la red de la vida (Thompson 2010, 2012; Thompson & Medel 2010). Este proceso ocurre en todos los niveles biológicos, desde una “pequeña escala”, como genes que funcionan dentro de entidades biológicas (por ejemplo, virus) y cambian de función en respuesta a los cambios que experimentan los genes de otros individuos (por ejemplo, células hospedadoras), hasta una “gran escala”, como cambios fenotípicos entre dos poblaciones estrechamente relacionadas, o como patrones de diversificación de parásitos en respuesta a los de sus especies hospedadoras (por ejemplo, codiversificación) (Charleston & Libeskind-Hadas, 2014).

Para detectar procesos coevolutivos entre dos o más taxones se utiliza el análisis cofilogenético, i.e. la reconstrucción de relaciones ecológicas pasadas entre grupos de organismos ecológicamente vinculados a partir de su información filogenética (Charleston & Little, 2009), el cual pone en evidencia los eventos que moldearon la evolución conjunta de ambos grupos de organismos (e.g. codivergencia, duplicación, cambio de hospedador y extinción).

El objetivo del análisis cofilogenético es explicar las relaciones entre tres tipos de asociaciones históricas que evolucionan mutuamente: 1) genes/especies, 2) hospedador/parásito y 3) organismos/áreas (Page & Charleston, 1998; Ronquist, 1998). En este contexto, el análisis cofilogenético se considera un enfoque integrador: diferentes conceptos de eventos evolutivos concebidos en subdisciplinas comparables (Sistemática Molecular, Parasitología y Biogeografía) pueden ser análogos e interpretarse bajo el mismo principio (Page, 2003). Por ejemplo, los principales eventos evolutivos en sistemática molecular y filogenómica (codivergencia, duplicación, pérdida y transferencia horizontal de genes), que surgen de la reconciliación de árboles de genes y árboles de especies, corresponden a la coespeciación, duplicación, extinción de linaje y cambio de hospedador, respectivamente, en estudios parasitológicos (Doyon *et al.*, 2011; Stolzer *et al.*, 2012) y vicarianza,

especiación simpátrida, dispersión y extinción en Biogeografía, respectivamente (Ronquist, 1998; Martínez-Aquino *et al.*, 2016). A partir de los avances teóricos y metodológicos de cada disciplina, la inferencia coevolutiva se puede integrar utilizando enfoques similares. Sin embargo, cada disciplina tiene sus supuestos explícitos y dificultades particulares, y los procesos coevolutivos que ocurren en la naturaleza rara vez son simples; por lo tanto, explorar hipótesis coevolutivas en cualquier sistema biológico puede resultar complejo. Sin embargo, los métodos cofilogenéticos implementados en varios paquetes y programas informáticos (con herramientas y características únicas) han aumentado en los últimos años (Balbuena *et al.*, 2013; Baudet *et al.*, 2014; Drinkwater & Charleston 2014; Libeskind-Hadas *et al.*, 2014).

La coevolución en sistemas hospedador-parásito se considera una relación asimétrica entre grupos de taxones vinculados ecológicamente, porque un organismo evoluciona mucho más lentamente que el otro (Charleston & Libeskin-Hadas, 2014). Estos patrones de coevolución asimétrica se encuentran comúnmente en modelos biológicos reales (Badets *et al.*, 2011; Demastes *et al.*, 2012; Martínez-Aquino *et al.*, 2016).

Se entiende como codivergencia, la divergencia paralela de linajes ecológicamente asociados dentro de dos filogenias distintas (Page, 2003). Existen dos tipos de codivergencia: 1) codivergencia Tipo I, en la que la divergencia de un linaje de parásito intraespecífico ocurre en respuesta al evento de especiación de su hospedador y 2) codivergencia Tipo II, en la que ocurre la transferencia horizontal del parásito seguida de acumulación de divergencia y consecuente especiación (Martínez-Aquino *et al.*, 2016).

Actualmente, se encuentran disponibles numerosos avances teóricos, metodológicos y conceptuales implementados en programas informáticos para analizar datos empíricos de modelos biológicos en sistemas hospedador-parásito. En este contexto, es posible proponer un programa de estudio basado en un marco filogenético para descubrir procesos coevolutivos (Fig. 1), lo cual implica trabajar en tres etapas: 1) delimitar las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) en cualquier nivel taxonómico, y reconstruir sus filogenias (Yang & Rannala, 2012); 2) probar hipótesis cofilogenéticas con enfoques

estadísticos y basados en eventos; y 3) detectar patrones de congruencia geográfica e inferir la coevolución de manera integral a partir de la descripción final del proceso inferido bajo un marco filogenético a partir de la complementación con pruebas biogeográficas paramétricas y de congruencia temporal de divergencia entre dos grupos independientes (Ebach *et al.*, 2008).

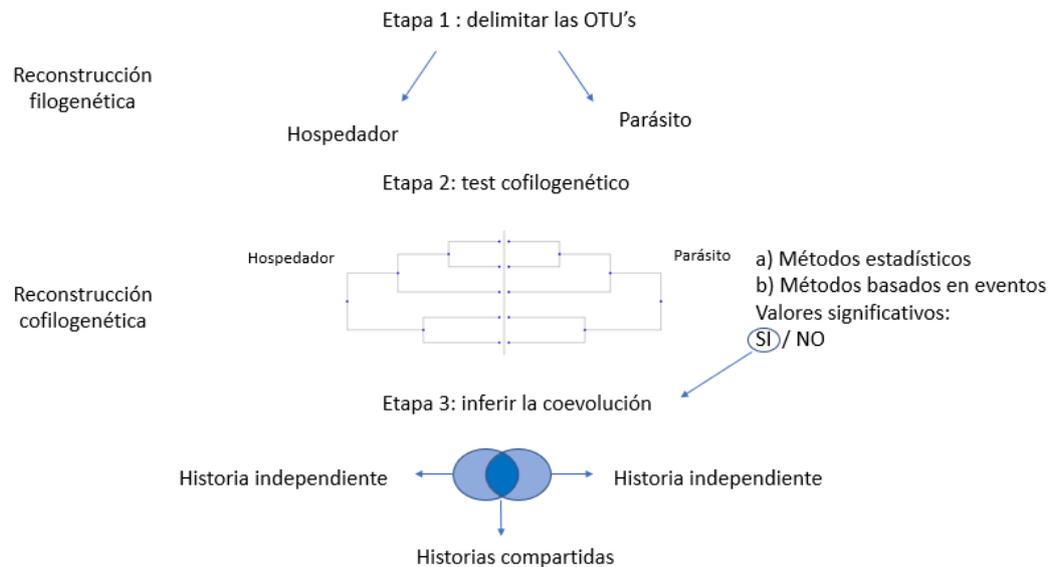


Figura 1. Diagrama de flujo que muestra un marco cofilogenético hipotético paso a paso. Tomada de Martínez-Aquino (2016), con modificaciones.

Estas tres etapas representan una guía para estudios coevolutivos en un marco filogenético. La idea general es comparar los patrones biológicos y filogenéticos observados entre dos grupos taxonómicamente no relacionados de OTUs que muestran una estrecha asociación ecológica, sugerir una posible correlación evolutiva y probar esta hipótesis coevolutiva, teniendo en cuenta las historias biogeográficas de los taxones involucrados.

Este Trabajo Final de Grado se enfocará en el estudio de la interacción hospedador-parásito entre los gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus* (Coleoptera, Curculionidae) y la bacteria *Wolbachia pipientis* Hertig (Rickettsiales: Anaplasmataceae) a partir de un enfoque cofilogenético, utilizando métodos basados en eventos y métodos de ajuste global (Page, 2003; Ronquist, 2003; Charleston & Libeskind-Hadas, 2014).

## 1.1 Hospedadores: gorgojos

Los coleópteros de la superfamilia Curculionoidea, conocidos como gorgojos, comprenden alrededor de 62.000 especies agrupadas en 5800 géneros. En el país se conocen unas 1270 especies y casi 440 géneros de gorgojos. Casi el 90% de las especies de gorgojos de Argentina pertenece a la familia Curculionidae (Marvaldi & del Río, 2023). Por sus hábitos fitófagos, tanto en el estado adulto como en el larval, los gorgojos cumplen un papel fundamental en los ecosistemas naturales como herbívoros, consumidores de semillas, polinizadores y descomponedores de materia vegetal (Roig-Juñent *et al.*, 2014). Por sus asociaciones particulares con las plantas, algunas especies resultan de importancia económica al dañar cultivos agrícolas, plantaciones forestales y plantas ornamentales, en tanto que otras son real o potencialmente útiles para el control biológico de malezas. Los gorgojos, considerados colectivamente, se alimentan y desarrollan en todos los taxones de plantas vasculares y en todas las partes vegetales incluyendo raíces, tallos, hojas y órganos reproductivos (Anderson, 1993, 1995).

Dentro de la familia Curculionidae, la subfamilia Entiminae incluye los gorgojos de rostro corto y es la más diversa. Entiminae está clasificada en numerosas tribus; entre ellas, la que reúne mayor número de especies es Naupactini (Lanteri *et al.*, 2002). La tribu Naupactini tiene un enorme impacto en la agricultura, ya que cuenta con numerosas especies que causan daños a una gran variedad de cultivos agrícolas y forestales (Lanteri *et al.*, 2002). El tipo de oviposición en el grupo es exofítica, y a menudo sucede en nichos cercanos al suelo, ya que las larvas son de hábitos subterráneos. Los huevos son depositados en hendiduras formadas por dos superficies, por ejemplo, los puntos de contacto entre el suelo y la hojarasca, en grietas de troncos o ramas, entre dos hojas o en un doblado de una hoja (Marvaldi, 1999). Las larvas viven libremente en el suelo alimentándose externamente sobre las raíces (Howden, 1996; Lanteri *et al.*, 1997; Marvaldi, 1999). La pupación ocurre generalmente dentro de una celda de tierra construida por la larva. Los adultos se alimentan sobre las hojas, dejando en sus bordes incisiones semicirculares.

El grupo más diverso dentro de Naupactini, y que es nuestro objeto de estudio, es el complejo taxonómico *Pantomorus-Naupactus*, el cual incluye varias especies partenogenéticas, algunas de ellas dañinas para la agricultura e invasoras en diversas partes del mundo. La mayoría de estas especies son nativas de las selvas, praderas y estepas de América del Sur (noreste y centro de Argentina, sur de Brasil y Uruguay) (Lanteri & Normark, 1995). Se asocian preferentemente con vegetación arbórea y arbustiva. En nuestro país, se encuentran por ejemplo en *Gossypium hirsutum* (Malvaceae), *Citrus* sp. (Rutaceae) o *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). Otras especies del complejo con alas reducidas o ausentes, asignadas a los géneros *Aramigus*, *Atrichonotus*, *Eurymetopus* y *Pantomorus*, son frecuentes en leguminosas (Fabaceae) y gramíneas (Poaceae) de la región pampeana (Lanteri, 1994). También se encuentran asociadas con Solanaceae de la vegetación silvestre y, esporádicamente, con cultivos de papa (*Solanum tuberosum*, Solanaceae) o girasol (*Helianthus annuus*, Asteraceae) (Lanteri *et al.*, 2002).

Las especies de Naupactini que se encuentran en la Argentina son nativas y, en general, están en equilibrio con su ambiente. Sin embargo, pueden tornarse perjudiciales bajo ciertas condiciones (por ejemplo, sequía), y principalmente, cuando varias de ellas atacan un mismo cultivo. Un caso típico está representado por el complejo de gorgojos de la alfalfa; este grupo reúne alrededor de 20 especies del grupo *Pantomorus-Naupactus*, asociadas en forma casi permanente con esta forrajera en las provincias del centro del país (Lanteri, 1994). Dado que los picos de emergencia de adultos de las distintas especies se suceden desde el principio de la primavera hasta fines del otoño, durante todo el período estival hay adultos alimentándose sobre el follaje y larvas dañando las raíces (Lanteri, 1994).

Los daños que provocan las especies de Naupactini introducidas en otros países, principalmente las que tienen linajes partenogenéticos, como *Naupactus cervinus* Boheman, 1940 o *Naupactus leucoloma* (Boheman), son severos, alcanzando a veces la condición de plaga. La primera daña principalmente plantas ornamentales, cítricos y alfalfa; la segunda ha sido muy perjudicial para cultivos de poroto en Chile y para numerosos cultivos en

EEUU. Otra especie introducida desde la Argentina en Chile, donde causa serios daños en vid y frutales es *Naupactus xanthographus* (Germar) conocida como “burrito de la vid” (Lanteri & Normark, 1995).

Aunque hay evidencia directa de partenogénesis en unas pocas especies de Naupactini (Buchanan, 1939), Lanteri & Normark (1995) propusieron una lista de 30 especies presuntamente partenogenéticas sobre la base de proporciones de sexo marcadamente sesgadas hacia las hembras (machos ausentes o escasos en parte de su área de distribución geográfica). Diversas reconstrucciones filogenéticas indicaron que la partenogénesis surgió varias veces en forma independiente en este grupo de insectos (Lanteri & Normark, 1995; Scataglini *et al.*, 2005; del Río *et al.*, 2018).

Los mecanismos que originaron este modo reproductivo en los gorgojos de rostro corto todavía están en discusión y en un principio se habían atribuido a varios factores como la hibridación y la poliploidía (Sanderson 1973; Normark 1996; Normark & Lanteri, 1998). Sin embargo, la infección con la bacteria inductora de partenogénesis *Wolbachia pipientis* añadió la posibilidad del origen infeccioso de la partenogénesis (Rodríguez *et al.*, 2010, 2021; Fernández Goya, 2023).

## 1.2 Asociado: *Wolbachia pipientis*

*Wolbachia pipientis* son bacterias gram-negativas pertenecientes a la familia Anaplasmataceae dentro del orden Rickettsiales. Como *W. pipientis* es actualmente el único miembro de su género, se lo conoce convencionalmente como *Wolbachia* (Kaur *et al.*, 2021). Se ha informado de la presencia de *Wolbachia* en varios grupos importantes de artrópodos terrestres (hexápodos, arácnidos e isópodos), así como en nematodos filariales (Taylor, *et al.*, 2005; Weinert *et al.*, 2015) y en nematodos parásitos de plantas (Haegeman *et al.*, 2009), infectando a un 50% de los artrópodos terrestres (Weinert *et al.*, 2015). No es sorprendente que, dada esta amplia gama de hospedadores, *Wolbachia* muestre una gran diversidad genética.

Estas bacterias intracelulares obligadas se transmiten verticalmente de la madre a la progenie, siendo los machos líneas muertas para el pasaje a la

siguiente generación. La herencia vertical a través de un único sexo actuó como presión de selección para la evolución del “parasitismo reproductivo”: mediante la alteración de la reproducción de sus portadores, *Wolbachia* incrementa la cantidad de individuos que tienen la capacidad de transmitirla (i.e. hembras infectadas), aumentando su frecuencia poblacional (Werren *et al.*, 1995). Entre los efectos que *Wolbachia* induce en sus hospedadores se encuentran: i) androcidio o matanza masculina: muerte de las larvas o de los embriones masculinos, lo cual puede repercutir en una mayor disponibilidad de nutrientes para la progenie femenina sobreviviente; ii) feminización: la reproducción sexual persiste, pero aquellos individuos que se desarrollarían como machos en condiciones normales, lo hacen como hembras; iii) incompatibilidad citoplasmática (IC): el esperma de los machos infectados causa la esterilidad de las hembras que no portan la infección; iv) partenogénesis telitóquica (PT): los huevos no fertilizados se desarrollan dando lugar a individuos del sexo femenino (Werren *et al.*, 2008). Esta última es una de las estrategias más eficaces de *Wolbachia*.

La partenogénesis es un tipo particular de reproducción en el que el huevo no fecundado se desarrolla dando lugar a una cría. En el caso de la PT, la progenie está compuesta exclusivamente por hembras. La inducción de PT por *Wolbachia* es una manipulación casi perfecta de la reproducción del hospedador: una hembra adulta infectada produce una progenie consistente solamente en hembras infectadas, que a su vez producirán más hembras infectadas. De este modo, si una hembra infectada produce más hijas que una hembra saludable, la infección se extenderá en la población, en tanto la transmisión de *Wolbachia* sea perfecta (Stouthamer *et al.*, 2010). En caso de transmisión imperfecta, se alcanzará un polimorfismo estable. A menudo, las infecciones recientes implican una transmisión imperfecta de la bacteria a la próxima generación, tal como lo demuestra la ocurrencia ocasional de machos en la avispa *Encarsia formosa* (Kraaijeveld *et al.*, 2011), aunque la tasa de transmisión de la infección puede evolucionar en tiempos increíblemente cortos (Weeks *et al.*, 2007).

Dentro de la única especie bacteriana *Wolbachia* se han informado cientos de linajes molecularmente distintos denominados cepas. Estas pueden distinguirse sobre la base de marcadores genéticos únicos o múltiples, algunos de los cuales han sido propuestos como estándares en un esquema de tipificación de secuencias multilocus conocido como MLST por sus siglas en inglés (*MultiLocus System Typing*) (Baldo *et al.*, 2006). Estas cepas se distribuyen en varios clados denominados supergrupos nombrados con las letras A-S (Lo *et al.*, 2002; Bordenstein & Rosengaus, 2005; Glowska *et al.*, 2015; Gerth & Bleidorn, 2017; Lefoulon *et al.*, 2020). Estos grandes grupos podrían en principio tomar el estatus de especie, lo cual es un tema de debate en curso (Ramírez-Puebla *et al.*, 2015; Gerth, 2016; Lindsey *et al.*, 2016; Bleidorn & Gerth, 2018). Las cepas de *Wolbachia* que se ubican en los supergrupos A y B, y en menor medida en E y F, están ampliamente distribuidas entre los artrópodos terrestres, y presuntamente actúan como parásitos reproductivos. Las cepas de los supergrupos C y D se encuentran restringidas a nematodos filariales en los que se sugiere que son mutualistas esenciales (Fenn & Blaxter, 2004). Los supergrupos restantes se limitan principalmente a clados de artrópodos específicos y más pequeños.

Esta amplia gama de hospedadores y diversidad filogenética se puede explicar a través de eventos de coespeciación y cambios de hospedador, procesos que aumentan el número de especies portadoras (Charleston & Perkins, 2006; Engelstädter & Fortuna, 2019). La coespeciación ocurre cuando el parásito simbiote se retiene en ambos linajes hijos luego de un evento de especiación del hospedador, lo que lleva a la divergencia del simbiote entre los linajes del hospedador (Hafner & Nadler, 1990; de Vienne *et al.*, 2013). En cuanto al proceso de cambio de hospedador, se ha propuesto una serie de cuatro pasos para explicarlo conceptualmente: (i) transferencia física de la bacteria a una hembra de una nueva especie; (ii) proliferación dentro de este nuevo hospedador; (iii) transmisión materna exitosa a su descendencia; y (iv) diseminación o propagación dentro de la nueva población hospedadora (Fig. 2).



Figura 2. Condiciones de *Wolbachia* y de sus hospedadores en cada paso del proceso de cambio de hospedador. Tomada de Sanaei *et al.*, (2020) con modificaciones.

La primera etapa puede tener lugar a través de un vector o directamente, por efecto de una exposición prolongada al ambiente extracelular (Breeuwer & Jacobs, 1996; Heath *et al.*, 1999; Cordaux *et al.*, 2001; Baldo *et al.*, 2008). Aunque *Wolbachia* está adaptada a un estilo de vida intracelular, puede estar en contacto con el ambiente mediante interacciones depredador-presa, interacciones hospedador-parasitoide/parásito o mediante las fuentes de alimentos del hospedador como podrían ser las plantas compartidas (Sicard *et al.*, 2014). Estas interacciones crean una oportunidad para la transmisión horizontal entre especies no cercanas (Gehrer & Vorburger 2012; Ahmed *et al.*, 2015), lo que llevó a *Wolbachia* a constituir la pandemia más grande desde el origen de la vida (Werren *et al.*, 2008).

Antes de llegar a las células de la línea germinal y experimentar una transmisión vertical exitosa, *Wolbachia* primero tiene que sobrevivir en su nuevo entorno. Una vez que coloniza un nuevo hospedador artrópodo, la bacteria puede escapar a las respuestas inmunitarias innatas tanto celulares como humorales a través de diversos mecanismos, como por ejemplo la

modificación de su propia pared celular a través de la síntesis de un peptidoglicano único para evitar su detección (Eleftherianos *et al.*, 2013; Wilmes *et al.*, 2017; Otten *et al.*, 2018). Además de los peptidoglicanos, los movimientos de célula a célula de *Wolbachia* (probablemente basados en la activación de la maquinaria endocítica fagocítica celular y dependiente de clatrina/dinamina) (White *et al.*, 2017), pueden causar estrés oxidativo en el hospedador y, en consecuencia, conducir a una diversa modificación en la regulación de los genes relacionados con la inmunidad (Caragata *et al.*, 2017). Al igual que otras  $\alpha$ -proteobacterias que son simbioses facultativas (como *Brucella* y *Anaplasma*), *Wolbachia* siempre se observa en la célula hospedadora dentro de una vacuola de triple capa, que puede protegerla en parte de las respuestas inmunitarias celulares (revisado en Sicard *et al.*, 2014). Tal escudo mecánico proporcionará una protección básica contra la respuesta inmunitaria del hospedador.

La transmisión efectiva de la infección a la descendencia del hospedador requiere que llegue a las células de la línea germinal y se mantenga en el cigoto. Esta capacidad de *Wolbachia* para iniciar la transmisión vertical puede deberse a su capacidad de ocupar el nicho de células madre somáticas inicialmente como reservorio estable antes de llegar a la línea germinal misma (Frydman *et al.*, 2006). Toomey *et al.* (2013) demostraron que la alta concentración de *Wolbachia* en las células madre somáticas no solo es un factor clave para la transmisión vertical sino también una característica conservada observada en diversas cepas de varias especies de *Drosophila*. A partir de las células madre somáticas, *Wolbachia* puede utilizar el sistema de transporte transovárico de vitelogenina del hospedador para ingresar al ovocito (Guo *et al.*, 2018). Una vez que las bacterias han entrado con éxito en el cigoto, necesitan llegar a tejidos importantes del hospedador (que incluyen, entre otros, las células madre de la línea germinal) sin interrumpir el desarrollo del embrión. Esto se puede lograr mediante la utilización del citoesqueleto del hospedador (Newton *et al.*, 2015; Sheehan *et al.*, 2016), así como también mediante el aumento de la tasa de división de las células madre de la línea germinal para localizar y mejorar su título (Fast *et al.*, 2011).

La transmisión materna en sí misma no implica ningún impulso epidemiológico: en ausencia de un aumento en el *fitness* de su hospedador, no se esperaría que *Wolbachia* aumentara en frecuencia. Incluso con una fidelidad de transmisión perfecta, *Wolbachia* sería simplemente equivalente a un nuevo alelo neutral, con posibilidades limitadas de propagación. Los efectos nocivos en el *fitness* y la transmisión imperfecta imponen restricciones adicionales a la propagación de *Wolbachia* dentro de una población. Por lo tanto, es probable que la invasión de una nueva población se deba a efectos fenotípicos específicos, incluidas las manipulaciones reproductivas mencionadas anteriormente y/o la provisión de beneficios de *fitness* directos para su hospedador (por ejemplo, la síntesis de nutrientes o protección contra patógenos, como se ha observado en algunas especies) (Werren, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999; Fenton *et al.*, 2011; Zug & Hammerstein, 2015).

Rodriguero *et al.* (2010) revelaron que algunas especies de gorgojos que pertenecen al complejo *Pantomorus-Naupactus* se encuentran infectadas con distintas cepas de *Wolbachia*. La correlación significativa entre el estado de infección con *Wolbachia* y la presencia de partenogénesis apoya la hipótesis de que *Wolbachia* podría estar involucrada en el origen de la reproducción unisexual en este grupo, siendo la PT una de las estrategias utilizadas por *Wolbachia* para aumentar su frecuencia en la población, como se mencionó más arriba. Mediante tipificación y análisis filogenéticos estos autores identificaron nueve cepas pertenecientes al supergrupo B, la mayoría estrechamente emparentadas y conformando un grupo monofilético, lo cual conduce a una hipótesis de evolución por coespeciación, mientras que unas pocas están dispersas en la filogenia de esta especie bacteriana. Este último resultado respalda la hipótesis de que la transferencia horizontal de *Wolbachia* entre especies de artrópodos no relacionadas es un fenómeno generalizado (O'Neill *et al.*, 1992; Werren *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998). Los posibles vectores de la transferencia dentro de los Naupactini podrían ser parasitoides y ácaros (Werren & Bartos, 2001) comúnmente asociados a estos gorgojos (De Santis, 1948; Loíacono, 1982; Lanteri *et al.*, 1998; Rodriguero *et al.*, 2014; Fernández Goya *et al.*, 2022).

Considerando que las infecciones con *Wolbachia* se pierden eventualmente (Bailly-Bechet *et al.*, 2017) y que existe evidencia de que con frecuencia las cepas se transmiten horizontalmente entre hospedadores (Baldo *et al.*, 2008), incluso aquellas estrechamente relacionadas (e.g. Schilthuizen & Stouthamer, 1997), surge una pregunta en el contexto del complejo *Pantomorus-Naupactus*: ¿La asociación entre modo reproductivo y estatus de infección con *Wolbachia* detectada por Rodriguero *et al.* (2010) es una consecuencia de la especiación conjunta de parásitos y hospedadores (coespeciación), o es el resultado de múltiples eventos de transferencia horizontal, como frecuentemente se ha reportado para este microorganismo? Bajo estas consideraciones, una compleja historia de eventos podría haber moldeado la distribución de este parásito reproductivo en este grupo de hospedadores, lo que motiva el presente estudio.

## 2-HIPÓTESIS Y PREDICCIÓN

Hipótesis: la infección con *Wolbachia* en el complejo *Pantomorus-Naupactus* de la tribu Naupactini evolucionó fundamentalmente a través de eventos de transferencia horizontal.

Predicción: debido a que las relaciones filogenéticas de las cepas de *Wolbachia* no van a ser una imagen especular de las relaciones filogenéticas de las especies hospedadoras, no se observará un patrón de coespeciación estricto.

## 3-OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Estudiar la coevolución entre *Wolbachia* y el complejo taxonómico *Pantomorus-Naupactus* a fin de dilucidar si las cepas que infectan a este gorgojo se han adquirido independientemente o son el resultado de eventos de coespeciación (i.e. especiación conjunta hospedador-parásito).

### 3.2 Objetivos específicos

- Reconstruir la filogenia de *Wolbachia* a partir de las secuencias concatenadas de los cinco genes utilizados para caracterizar las cepas bacterianas que infectan a 26 especies de gorgojos del complejo taxonómico *Pantomorus-Naupactus*.
- Reconstruir la filogenia del complejo *Pantomorus-Naupactus* utilizando datos de secuencias mitocondriales y morfológicos.

Realizar un estudio cofilogenético de la asociación entre *Wolbachia* y el complejo de gorgojos *Pantomorus-Naupactus* a través de métodos de ajuste global y basados en eventos.

## 4-MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Análisis filogenético de *Wolbachia*

Se utilizaron las secuencias de los cinco genes que constituyen el genotipo multilocus para cada cepa según lo tipificado por Rodríguez *et al.* (2010) de acuerdo al método estándar para la discriminación de cepas de *Wolbachia* conocido como MLST (Baldo *et al.*, 2006) (cepas wNau1 – wNau9), y se añadieron algunos datos inéditos bajo la autoría de Marcela Rodríguez (MSR) (cepas wNau10 y wNau14). Dichas secuencias corresponden a fragmentos de los siguientes genes: subunidad I de la enzima citocromo oxidasa (*coxA*), la enzima fructosa-bisfosfatoaldolasa (*fbpA*), una proteína del ciclo celular *ftsZ* (*ftsZ*), la enzima glutamiltRNA subunidad B de amidotransferasa (*gatB*) y un fragmento de una proteína hipotética conservada (*hcpa*). Estas se hallan depositadas en una base de datos pública para tipificación molecular y para la diversidad genómica microbiana (<https://pubmlst.org/organisms/wolbachia-spp/>) (Jolley *et al.*, 2018), y desde allí fueron descargadas según los perfiles alélicos consignados en la Tabla 1. Se dispuso entonces de once genotipos multilocus pertenecientes a las cepas de *Wolbachia* residentes en 26 especies o subespecies de gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus*. A partir de la Tabla 1 puede inferirse que existen

cepas multihospedadoras como wNau1, wNau3, wNau5 o wNau7. Se verificó la presencia de estas cepas en otros artrópodos infectados mediante búsquedas exhaustivas en la base de datos mencionada.

Espece de gorgojo	Cepa de <i>Wolbachia</i>	<i>coxA</i>	<i>fbpA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>gatB</i>	<i>hcpA</i>
<i>Aramigus conirostris</i>	wNau1	14	181	96	9	13
<i>Aramigus tessellatus pallidus</i>	wNau2	106	183	96	9	15
<i>Aramigus tessellatus santafecinus</i>	wNau10	114	192	A	9	135
<i>Aramigus tessellatus tessellatus</i>	wNau3	14	183	96	9	15
<i>Floresianus sordidus</i>	wNau7	14	14	96	9	15
<i>Atrichonotus taeniatulus</i>	wNau1	14	181	96	9	13
<i>Eurymetopus fallax</i>	wNau1	14	181	96	9	13
<i>Eurymetopus globosus</i>	wNau1	14	181	96	9	13
<i>Lanterius inermis</i>	wNau4	107	132	97	79	124
<i>Naupactus cervinus FC</i>	wNau5	14	9	96	127	126
<i>Naupactus cervinus GC</i>	wNau5	14	9	96	127	126
<i>Naupactus cervinus CS</i>	wNau5	14	9	96	127	126
<i>Naupactus condecoratus</i>	wNau6	14	185	96	?	?
<i>Naupactus dissimilis</i>	wNau7	14	14	96	9	15
<i>Naupactus leucoloma</i>	wNau7	14	14	96	9	15
<i>Naupactus minor</i>	wNau1	14	181	96	9	13
<i>Naupactus peregrinus</i>	wNau8	14	184	?	9	15
<i>Naupactus purpureoviolaceus</i>	wNau1	14	181	96	9	13
<i>Naupactus tremolerasi</i>	wNau1?	14	181	?	9	13
<i>Naupactus tucumanensis</i>	wNau14	14	B	?	C	D
<i>Naupactus verecundus</i>	wNau7	14	14	96	9	15
<i>Naupactus versatilis</i>	wNau1?	14	181	?	9	13
<i>Pantomorus auripes</i>	wNau3	14	183	96	9	15
<i>Pantomorus cinerosus</i>	wNau9	14	182	96	9	15
<i>Pantomorus postfasciatus</i>	wNau1	14	181	96	9	13
<i>Pantomorus viridisquamosus</i>	wNau1	14	181	96	9	13

Tabla 1. Perfiles alélicos de las cepas de *Wolbachia* de *Pantomorus-Naupactus* nombradas en forma genérica como wNau. Los datos faltantes se indican por medio de “?”. Las cepas con datos faltantes wNau6, wNau8 y wNau14 se incluyeron en el análisis filogenético con sus genotipos multilocus parciales y se las nombró como nuevas cepas porque tienen al menos un alelo diferente para algún/os gen/es analizados, ajustándose así al criterio vigente para nombrar nuevas cepas (Baldo *et al.*, 2006). A los alelos novedosos aun no ingresados en la base de datos de genotipos multilocus de *Wolbachia* se les asignaron letras mayúsculas hasta su depósito en forma definitiva. Dado que el alelo *fbpA* funciona como un código de barras de *Wolbachia* para las cepas de Naupactini (Rodríguez *et al.*, 2010; da Cruz Cabral *et al.*, 2020), algunas cepas se asignaron tentativamente aun cuando la tipificación estuviera incompleta para genes altamente conservados como el *ftsZ*; en ese caso la cepa se asignó con signo de interrogación (?) para denotar esa incerteza. Tomada de Rodríguez *et al.* (2010), con modificaciones.

Para reconstruir la filogenia de las cepas que infectan a los gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus*, las secuencias se visualizaron en BIOEDIT 7.0.5.3 (Hall, 1999) y el alineamiento se llevó a cabo con ClustalW (Thompson, 1994). Ante la carencia de una raíz adecuada (Bordenstein *et al.*, 2009), la cepa *wZang\_H* se utilizó arbitrariamente como grupo externo funcional (ver Rodríguez *et al.*, 2010).

Primeramente, se efectuó una estimación de las relaciones filogenéticas a fin de determinar el supergrupo al cual pertenecen las cepas inéditas *wNau10* y *wNau14*, para lo cual se incluyeron secuencias pertenecientes a todos los supergrupos disponibles en la base de datos, incluyendo las cepas pertenecientes a otros miembros de Curculionidae. Se utilizó un enfoque bayesiano (IB) utilizando MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Los modelos de evolución para cada gen se seleccionaron con el programa MrmodelTest 2 (Nylander, 2004). Con esta herramienta se realizó una selección estadística de los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaron a los datos en consideración, los cuales resultaron ser HKY para *gatB*, HKY+I para *hcpA*, GTR para *coxA* y *ftsZ* y GTR+G para *fbpA*. La matriz consistió en 87 terminales y 2079 caracteres nucleotídicos de los cuales 402 pb corresponden a *coxA*, 429 pb corresponden a *fbpA*, 435 pb corresponden a *ftsZ*, 369 pb corresponden a *gatB* y 444 pb corresponden al gen *hcpA*.

Se corrieron dos análisis independientes a partir de sendos árboles aleatorios a lo largo de 5 millones de generaciones, con una frecuencia de muestreo de 500 generaciones. El espacio de árboles fue explorado usando 4 cadenas de Markov Montecarlo: una fría y 3 calientes. Se descartaron los primeros 1.000 árboles como *burn-in*. La convergencia de la corrida se diagnosticó a partir de la desviación de las frecuencias de partición de los clados y por medio del programa Tracer 1.7 (Rambaut *et al.*, 2018). Se ejecutaron alineaciones concatenadas y particionadas de modo que el modelo específico de evolución correspondiera a cada fragmento de gen. La muestra de árboles producida por MrBayes se utilizó para construir una distribución posterior de probabilidades y esta información se resumió en un único árbol de máxima credibilidad a través de un árbol consenso de mayoría que se visualizó

en FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2009). Las medidas de soporte de los nodos se obtuvieron mediante la estimación de sus probabilidades posteriores. Estos valores suelen ser más altos que los obtenidos por máxima verosimilitud (Erixon *et al.*, 2003); es por ello que además se evaluó la estabilidad de cada clado mediante 100 réplicas de soporte de *bootstrap*, obtenido a partir de una corrida de Máxima Verosimilitud ejecutada a través de PhyML 3.0 (<http://www.atgcmontpellier.fr/phyml/>) (Guindon *et al.*, 2010). Los resultados se visualizaron con FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2009).

A fin de realizar el análisis cofilogenético, seguidamente se procedió a reconstruir la filogenia de las cepas restringidas a Naupactini. En este caso, a modo de raíz y por lo que se explicó anteriormente, se adicionaron al conjunto de datos las cepas *wZang\_H*, perteneciente al supergrupo H y que infecta al colémbolo *Zootermes angusticollis*, *wAlbA*, perteneciente al supergrupo A y que infecta al mosquito *Aedes albopictus*, *wClec\_F*, perteneciente al grupo F y que infecta a la chinche *Cimex lectularius* y *wBmal\_D*, perteneciente al supergrupo D y que infecta a la filaria *Brugia malayi*. Como antes, la cepa *wZang\_H* se utilizó arbitrariamente como grupo externo funcional (ver Rodríguez *et al.*, 2010). En la Tabla 2 se consignan los perfiles alélicos para dichas cepas.

Cepa	Supergrupo	gatB	coxA	hcpA	ftsZ	fbpA	Hospedador
<i>wAlbA</i>	A	3	2	2	10	3	<i>Aedes albopictus</i>
<i>Zang_H</i>	H	64	54	71	57	69	<i>Zootermes angusticollis</i>
<i>Bmal_D</i>	D	28	29	33	26	30	<i>Brugia malayi</i>
<i>Clec_F</i>	F	26	27	31	24	28	<i>Cimex lectularius</i>

Tabla 2. Perfiles alélicos para las cepas *wAlbA*, *wClec\_F*, *wBmal\_D* y *wZang\_H*.

Como antes, se corrieron dos análisis independientes a partir de sendos árboles aleatorios a lo largo de 500.000 generaciones, con una frecuencia de muestreo de 50. El espacio de árboles fue explorado usando 4 cadenas: una fría y 3 calientes. Se descartaron los primeros 1.000 árboles como *burn-in*. La convergencia de la corrida se diagnosticó como se indicó previamente, al igual que la presentación del resultado.

#### 4.2 Análisis filogenético de *Pantomorus-Naupactus*

Se contó con una matriz morfológica de 45 caracteres de adultos de 31 especies y subespecies de gorgojos (las 26 infectadas con *Wolbachia*, 4 no infectadas y un grupo externo), incluyendo las unidades evolutivas recientemente reportadas para la especie nominal *Naupactus. cervinus* Boheman (Rodríguez *et al.*, 2013) y *Pantomorus postfasciatus* Hustache (Elias-Costa *et al.*, 2019) (ver matriz y lista de caracteres en Anexo I). Asimismo, se contó con una matriz de caracteres moleculares de 763 pb que incluye un fragmento de las secuencias mitocondriales del gen *citocromo oxidasa I* (COI) (números de acceso a GenBank: MH537910, MH537914, MH537917, MH537919, MH537922, MH537926-32, MH537935-40, AY790878, AY790880-81, AY770383-84, AY770386, AY770388, JX440494, AF211490, GQ406839, GQ406841, GU727685; secuencia de *E. globosus* cedida por MSR).

Los conjuntos de datos morfológicos y moleculares se analizaron de manera combinada (análisis de evidencia total), utilizando IB y máxima parsimonia (MP). Para el análisis de MP se aplicó una búsqueda heurística “*traditional search*”, utilizando TNT v1.5 (Goloboff & Catalano, 2016). Para este análisis los caracteres fueron tratados como desordenados o no aditivos. Se usaron 300 réplicas (*mult*) (con “*random seed*”: 1), guardando 20 árboles por cada ronda (*hold*). Para modificar los árboles de Wagner y de esta manera obtener árboles más cortos se utilizó el método TBR (*tree bisection and reconnection*). Las búsquedas se realizaron bajo dos escenarios, pesos iguales y pesos implicados (el cual les otorga mayor peso a los caracteres menos homoplásicos), utilizando diferentes valores de concavidad (K1, 5, 6, 10, 15, 20), correspondiendo a menor valor de K, mayor intensidad del pesado. Todos los caracteres fueron tratados como desordenados (optimización de Fitch). Los valores de soporte de cada nodo fueron evaluados por pruebas estadísticas: Bootstrap y Symmetric Resampling (p=33) mediante el programa TNT, con una probabilidad de 0,36, realizando 1000 pseudoréplicas, con una búsqueda heurística usando 10 réplicas, guardando 10 árboles, y con el uso de TBR (Goloboff, *et al.*, 2004).

Para IB se utilizó MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Para el conjunto de datos moleculares la selección del modelo de sustitución óptimo se procedió como ya se mencionó anteriormente, obteniéndose el modelo de sustitución nucleotídica GTR + I +G. Para el conjunto de datos morfológicos se utilizó el modelo discreto “standard”, basado en las ideas originalmente presentadas por Lewis (2001), que asume que todos los estados tienen la misma frecuencia, que todas las transiciones entre los diferentes estados ocurren a la misma tasa y además permite tener en cuenta que algunas ramas del árbol pueden ser más largas que otras

. Para el análisis de evidencia total (i.e. molecular + morfológico) se utilizó un esquema de particiones. Se corrieron dos análisis independientes por un total de 500 mil generaciones con una frecuencia de muestro de 50 generaciones y explorando el espacio de árboles con 1 cadena fría y 3 calientes, descartando los primeros 500 árboles como *burn-in*. El diagnóstico de la convergencia de la corrida y el soporte de nodos se evaluaron como se explicó anteriormente.

Los árboles obtenidos a partir de ambos análisis fueron enraizados con *Cyrtomon inhalatus* (Boheman).

#### 4.3 Análisis cofilogenético

En base a las filogenias obtenidas a partir de los análisis anteriores, se estudió la historia evolutiva entre *Wolbachia* y los gorgojos hospedadores mediante métodos cofilogenéticos de ajuste global y basados en eventos. Los primeros se aplicaron con el objetivo de cuantificar el grado de congruencia entre dos topologías dadas e identificar las asociaciones que contribuyen a la estructura cofilogenética; y el último a fin de encontrar los eventos que dieron lugar a la historia coevolutiva más probable de los taxones asociados. Los algoritmos que se detallarán a continuación fueron elegidos porque permiten evaluar cantidades desiguales de parásitos y hospedadores, incluyendo parásitos multihospedadores.

#### 4.3.1.- Métodos de ajuste global.

##### 4.3.1.1.- ParaFit

Se empleó el algoritmo ParaFit (Legendre *et al.*, 2002), en el entorno R versión 4.3.0 (R Core Team, 2023) ejecutado a través de RStudio (R Core Team, 2020) y usando el paquete *ape* (Paradis *et al.*, 2004), para evaluar si la posición topológica de los parásitos en el árbol es independiente de la posición topológica de los hospedadores asociados (Fig. 4). La correspondiente hipótesis nula ( $H_0$ ) indica que la evolución de los grupos parásito-hospedador (P-H) ha sido independiente, lo que significa que la filogenia de uno es aleatoria respecto de la filogenia del otro.

En general, los estudios cofilogenéticos se han concentrado en parásitos específicos del hospedador, ya que las especies de parásitos con múltiples hospedadores son problemáticas para los análisis (Johnson *et al.*, 2003). Aunque estos últimos reducen la congruencia entre las filogenias del hospedador y del parásito (Johnson & Clayton, 2003), aún pueden contribuir a la asociación por descendencia. En esta prueba se utilizó el estadístico ParaFitLink1 para definir la contribución de cada asociación parásito-hospedador al ajuste global observado, ya que este algoritmo tiene mayor poder para detectar aquellas asociaciones que contribuyen significativamente a la coevolución H-P y es apropiado para evaluar especies de parásitos multihospedadoras (Legendre *et al.*, 2002).

Para evaluar estadísticamente la hipótesis de coevolución H-P se combinaron tres tipos de información que son conjuntamente necesarios para describir la situación: la filogenia de *Wolbachia*, la filogenia de los hospedadores y las asociaciones H-P observadas (Fig. 3). Una filogenia puede describirse mediante una matriz de distancias patrísticas entre las especies a lo largo del árbol (Lapointe & Legendre, 1992), y estas se transforman en matrices de coordenadas principales que tienen  $n$  filas y como máximo  $n-1$  columnas. Las matrices B y C de la Fig. 3 se obtuvieron de esta manera y representan respectivamente la filogenia de los parásitos y la de los hospedadores. La matriz A representa las asociaciones H-P, con los parásitos en las filas y los hospedadores en las columnas; se asigna un 1 donde se ha

encontrado empíricamente que un parásito está asociado a un hospedador y el 0 se usa donde no se lo encontró.

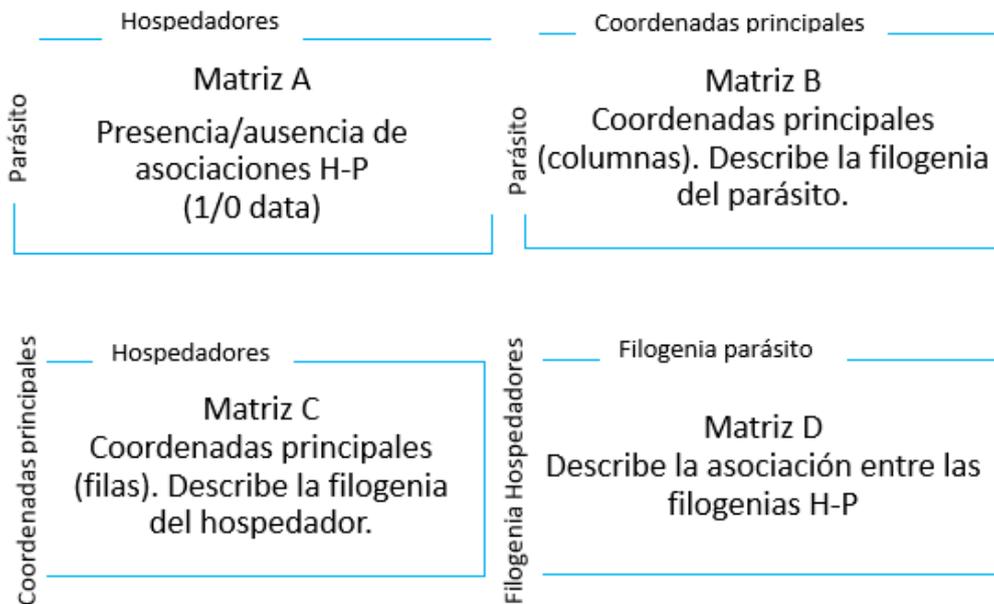


Figura 3. Elementos para estudiar la coevolución traducidos a matrices de datos. Dada la información en las matrices A, B y C, se deben estimar los parámetros en la matriz D que combina las coordenadas principales de los hospedadores con las de los parásitos. Tomada de Legendre *et al.* (2002), modificado.

La matriz del hospedador se transpone y luego las tres matrices (la matriz de los hospedadores transpuesta, las asociaciones H-P y la matriz de los parásitos) se combinan en una nueva, que es el punto de partida para obtener una medida estadística global de bondad de ajuste de la congruencia entre los dos árboles. El estadístico de prueba arroja un valor de probabilidad (p-valor), el cual indica la probabilidad de que los datos correspondan a la

hipótesis nula (con un intervalo de confianza del 95% y un  $\alpha=0.05$ ).

```
# cargar los paquetes y datos requeridos
library (ape)
data (dataHP) #matriz de correspondencia

#transformar las filogenias a matrices de distancia

TreeH <- read.tree("host_tree.tre")

TreeP <- read.tree("parasite_tree.tre")

hdist<-cophenetic(TreeH)

pdist<-cophenetic(TreeP)

# leer la matriz de correspondencia

HPlinks<-dataHP

#hacer análisis cofilogenético

res <- parafit(ndist, wdist, HPlinks, nperm=99, correction="cailliez",
test.links=TRUE)

res
```

Figura 4. La metodología paso a paso (o “script”) para realizar análisis cofilogenéticos con el algoritmo *parafit* mediante el paquete *ape*.

#### 4.3.1.2.- PACo

Se utilizó el método PACo (*Procrustes Application to Cophylogenetic Analysis*) (Balbuena *et al.*, 2013) para explorar la congruencia filogenética de las especies que interactúan y obtener una comparación gráfica del ajuste de las asociaciones hospedador-parásito en el entorno R versión 4.3.0 (R Core Team, 2023) ejecutado a través de RStudio (R Core Team, 2020) y usando los paquetes *paco* (Balbuena *et al.*, 2020) y *ape* (Paradis *et al.*, 2004).

Para realizar un análisis cofilogenético con PACo se necesitan tres tipos de datos: en primer lugar, matrices de disimilitud (es decir, aquellas basadas en las distancias patrísticas de cada grupo en función de sus respectivas filogenias) para cada grupo de interés: una para los hospedadores (matriz H) y otra para *Wolbachia* (matriz P). En segundo lugar, se requiere una matriz

binaria que describa las asociaciones entre los dos grupos para la superposición adecuada (Fig. 5).

```
# insertar los paquetes y datos requeridos
library (paco)
library (ape)
data (matriz de correspondencia)
#transformar las filogenias a matrices de distancia

TreeH <- read.tree("host_tree.tre")

TreeP <- read.tree("parasite_tree.tre")

hdist<-cophenetic(TreeH)

pdist<-cophenetic(TreeP)

# leer la matriz de correspondencia

HPlinks<-dataHP

# agrupar los datos y generar las Coordenadas Principales
D <-prepare_paco_data (H=hdist, P=pdist, HP=HP_links)
D <-add_pcoord (D, correction="cailliez")
# hacer análisis cofilogenético
D <-PACo (D, nperm=1000, seed=12, method="r0", symmetric=FALSE)
# recuperar las contribuciones cofilogenéticas interacción-específicas
basadas en jackknife
E<-paco_links (D)
# recuperar las contribuciones cofilogenéticas interacción-específicas en
términos de la superposición de los residuos individuales
res <-residuals_paco(D$proc)
```

Figura 5. La metodología paso a paso (o “script”) para realizar análisis cofilogenéticos con el paquete paco. Inicializar los datos requiere construir matrices de distancia (es decir, encontrar las distancias patrísticas de cada grupo en función de su filogenia con la función `ape::cophenetic`). Después de asignar el orden de superposición y agrupar los datos (matrices de distancias filogenéticas y matriz de asociaciones) en `paco::prepare_paco_data`, el análisis de coordenadas principales de estas tres matrices se realiza en `paco::add_pcoord` con la corrección adecuada de los valores propios negativos. En `paco::PACo` se realiza una Aproximación Procrustea a la cofilogenia, y finalmente se puede devolver la contribución de las asociaciones individuales con `paco::paco_links` o `paco::residuals_paco`. Para cada paso del proceso, los resultados se concatenan en el objeto 'D', una lista de la clase 'paco'.

Los datos se proyectaron inicialmente en un espacio multivariado a través del análisis de coordenadas principales en `paco::add_pcoord`, donde los puntos (especies) se asocian en función de las interacciones observadas entre ellos. Estas matrices luego se sometieron a una superposición de Procrustes en `paco::PACo` donde el nivel de la señal cofilogenética se tomó como la suma

global de los residuos cuadrados en la superposición de mejor ajuste de las dos filogenias (Balbuena *et al.*, 2013). Finalmente, la contribución de las interacciones individuales a la señal cofilogenética general se pudieron explorar con `paco:residuals_paco` o `paco:paco_links`.

El código para el análisis de la congruencia filogenética se dividió en distintos pasos funcionales (Tabla 3). Finalmente, PACo amplía el análisis de asociaciones individuales con la implementación paralela de la función `paco_links` y una nueva función `residuals_paco` que permite evaluar la contribución de cada asociación hospedador - parásito individual al ajuste global.

<b>Función</b>	<b>Descripción</b>
<code>prepare_paco_data ()</code>	Asigna el orden de superposición donde P se superpone a H. También verifica que la matriz de interacción y las respectivas matrices filogenéticas sean adecuadas para el análisis PACo.
<code>add_pcoord ()</code>	Realiza un análisis de coordenadas principales a partir de las matrices de distancias filogenéticas.
<code>PACo ()</code>	Realiza el análisis cofilogenético a partir de la superposición de mejor ajuste de las dos filogenias.
<code>paco_links ()</code>	Devuelve la contribución de las interacciones individuales al análisis cofilogenético global.

*residuals\_paco* ()

Ajusta la contribución de las interacciones individuales al análisis cofilogenético global en términos de los residuos sin procesar de la superposición de Procrustes.

Tabla 3: Funciones de paco y su descripción.

El análisis cofilogenético se llevó a cabo bajo el supuesto de que el grupo de columnas sigue la evolución del grupo de filas. Los posibles algoritmos permiten modelos nulos binarios que conservan el número total de interacciones ( $r00$ ), la distribución de grados (número de interacciones por especie) de cualquier grupo de filas ( $r0$ ), grupo de columnas ( $c0$ ) o ambos grupos.

Para evitar que se produzcan valores propios negativos que no se pueden representar en el espacio real en el que opera paco, se aplicó una corrección de valores propios como argumento de corrección a `paco::add_pcoord`. Se utilizó la corrección 'cailliez' (Cailliez 1983) para corregir los valores propios negativos con la adición de una constante (Paradis *et al.*, 2004).

#### 4.3.2.- Métodos basados en eventos

##### 4.3.2.1.- Jane

La reconstrucción cofilogenética se llevó a cabo mediante el programa Jane versión 4.0 (Conow *et al.*, 2010), con el cual se compararon los árboles filogenéticos de los parásitos y de los hospedadores a través de esquemas de costos para cada tipo de evento (e.g. transferencia horizontal de *Wolbachia* y coespeciación). En este enfoque, cada evento en la filogenia del parásito se mapea en el árbol del hospedador buscando un esquema que minimice el costo total con respecto a una métrica de costo determinada. Estos mapeos permitieron examinar conjuntos de eventos que pueden haber llevado a la coevolución de los hospedadores y de los parásitos y son la base de las pruebas estadísticas para evaluar la congruencia.

Jane 4.0 permitió explorar eventos de coespeciación, duplicación, duplicación seguida del cambio de hospedador, extinción y falta de divergencia (o inercia cofilogenética). Este programa puede generar una gran cantidad de escenarios posibles con el objetivo de reducir el costo total de la reconstrucción. Dado que la asignación de costos precisos para cada evento evolutivo (coespeciación, duplicación y cambio de hospedador) es difícil, se utilizaron los valores de costos por defecto: 0, 1 y 2 respectivamente para cada evento. El número de soluciones diferentes en cada iteración se fijó en 30 y el número de iteraciones realizadas por el algoritmo se fijó en 100. La significancia estadística del costo total para cada esquema de costos se probó utilizando una distribución nula basada en 500 árboles generados aleatoriamente. Si los costos totales resultaran significativamente más bajos que los asumidos bajo la distribución nula, entonces se detectaría una señal de coespeciación global bajo el régimen de costos especificado.

Las soluciones obtenidas por Jane están agrupadas en soluciones isomórficas, es decir, en un conjunto de soluciones que resultan en los mismos eventos evolutivos, pero que difieren en el espacio temporal ya que cambia la longitud de las ramas de los árboles. Jane asigna un valor de soporte a cada evento evolutivo que aparece en una determinada posición en el árbol del parásito. Este valor de soporte se calcula como el porcentaje de veces que un evento dado aparece en una misma posición entre todas las soluciones encontradas. Por lo tanto, se seleccionó aquella solución con los valores de soporte más altos en la mayoría de los eventos.

## 5-RESULTADOS

### 5.1 Análisis filogenético de *Wolbachia pipientis*

Se determinó la posición filogenética de las cepas wNau10 y wNau14 cuya ubicación en la filogenia de *Wolbachia* se desconocía (Fig. 6).

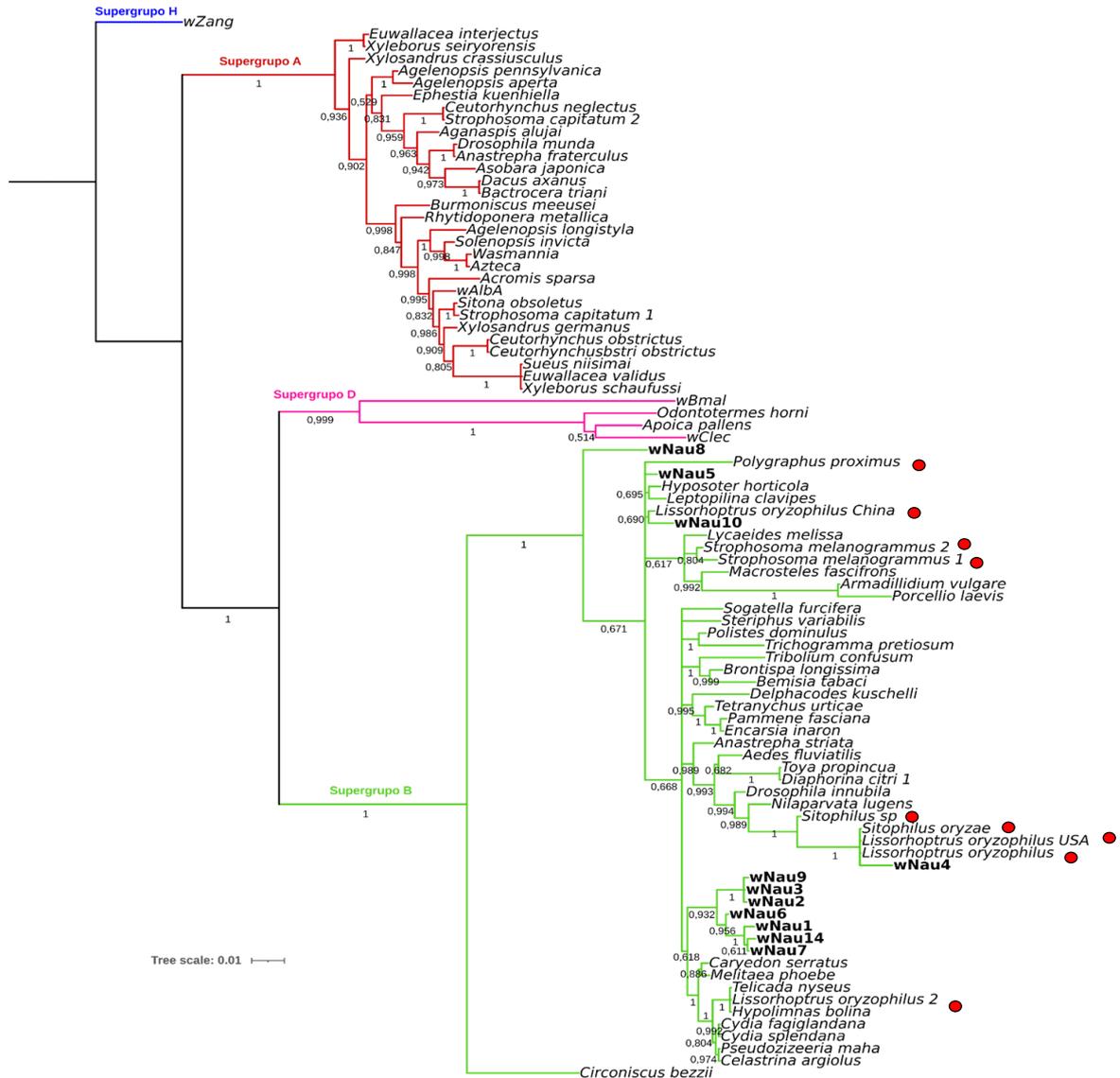


Figura 6. Posición filogenética de las 11 cepas de *Wolbachia* encontradas en el complejo *Pantomorus-Naupactus* de la tribu Naupactini, a partir de un análisis basado en la caracterización MLST de las secuencias. Las cepas del supergrupo B pertenecientes a otros miembros de Curculionidae se señalan con un círculo rojo. Los números debajo de las ramas indican la probabilidad posterior y la escala indica el número de sustituciones por sitio (los valores de bootstrap no se reportaron por inconsistencias en las topologías obtenidas a partir de los dos métodos implementados).

Al igual que las cepas wNau1-wNau9, tanto wNau10 como wNau14 pertenecen al supergrupo B. Se infiere una cercanía filogenética entre muchas de las cepas que infectan al complejo *Pantomorus-Naupactus* con algunas que infectan a otras especies de gorgojos tales como *Lissorhoptrus oryzophilus* Kuschel y *Sitophilus oryzae* (L.). El presente trabajo indica que se trata de un grupo polifilético, y si bien existen niveles de divergencia variables entre las cepas en consideración, algunas de ellas (wNau1, wNau2, wNau3, wNau6,

wNAu7, wNAu9 y wNAu14) se encuentran estrechamente emparentadas, formando un grupo monofilético (Fig. 6).

Este resultado justificó la realización de un análisis cofilogenético, puesto que las cepas que integran el grupo monofilético mencionado podrían haber coespeciado con sus hospedadores. Para ello, se reconstruyó la filogenia de las cepas que solo infectan a los gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus*. El resultado de este análisis muestra que todas las cepas de *Pantomorus-Naupactus* son recuperadas como un grupo monofilético, y dentro del mismo las cepas wNau1, wNau2, wNau3, wNau 6, wNAu7 wNau9y wNau14 se agrupan con muy buen soporte para esta reconstrucción (Fig. 7), coincidentemente con el análisis anterior. En ambos análisis puede observarse que la cepa wNau8 es la más divergente.

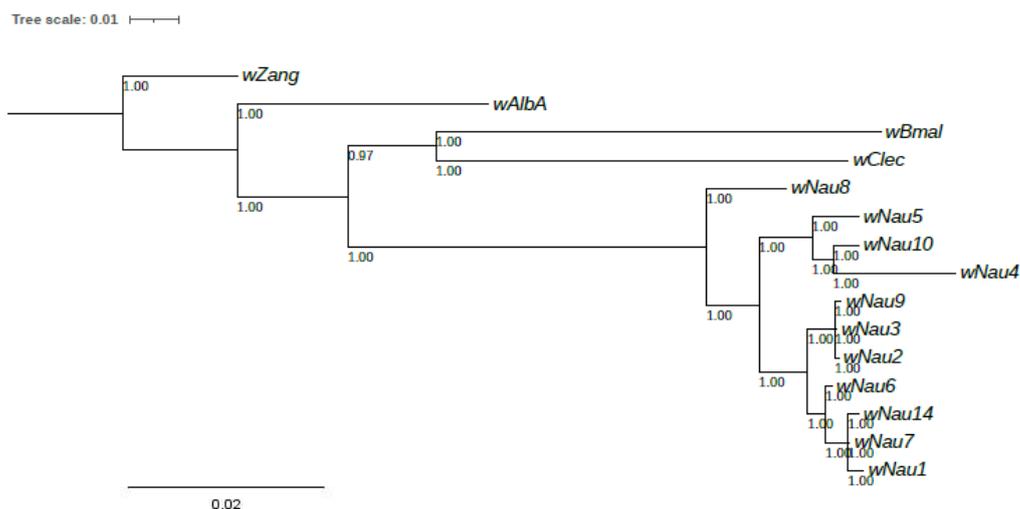


Figura 7. Filogenia de las cepas de *Wolbachia* encontradas en *Pantomorus-Naupactus* basada en las secuencias concatenadas de los cinco genes utilizados para la tipificación de este género bacteriano. Debajo de cada nodo: probabilidad posterior. La escala representa la cantidad de sustituciones por sitio.

## 5.2 Análisis filogenético del hospedador

### 5.2.1 Análisis bayesiano:

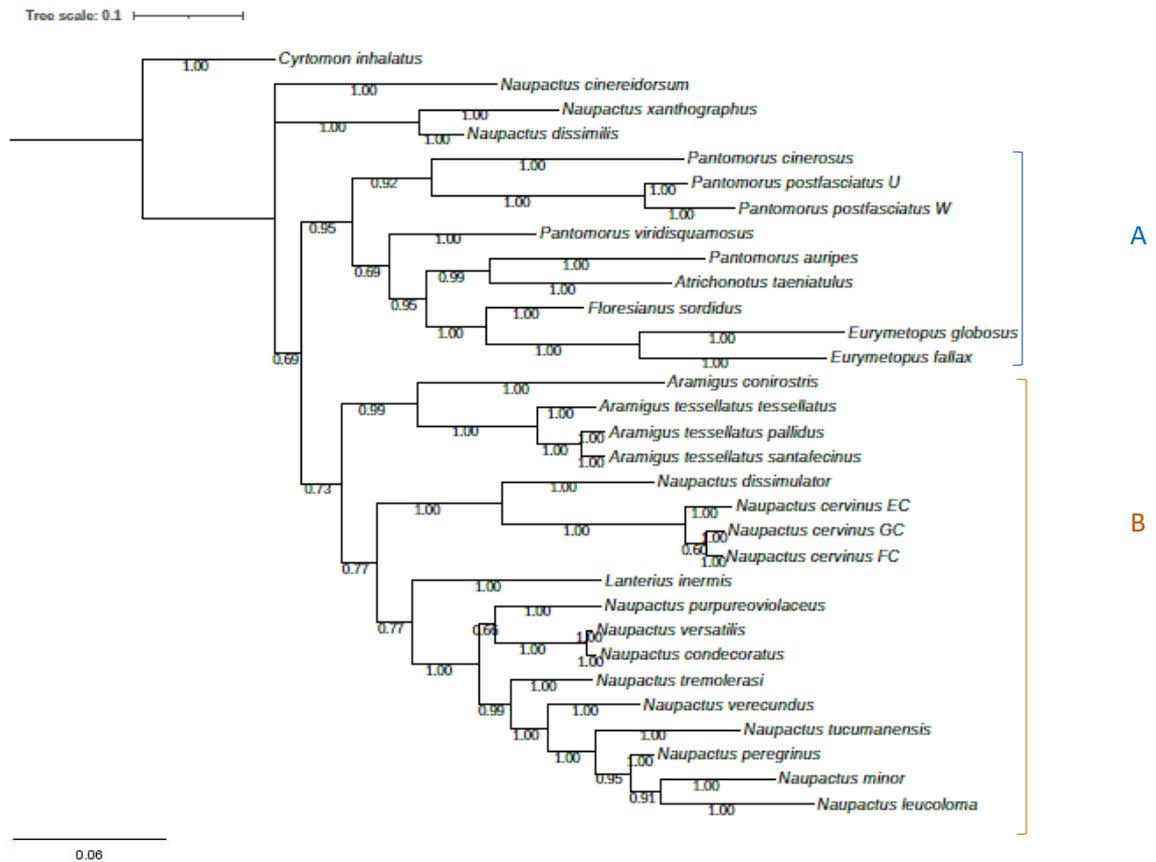


Figura 8. Filogenia obtenida por IB de los gorgojos pertenecientes al complejo *Pantomorus-Naupactus* en base a secuencias del ADN mitocondrial y 45 caracteres morfológicos (análisis de evidencia total). Debajo de cada nodo: probabilidad posterior. La escala representa la cantidad de sustituciones por sitio.

La reconstrucción filogenética de la Fig. 8 muestra que las especies de la tribu Naupactini se agrupan de manera tal que se recuperan dos grandes clados (clado "A" y clado "B") bien soportados y, además, los agrupamientos que se forman dentro de estos también cuentan con un buen soporte. Las especies *Naupactus cinereidorsum*, *Naupactus dissimilis* y *Naupactus xanthographus* presentan una posición incierta, formando una politomía. Cabe mencionar que los géneros *Naupactus* y *Pantomorus* no se recuperan como monofiléticos en el análisis.

## 5.2.2 Análisis por Máxima Parsimonia:

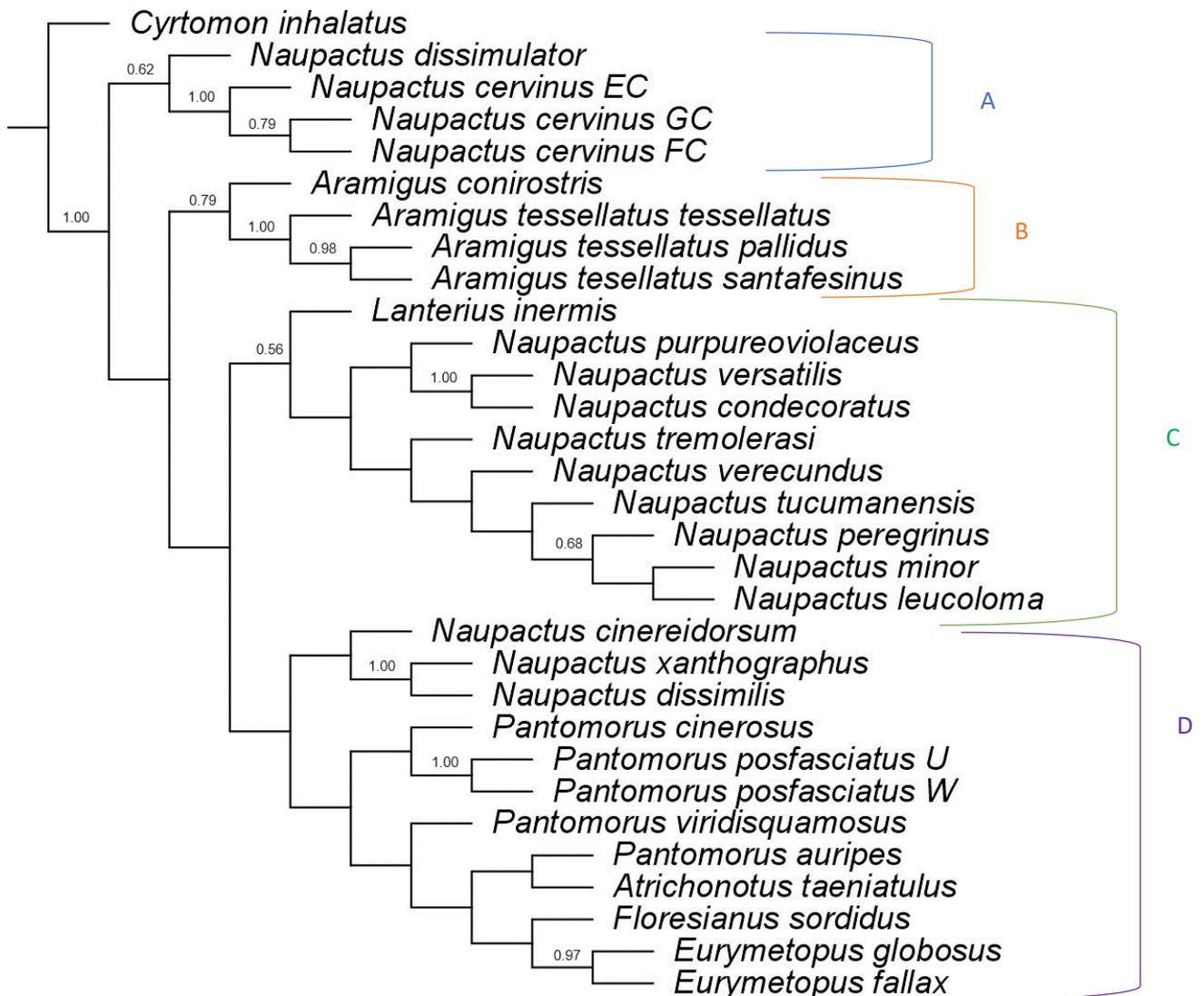


Figura 9. Cladograma obtenido por MP de 31 especies de gorgojos pertenecientes al complejo *Pantomorus-Naupactus* en base a secuencias del ADN mitocondrial y 45 caracteres morfológicos (análisis de evidencia total) con  $k=6$ ;  $mult=300$  y  $hold=20$ . Arriba de cada nodo: valor de soporte de *bootstrap*.

De los diversos análisis realizados por MP con diferentes escenarios de pesado, todos recuperaron los principales grupos y presentaron una topología similar (datos no mostrados). Se seleccionó el resultado basado en pesos implicados con  $K=6$ , ya que resultaba en un árbol que maximizaba los valores de soporte de las ramas. El cladograma resultante muestra que las especies del complejo *Pantomorus-Naupactus* se agrupan de manera tal que se

conforman cuatro grandes clados, tres de los cuales (A-C) presentan buen soporte (Fig. 9). Este resultado es parcialmente coincidente y congruente con el resultado obtenido por IB, en el cual se recuperan los principales agrupamientos: un clado formado por especies del género *Pantomorus* y géneros afines como *Atrichonotus*, *Floresianus* y *Eurymetopus* (Clado A de IB); y un clado formado por la mayoría de las especies de *Naupactus* y *Lanterius* (clado B de IB). En este caso, el árbol se resolvió de manera tal que no se observa politomía alguna.

Si bien se notan algunas diferencias entre los algoritmos de reconstrucción, los grandes grupos se mantienen, variando las posiciones de unas pocas especies que de todos modos resultan controversiales en base a otras fuentes de caracteres y análisis (MGdR, com. Pers.).

### 5.3 Análisis cofilogenético

El análisis cofilogenético de la asociación entre *Wolbachia* y el complejo *Pantomorus-Naupactus* se llevó a cabo a partir de las filogenias obtenidas anteriormente. Se retiraron los grupos externos correspondientes a cada una. Debido a que los métodos de ajuste global funcionan en base a la estimación de matrices de distancia a partir de las reconstrucciones filogenéticas, se utilizaron los árboles estimados en base a IB. En cambio, como el método basado en eventos requiere filogenias totalmente dicotómicas, se optó por el árbol de MP, dado que el árbol obtenido por IB presenta una politomía basal (lo cual no representa un problema para los métodos de ajuste global).

#### 5.3.1 Reconstrucción cofilogenética entre *Wolbachia* y gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus* por métodos de ajuste global.

Los resultados obtenidos con ParaFit no proporcionaron evidencia de coevolución entre *Wolbachia* y sus hospedadores (ParaFitGlobal= 0.007, *p-value*= 0.05, 99 permutaciones). No obstante, dos de las asociaciones individuales entre los hospedadores y las bacterias resultaron significativas en base a la prueba ParaFitLink1: el ecotipo GC de la especie nominal *N. cervinus* - wNau5 (F1=4.435252e-04,  $p < 0.05$ ) y *N. dissimilis* - wNau7 (F1=3.935442e-04,  $p < 0,05$ ) (Tabla 3).

Hospedador	Parásito	F1. stat	p. F1	F2. stat	p. F2
1	1	3,43E+02	0,27	5,59E+01	0,27
2	2	9,29E-05	0,61	1,52E-05	0,61
3	10	-5,27E-05	0,83	-8,59E-06	0,83
4	3	1,69E+02	0,43	2,76E+01	0,43
5	1	8,68E+02	0,09	1,42E+02	0,09
6	1	8,68E+02	0,12	1,42E+02	0,12
7	1	7,84E+02	0,1	1,28E+02	0,1
8	7	1,07E+02	0,29	1,75E+01	0,29
9	4	3,67E+01	0,91	5,99E+00	0,91
10	5	1,56E+02	0,18	2,54E+01	0,18
11	5	1,87E+02	0,11	3,05E+01	0,11
12	5	4,44E+02	0,01	7,23E+01	0,01
14	6	3,57E+02	0,06	5,82E+01	0,06
15	7	3,94E+02	0,03	6,42E+01	0,03
17	7	2,33E+02	0,12	3,79E+01	0,12
18	7	9,12E+02	0,1	1,49E+02	0,1
19	8	-5,33E+01	0,81	-8,70E+00	0,81
20	1	9,03E+02	0,11	1,47E+02	0,11
21	1	6,84E+02	0,18	1,12E+02	0,18
22	7	-1,54E+02	0,88	-2,51E+01	0,88
23	1	1,03E+02	0,47	1,68E+01	0,47
25	3	3,30E+02	0,27	5,38E+01	0,27
26	9	-6,50E+01	0,78	-1,06E+01	0,78
27	1	2,52E+02	0,43	4,12E+01	0,43
29	1	9,77E+01	0,49	1,59E+01	0,49
30	11	-1,97E+01	0,74	-3,22E+00	0,74

Tabla 3: Valores del estadístico de prueba ParaFitLink1 para cada una de las asociaciones hospedador-parásito estudiadas. Se resaltan las asociaciones H-P con un valor de ParaFit1  $P \leq 0.05$ .

Sin embargo, PACo reveló asociaciones que con ParaFit no resultaron significativas ( $m^2=4.456$ ,  $p=0.012$ ), lo que implica que se observa alguna señal cofilogenética y que entonces la evolución de los grupos parásito-hospedador bajo consideración no ha sido del todo independiente. Como se puede ver en la Fig. 10, entre las asociaciones que más contribuyen a la congruencia filogenética entre *Wolbachia* y los gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus* (líneas más gruesas) se encuentran: *wNAu5*-(*N. cervinus* EC, *N. cervinus* FC, *N. cervinus* GC) y *wNAu8*-*N. peregrinus*.

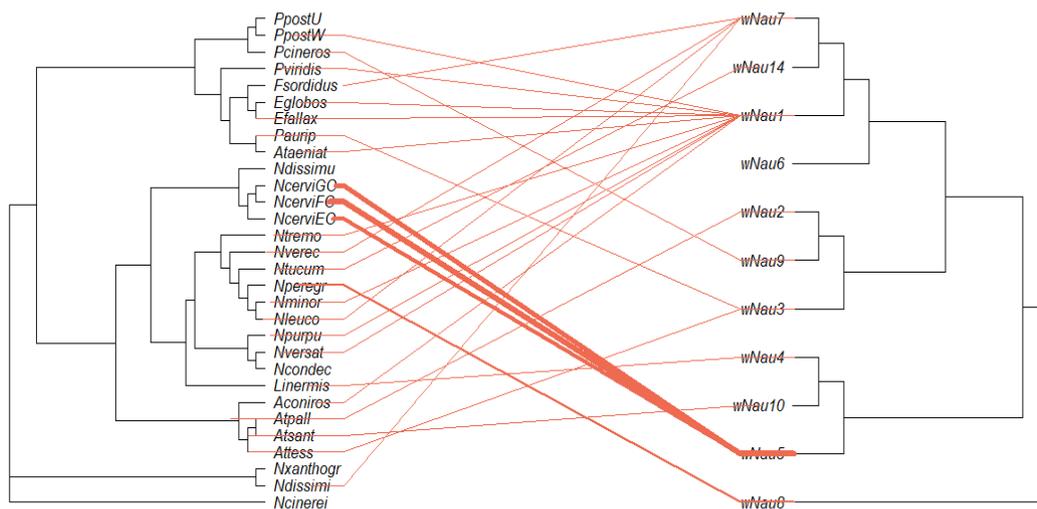


Figura 10. Representación gráfica del ajuste de las asociaciones hospedador-parásito obtenidas con PACo.

### 5.3.2 Reconstrucción cofilogenética entre *Wolbachia* y gorgojos de la tribu Naupactini por métodos basados en eventos.

El análisis cofilogenético basado en eventos mostró 5 conjuntos de soluciones isomórficas con un valor de costo total de 74. Las soluciones óptimas dieron como resultado 2 eventos de coespeciación, 3 duplicaciones, 46 extinciones y 5 cambios de hospedador (Fig. 11). Dentro de este conjunto de soluciones, se eligió aquella con los valores de soporte más altos en la mayoría de los eventos.

De los dos eventos de coespeciación, el primero de ellos ocurre en el nodo basal del árbol y da cuenta de la cercanía filogenética entre wNau5 que infecta al complejo de especies *N. cervinus* y wNau8 que infecta a *N. peregrinus* (Fig. 7), y coincide con el análisis de ajuste global ejecutado en PACo (Fig. 10). La otra coespeciación se da entre wNau3 que infecta a *P. auripes* y wNau9 que infecta a *P. cinerosus*, las cuales están muy emparentadas en términos filogenéticos (Fig. 7). Si bien sus hospedadores están en el mismo clado (A, Figs. 8 y 9), la relación distante entre ellas es explicada por numerosas extinciones.

Algunos eventos de duplicación fueron observados en nodos basales del árbol, asociados a extinciones y fallas en la divergencia, por lo que podrían ser meros artefactos del análisis. Es por esto que solo se tendrán en cuenta los eventos de duplicación asociados a cambios de hospedador.

Las extinciones y los eventos de inercia cofilogenética fueron numerosos, aunque es posible que también tengan una naturaleza artefactual como consecuencia de varias adquisiciones recientes, tal como lo sugieren las cepas multihospedoras wNau1, wNau3 y wNau7 (ver Tabla 1). La inercia cofilogenética a la que se hizo mención, insinúa que aún no habría transcurrido el tiempo suficiente para que se dé la acumulación de divergencia entre las bacterias de las especies donoras y recipientes. Resulta interesante resaltar el fallo en la especiación o inercia cofilogenética de los tres ecotipos de *N. cervinus* (EC, FC y GC) con la cepa wNau5 debido a lo reciente de la divergencia de estas unidades de evolución que forman dicho complejo.

Los eventos de cambio de hospedador se observan en varias oportunidades: pasaje y especiación de wNau3 que infecta a *P. auripes* a *Ar. tessellatus* y posterior divergencia a wNau2; pasaje de wNau5 desde *N. cervinus* FC a *L. inermis* y especiación a wNau4 y pasaje wNau4 asociada a *L. inermis* a *Ar. tessellatus santafecinus* y especiación a wNau10; pasaje de wNau7 desde *F. sordidus* a *N. tucumanensis* y especiación a wNau14.

Las especies de reproducción sexual estricta que no presentan la infección, *N. dissimulator* y *N. xanthographus*, poseen especies hermanas infectadas (*N. cervinus* y *N. dissimilis*, respectivamente). Estas ausencias de infección, aunque aparezcan señaladas como sendas extinciones en la reconstrucción cofilogenética, podrían explicarse como el resultado de un evento al azar en el cual, a partir de la divergencia de su ancestro común, una de las especies hospedadoras no heredó la bacteria (evento conocido como “pérdida del bote”). Alternativamente, las especies actualmente infectadas podrían haber adquirido la bacteria por un evento de transferencia horizontal con posterioridad a la divergencia del ancestro común de los hospedadores. Siendo este fenómeno tan común en la evolución del grupo, no se puede aseverar que a futuro estas especies no se infecten. Similarmente, en *P.*

*postfasciatus*, la cual tiene una subespecie infectada con wNau1 (*P. postfasciatus* W) y otra no infectada (*P. postfasciatus* U), el evento de extinción señalado en la última podría ser subproducto de las cuestiones antes mencionadas y en algún momento evolucionar hacia una infección novel resultante de una transferencia horizontal o salto de hospedador.

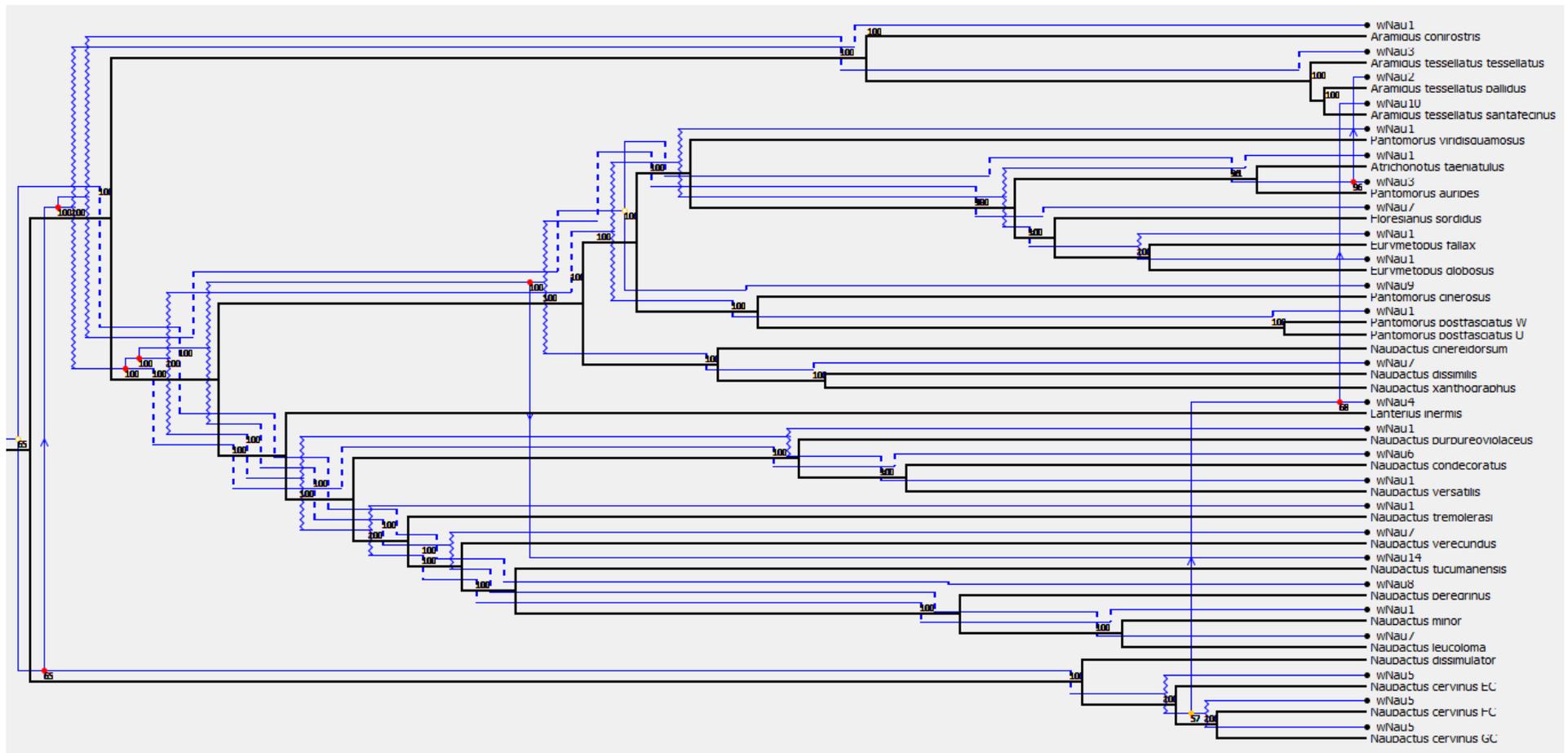


Figura 11. Reconstrucción producida por Jane 4.0 de la cofilogenia óptima entre hospedadores del complejo *Pantomorus-Naupactus* y las cepas de *Wolbachia* que los infectan. Las líneas azules y negras indican las filogenias de *Wolbachia* y sus hospedadores, respectivamente. Los círculos vacíos con contorno amarillo representan coespeciaciones; círculos rojos representan duplicaciones; las flechas representan cambios de hospedador; las líneas discontinuas representan eventos de extinción y las líneas onduladas representan fallas en la divergencia o inercia cofilogenética.

## 6-DISCUSSION Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la evolución entre *Wolbachia* y los gorgojos de la tribu Naupactini ha sido en gran parte mediada por la transferencia horizontal entre especies que comparten el ambiente ecológico (i.e. evolución independiente), aunque existe una marcada preferencia de un grupo de bacterias por la familia Curculionidae. Llamativamente, las cepas que infectan a los gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus* están cercanamente emparentadas con las que infectan a los géneros *Sitophilus* y *Lissorhoptrus*, por lo que de algún modo la filogenia del hospedador podría ser un predictor clave de la evolución de estos parásitos. Que las cepas reportadas en *Pantomorus-Naupactus* no se encuentren en ninguno de los miles de artrópodos relevados para la infección, tal como lo indicó la comparación con la base de datos que alberga los registros de *Wolbachia*, con excepción de los parasitoides que atacan a una de las especies del complejo (Rodríguez *et al.*, 2014; Fernández Goya *et al.*, 2022; Amaya Roncancio *et al.*, 2023) (ver más abajo), aporta evidencia adicional a esta hipótesis.

La transferencia horizontal es omnipresente en el género *Wolbachia* y no existe coincidencia entre cepas y fenotipos mayormente para artrópodos (Werren *et al.*, 1995), i.e. dos cepas estrechamente relacionadas pueden inducir fenotipos diferentes (Werren *et al.*, 1995). Pero existe evidencia de que la distancia filogenética entre los hospedadores afecta los eventos de cambios de hospedador (Engelstadter & Fortuna 2019). Este efecto surge del hecho de que las especies relacionadas tienden a ser fisiológica e inmunológicamente similares, aumentando así las posibilidades de que un parásito pueda replicarse con éxito en un nuevo hospedador. Sin embargo, otros rasgos relevantes de los hospedadores, como la presencia o ausencia de ciertos receptores de la superficie celular, también pueden evolucionar repetidamente durante su diversificación. Esto puede dar lugar a “efectos de clado” en los que un clado hospedador que sólo está relacionado lejanamente con un hospedador donante puede, sin embargo, tener una alta preferencia como receptor de un parásito dado (Longdon *et al.*, 2011). Además, la

probabilidad de cambios de hospedador dependerá no sólo de la similitud entre las especies hospedadoras, sino también de las oportunidades que tengan los parásitos de una especie de encontrarse con hospedadores de otra especie a la que puedan colonizar. Esto significa que tanto la superposición del área de distribución geográfica como las interacciones ecológicas entre las especies hospedadoras donantes y receptoras potenciales pueden ser determinantes importantes de los cambios de hospedadores (Clark *et al.*, 2018), tal como se vio en el presente trabajo.

Resulta interesante que aun cuando cepas emparentadas de *Wolbachia* se encuentran en especies emparentadas de gorgojos, sus filogenias no sean imágenes especulares, lo que confirma la transmisión horizontal de la bacteria, aunque con una cierta preferencia de hospedador. Esto también se ha observado en avispas del género *Trichogramma* (Schilthuisen & Stouthamer, 1997), cuyas cepas conforman un grupo monofilético en el árbol de *Wolbachia*, pero sin reflejar las relaciones filogenéticas de sus hospedadores, un patrón posiblemente en común con avispas parasitoides (Güz *et al.*, 2012) e incluso con otros gorgojos (e.g. Lachowska *et al.*, 2010; Sanaei *et al.*, 2019).

A la vista del presente trabajo, la infección de *Wolbachia* en Curculionidae resulta de procesos históricos que involucran altas tasas de transferencia horizontal interespecífica en lugar de coespeciación estricta, tal como se ha observado en otros insectos (e.g. Schilthuisen & Stouthamer, 1997; Werren & Windsor, 2000). Esta alta tasa de transferencia horizontal se puede atribuir al menos en parte a la presencia de cepas superpropagadoras, como por ejemplo wNau1 y wNau7. Estas cepas podrían estar “mejor equipadas” para “saltar” entre hospedadores y para ello se deben cumplir condiciones mínimas para que ocurra la transferencia horizontal: deben existir condiciones ambientales adecuadas (tanto en el nuevo hospedador como en el medio/ambiente que atraviesa la bacteria), la cepa bacteriana debe tener el potencial genético para la transferencia y debe haber un mecanismo que medie el evento de transferencia horizontal. Estas cepas pueden tender a ser menos nocivas en hospedadores nuevos (Bull & Turelli 2013) y, además, se debe tener en cuenta que en algunos casos la propagación de *Wolbachia* puede ser extremadamente rápida. En general, el sistema *Wolbachia*-artrópodos se

caracteriza por patrones complejos de codiversificación que difieren entre las cepas de *Wolbachia* y sus taxones hospedadores (Turelli *et al.*, 2018), lo que ha contribuido a que esta sea la pandemia más grande conocida desde el origen de la vida (Werren *et al.*, 2008).

La alta tasa de transferencia horizontal observada en este estudio fue sustentada por uno de los análisis de ajuste global (Parafit), que indicó una evolución mayormente independiente, lo cual resulta lógico por la presencia de cepas estrechamente emparentadas en hospedadores que no están cercanamente relacionados. No obstante, PACo resultó más sensible que ParaFit para mostrar una señal cofilogenética significativa sustentada por principalmente por la falta de variación genética en las cepas que infectan a *N. cervinus* (aunque Parafit también reveló ciertas asociaciones individuales que podrían ser un artefacto debido a la falta de significación global).

Aunque ambos enfoques proporcionan un valor del estadístico de la congruencia global de las filogenias y la contribución de los vínculos individuales a la congruencia global (Legendre *et al.*, 2002; Balbuena *et al.*, 2013), el método de Procrustes de PACo funciona mejor que ParaFit en términos de tasas de error tipo I (esto ocurre cuando se rechaza la hipótesis nula, aunque los datos se ajusten a  $H_0$ ) y potencia estadística (Balbuena *et al.*, 2013). El hecho de que la prueba estadística con ParaFit no resulte significativa y no se rechace la hipótesis nula puede tener relación con la alta tasa de transferencia horizontal de *Wolbachia*, siendo PACo el método estadístico que permitió no solo observar estos eventos de transferencia horizontal a través de una interfaz gráfica (“tanglegrama”), sino que el *p-valor* obtenido sustentó la hipótesis planteada de que la coevolución entre *Wolbachia* y los gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus* aquí estudiados no ha sido del todo independiente, recuperándose una señal cofilogenética, aunque por cierto muy débil, y más que nada apoyada por la inercia cofilogenética observada entre los miembros del complejo de especies *N. cervinus* y la cepa wNau5. Resultados similares arrojó el método basado en eventos, el cual detectó varios eventos de inercia cofilogenética o fallos en la divergencia, los cuales pueden traducirse como eventos de transferencia horizontal recientes.

Las relaciones entre las cepas multihospedadoras como wNau1 y wNau7 y sus hospedadores fueron recuperadas como eventos de inercia cofilogenética o fallos en la divergencia por la reconstrucción cofilogenética obtenida con Jane 4.0. Sin embargo, estas aparentes inercias cofilogenéticas podrían interpretarse como eventos de transferencia horizontal tan recientes que los procesos especiogénicos post-salto de hospedador (codivergencia tipo 2) aún no se han completado. Teniendo en cuenta que los genomas de *Wolbachia* divergen como máximo dos órdenes de magnitud más lentamente que los genomas nucleares del hospedador (Conner *et al.*, 2017), esto podría explicar el caso de wNau1, quien ha colonizado especies lejanamente relacionadas como *Eurymetopus fallax* y *Naupactus purpurioviolaceus*. Por otro lado, en el caso de la especie nominal *N. cervinus*, la cual atraviesa un proceso de diversificación que dio origen a ecotipos propios de la selva y la pradera (FC y GC) e incluso especies crípticas (EC), no hay una diferenciación en sus bacterias (wNAu5), lo que podría explicarse tan solo como falta de tiempo para que se complete el proceso coespeciogénico. De hecho, el análisis de ajuste global realizado con PACo resaltó esta señal cofilogenética, como se mencionó antes.

Teniendo en cuenta que la evolución de *Wolbachia* por transferencia horizontal puede darse en respuesta a los hábitos de sus hospedadores gorgojos, se desprende la siguiente hipótesis:

- La transferencia horizontal de *Wolbachia* en el complejo *Pantomorus-Naupactus* está asociada con los hábitos de sus hospedadores:

Dentro de *Pantomorus-Naupactus*, un factor clave para la transferencia horizontal de *Wolbachia* entre hospedadores lejanamente emparentados podría ser su adaptación a ambientes similares (Rodríguez, 2009). Esto podría explicar los resultados obtenidos por Jane 4.0 en los que vimos, por ejemplo, el pasaje y especiación de:

1) wNau3 a wNAu2: en este caso, *P. auripes* y *Aramigus tessellatus pallidus* son especies no voladoras, parcialmente simpátridas, que se encuentran asociadas con pasturas, matorrales y cultivos de la provincia biogeográfica Pampeana. Ambas causan daños en girasol (*Helianthus annuus* L., Asteraceae), alfalfa (*Medicago sativa* L., Fabaceae) y papa (*Solanum*

*tuberosum* L., Solanaceae), entre otros cultivos (Lanteri, 1994; Lanteri *et al.*, 2002). Por lo tanto, ambas especies hospedadoras comparten tanto fuentes de alimentación como el ambiente ecológico en el que se desarrollan.

2) wNau5 a wNau4: *N. cervinus* y *Lanterius inermis* se encuentran distribuidas en la selva Paranaense, donde comparten el mismo ambiente, aunque *N. cervinus* tiene una distribución geográfica mucho más amplia y se expande también a otros tipos ambientes (del Río *et al.*, 2018). Esta última especie presenta una gran variabilidad genética en su área de distribución original (Rodríguez *et al.*, 2013). Se conocen varios enemigos naturales para esta especie, como nematodos (*Steirneinema carpocapsae* (Weiser), *Heterorhabditis* sp.), hongos (*Bauveria bassiana* (Bals.), *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) y parasitoides, como las avispas *Fidiobia citri* (Nixon) (Platygastridae) y diversas especies de *Microctonus* sp. (Braconidae) (Rodríguez *et al.*, 2014; Fernández Goya *et al.*, 2022; Amaya Roncancio *et al.*, 2023) y el díptero *Oestrophasia* sp. (Fernández Goya *et al.*, 2022). El hecho de que una de las especies de *Microctonus* esté muy probablemente infectada con la misma cepa que *N. cervinus* (Fernández Goya *et al.*, 2022), sustenta la hipótesis de vectores parasitoides como posibles mediadores de la transferencia horizontal (ver más abajo).

Con respecto a las cepas wNau7 y wNau1, se puede concluir que ambas se comportan como cepas superpropagadoras. Para wNau7, presente en *Naupactus verecundus*, *N. leucoloma*, *N. dissimilis* y *Floresianus sordidus*, resulta interesante la asociación con esta última. En este caso, es probable que se trate de una transferencia relativamente reciente que pudo haber adquirido a través de *N. verecundus* o *N. leucoloma*, con las cuales comparte el mismo ambiente, las pasturas de la región Pampeana. En el caso de wNau1, presente en diez especies de seis géneros del complejo, *Aramigus*, *Atrichonotus*, *Eurymetopus*, *Floresianus*, *Naupactus* y *Pantomorus*, se asocia con especies adaptadas a ambientes serranos, de pastizales y vegetación arbórea nativa de la provincia biogeográfica de la Pampa, y expandidas hacia las provincias del Chaco y Paranaense. Asimismo, muchas se asocian con cultivos agrícolas. Todas estas especies se caracterizan por ser no voladoras, y sus distribuciones se solapan parcialmente entre ellas, por lo cual coexisten en simpatria.

A partir de la evaluación de los potenciales cambios de hospedador para las cepas multipropagadoras y los detallados anteriormente, se concluye que los hábitos de los hospedadores son un factor importante en la transferencia horizontal de *Wolbachia* en el complejo estudiado, la cual podría estar asociada con el ambiente ecológico compartido, tal como se ha visto en otros casos (Cordaux *et al.*, 2001; Kittayapong *et al.*, 2003; Stahlhut *et al.*, 2010; Morrow *et al.*, 2014). Es decir que en el complejo *Pantomorus-Naupactus* el ambiente ecológico sería la directriz de la evolución conjunta con sus parásitos reproductivos del género *Wolbachia*, tal como se ha observado en los insectos escamosos comúnmente conocidos como cochinillas (Sanaei *et al.*, 2023). Por otra parte, los hallazgos de Rodriguero *et al.* (2014), Fernández Goya *et al.* (2022) y Amaya Roncancio *et al.* (2023) permiten postular la hipótesis de que dicha transferencia horizontal puede ser mediada por un vector parasitoide.

Existe una relación notable entre hospedadores, parasitoides, ambiente e infección con *Wolbachia*. Los gorgojos de rostro corto de las subfamilias Entiminae y Cyclominae se encuentran entre los principales hospedadores de bracónidos euforinos, como *Microctonus hyperodae* Loan, *Microctonus aethiopoides* Loan y *Microctonus zealandicus* Shaw (Shaw, 1988). Algunos de estos gorgojos no son voladores, están asociados con pastizales, pastos y alfalfa, plantas nativas o exóticas y se reproducen por partenogénesis (Lanteri & Normark, 1995; Marvaldi *et al.*, 2012), al igual que sus parasitoides. Este tipo de reproducción facilita la dispersión y colonización de nuevas áreas fuera del área de distribución natural de la especie (Lanteri *et al.*, 2013). En el contexto de la relación entre los gorgojos, los parasitoides bracónidos y la infección con *Wolbachia*, Rodriguero *et al.* (2014) hallaron una especie de *Microctonus* que parasita a la especie partenogenética *N. cervinus* la cual está infectada con *wNau1*. Luego, Fernández Goya *et al.* (2022) informaron de dos parasitoides para *N. cervinus*, uno de ellos díptero y el otro un microhimenóptero que compartía entre un 82% y un 88% de identidad de secuencia con varios Braconidae, que pertenecía al género *Microctonus* y que está infectado con *wNau5*. En definitiva, los análisis de distancia genética revelaron que *N. cervinus* está parasitado por diferentes especies de *Microctonus* en la Argentina infectados con una diversidad de cepas circulantes en *Pantomorus-*

*Naupactus*, lo que condujo al planteo de una hipótesis que considera a los parasitoides como uno de los posibles vehículos para la transferencia horizontal en *Pantomorus-Naupactus*. Otro ejemplo de un parasitoide infectado con las cepas circulantes en *Pantomorus-Naupactus* es el de *Apanteles opuntiarum* Martínez & Berta, un braconido parasitoide de la polilla del cactus *Cactoblastis cactorum* (Berg) (Lepidoptera: Pyralidae) en el centro y norte de Argentina. Mengoni Goñalons *et al.* (2014) revelaron una cepa similar a la que infecta a la mayoría de los gorgojos partenogenéticos del complejo *Pantomorus-Naupactus* (cepa wNau1) (Rodríguez *et al.*, 2010).

Cada vez hay más pruebas de que la transmisión horizontal de *Wolbachia* de una especie a otra es un fenómeno sumamente común (Ahmed *et al.*, 2013; Gerth *et al.*, 2013; Brown & Lloyd, 2015). Por ello, y dada su importancia ecológica y evolutiva, su ruta de transmisión se ha convertido en un foco de investigación (Vavre *et al.*, 1999; Sintupachee *et al.*, 2006; Caspi-Fluger *et al.*, 2012; Gehrler & Vorburger, 2012). En varias ocasiones, se ha revelado la transmisión horizontal de *Wolbachia* a través de depredadores y parasitoides invertebrados (Huigens *et al.*, 2000, 2004; Le Clec'h *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2015). Sin embargo, la presencia de cepas idénticas de *Wolbachia* entre especies que no necesariamente comparten depredadores y parasitoides pero que tienen hábitats similares, como plantas hospedadoras o fuentes de alimento compartidas, sugiere que las plantas o los alimentos también pueden estar involucrados en la transmisión horizontal de *Wolbachia* (Sintupachee *et al.*, 2006; Caspi-Fluger *et al.*, 2012; Weinert *et al.*, 2015). Por ejemplo, Li *et al.* (2017) detectaron que la planta hospedadora tiene un papel central en la transmisión horizontal de *Wolbachia* entre moscas blancas (*Bemisia tabaci* (Gennadius)). Estos autores revelaron que este endosimbionte podía detectarse en plantas de algodón después de varias semanas en las que moscas blancas positivas para *Wolbachia* se habían alimentado de ellas, lo que sugiere que la transmisión horizontal también es posible a través de especies de plantas. Estos hallazgos pueden ayudar a explicar por qué *Wolbachia* es tan abundante en los artrópodos y puede mantenerse en las poblaciones hospedadoras mediante transmisión horizontal. Debido al escaso conocimiento sobre la diversidad de parasitoides que infectan a los gorgojos de *Pantomorus-*

*Naupactus* y su *status* de infección, que se presume está muy subestimado (Fernandez Goya et al., 2022), no es posible apuntar a estos organismos como la causa única de la enorme extensión de la infección en este grupo de insectos. Las plantas hospederas podrían jugar un rol tan o más importante incluso que el de los parasitoides en la expansión de la infección en estos animales.

La asociación entre *Wolbachia* y los gorgojos de *Pantomorus-Naupactus* permitió realizar un estudio cofilogenético a través de diferentes recursos bioinformáticos implementando métodos basados en eventos y métodos de ajuste global. A través de los métodos de ajuste global se pudieron identificar aquellas asociaciones que más contribuyeron a la congruencia filogenética entre *Wolbachia* y sus hospedadores, mientras que mediante un método basado en eventos se lograron identificar aquellos eventos de duplicación y cambios de hospedador que sugieren la ocurrencia de transferencia horizontal de *Wolbachia* en el complejo taxonómico *Pantomorus-Naupactus*. Pero este trabajo sugiere que tanto el parentesco filogenético como el ambiente ecológico son factores determinantes en la coevolución de *Wolbachia* y sus hospedadores del complejo *Pantomorus-Naupactus*. Más allá de que no se observe un patrón de coespeciación estricta, sino altas tasas de transferencia horizontal, de algún modo hay cepas cuya evolución está restringida a este tipo de hospedadores. Es una combinación de ambos factores la que conduce la evolución de este parásito reproductivo en los gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus*.

## 7-PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir del presente trabajo se amplió el conocimiento sobre la coevolución entre diversas cepas de la especie *Wolbachia pipientis* y los gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus*. Los resultados obtenidos alientan a profundizar en varios aspectos como, por ejemplo, ampliar el muestreo de las especies de *Pantomorus-Naupactus* y sus parásitos reproductivos asociados a fin de evitar sesgos y presentar un cuadro aún más completo de la evolución

conjunta de los taxones en consideración, así como también ampliar el muestro de parasitoides asociados a *Pantomorus-Naupactus* y tipificar las infecciones que pudieran portar. En este sentido, se podría pensar en llevar a cabo un estudio que evalúe el papel que cumplen las avispa parasitoides del género *Microctonus* (y otros por descubrir) en la transmisión de la bacteria *Wolbachia* entre gorgojos del complejo *Pantomorus-Naupactus*, por ejemplo, a través de experimentos de transinfección bacteriana. También, se podría evaluar la factibilidad de las plantas que actúan como fuente de alimento en la transferencia de *Wolbachia* entre especies de *Pantomorus-Naupactus*.

Además, teniendo en cuenta que se observaron altas tasas de transferencia horizontal, se podría estudiar a través de un enfoque genómico comparativo el carácter “superpropagador” de la cepa wNau1 a partir de la comparación de su genoma (ya secuenciado y ensamblado) con los de otras cepas superpropagadoras conocidas.

La exploración de la historia evolutiva común entre las especies de *Pantomorus-Naupactus*, sus parasitoides asociados y los parásitos reproductivos a los cuales hospedan permitirá esclarecer los mecanismos que gobiernan la transmisión de la infección con *Wolbachia* dentro de este grupo. Este tipo de proyectos ofrecen la oportunidad de incrementar el conocimiento sobre la biodiversidad y las interacciones ecológicas que existen en nuestro país.

## 8-BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, M. Z., Li, S.-J., Xue, X., Yin, X.-J., Ren, S.-X., Jiggins, F. M., Greeff, J. M. & Qiu, B.-L. 2015. The intracellular bacterium *Wolbachia* uses parasitoid wasps as phoretic vectors for efficient horizontal transmission. PLoS Pathogens 11, e1004672.

Amaya-Roncancio, C.; Aquino, D.; del Río, M. G. & Rodriguero, M. S. 2023. Un nuevo registro de parasitoidismo por *Microctonus* sp. (Hymenoptera: Braconidae) en dos especies de gorgojos revela una inesperada diversidad

dentro del género en Sudamérica. IV Reunión Argentina de Biología Evolutiva. La Plata, Argentina.

Anderson, R. S. 1993. Weevils and plants: Phylogenetic versus ecological mediation of evolution of host plant associations in Curculioninae (Coleoptera: Curculionidae). *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 165: 197-232.

Anderson, R. S. 1995. An evolutionary perspective on diversity in Curculionoidea. *Memoirs of the Entomological Society of Washington* 14: 103-114.

Badets M., Whittington I., Lalubin F., Allienne J. F., Maspimby J. L. *et al.*, 2011. Correlating early evolution of parasitic platyhelminths to Gondwana breakup. *Systematic Biology* 60: 762–781.

Bailly– Bechet, M., Martins– Simões, P., Szöllosi, G. J., Mialdea, G., Sagot, M. F. & Charlat, S. 2017. How Long Does *Wolbachia* Remain on Board? *Molecular Biology and Evolution* 34(5): 1183–1193.

Balbuena, J. A., Míguez– Lozano, R. & Blasco– Costa, I. 2013. PACo: a novel procrustes application to cophylogenetic analysis. *PloS One* 8(4): e61048.

Balbuena, J. A., Pérez– Escobar, Ó. A., Llopis– Belenguer, C. & Blasco– Costa, I. 2020. Random tanglegram partitions (Random TaPas): an Alexandrian approach to the cophylogenetic Gordian knot. *Systematic Biology* 69(6): 1212–1230.

Baldo, L., Lo, N. & Werren, J. H. 2005. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *Journal of Bacteriology* 187(15): 5406– 5418.

Baldo, L., Dunning Hotopp, J. C., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., ... & Werren, J. H. 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(11): 7098– 7110.

Baldo, L., Ayoub, N. A., Hayashi, C. Y., Russell, J. A., Stahlhut, J. K. & Werren, J. H. 2008. Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: High levels of

horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Molecular Ecology* 17(2): 557–569.

Baudet. C., Donati. B., Sinimeri. B., Crescenzi. P., Gautier C. *et al.*, 2014. Cophylogeny reconstruction via and approximate Bayesian computation. *Systematic Biology* 64: 416–431.

Bleidorn, C. & Gerth, M. 2018. A critical re– evaluation of multilocus sequence typing (MLST) efforts in *Wolbachia*. *FEMS Microbiology Ecology* 94, fix163.

Bordenstein, S. & Rosengaus, R. B. 2005. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in Isoptera. *Current Microbiology* 51: 393–398.

Bordenstein, S. R., Paraskevopoulos, C., Dunning Hotopp, J. C., Sapountzis, P., Lo, N., Bandi, C., ... & Bourtzis, K. 2009. Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. *Molecular Biology and Evolution* 26(1): 231–241.

Breeuwer, J. A. J. & Jacobs, G. 1996. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Experimental & Applied Acarology* 20: 421–434.

Brown, A. N. & Lloyd, V. K. 2015. Evidence for horizontal transfer of *Wolbachia* by a *Drosophila* mite. *Experimental and Applied Acarology* 66: 301– 311.

Buchanan, L. L. 1939. The species of *Pantomorus* of America north of Mexico. *USDA Miscellaneous Publications* 341: 1–39.

Bull, J. J., & Turelli, M. 2013. *Wolbachia* versus dengue: evolutionary forecasts. *Evolution, Medicine, and Public Health* 2013(1): 197–207.

Caragata, E. P., Pais, F. S., Baton, L. A., Silva, J. B. L., Sorgine, M. H. F. & Moreira, L. A. 2017. The transcriptome of the mosquito *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae), and transcriptional changes associated with its native *Wolbachia* infection. *BMC Genomics* 18: 1– 19.

Caspi– Fluger, A., Inbar, M., Mozes– Daube, N., Katzir, N., Portnoy, V., Belausov, E., ... & Zchori– Fein, E. 2012. Horizontal transmission of the insect

symbiont *Rickettsia* is plant– mediated. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 279(1734): 1791–1796.

Charleston, M. A. & Little, R., 2009. A likelihood method for cophylogenetics: phylomania [abstract]. Sydney: School of IT, University of Sydney.

Charleston, M. & Libeskind– Hadas, R. 2014. Event– based cophylogenetic comparative analysis. Modern Phylogenetic Comparative Methods and Their Application in Evolutionary Biology: Concepts and Practice: 465–480.

Charleston, M. A. & Perkins, S. L. 2006. Traversing the tangle: algorithms and applications for cophylogenetic studies. Journal of Biomedical Informatics 39: 62–71.

Clark, N. J., Clegg, S. M., Sam, K., Goulding, W., Koane, B., & Wells, K. 2018. Climate, host phylogeny and the connectivity of host communities govern regional parasite assembly. Diversity and Distributions 24(1): 13– 23.

Conner, W. R., Blaxter, M. L., Anfora, G., Ometto, L., Rota– Stabelli, O. & Turelli, M. 2017. Genome comparisons indicate recent transfer of wRi– like *Wolbachia* between sister species *Drosophila suzukii* and *D. subpulchrella*. Ecology and Evolution 7: 9391–9404.

Conow, C., Fielder, D., Ovadia, Y. & Libeskind– Hadas, R. 2010. Jane: a new tool for the cophylogeny reconstruction problem. Algorithms for Molecular Biology 5(1): 1–10.

Cordaux, R., Michel– Salzat, A. & Bouchon, D. 2001. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. Journal of Evolutionary Biology 14: 237–243.

Cruz Cabral, L. D., Goya, L. F., Piccinali, R. V., Lanteri, A. A., Confalonieri, V. A. & Rodriguero, M. S. 2020. Parthenogenesis in weevils of the tribe Naupactini (Coleoptera, Curculionidae): a *Wolbachia*– density dependent trait? *bioRxiv*, 2020– 07.

- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772– 772.
- De Santis, L. .1948. Un caso interesante de foresia. *Notas del Museo de La Plata* 13(Zool 104): 129–135.
- de Vienne, D. M., Refrégier, G., López– Villavicencio, M., Tellier, A., Hood, M. E. & Giraud, T. 2013. Cospeciation vs host– shift speciation: methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. *New Phytologist* 198: 347–385.
- del Río, M. G., Rodriguero, M. S., Confalonieri, V. A., & Lanteri, A. A. 2018. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Naupactus* Dejean (Curculionidae: Entiminae) and Allied Genera: The dilemma of classification. *Diversity* 10(3): 59.
- Demastes JW, Spradling TA, Hafner MS, Spies GR, Hafner DJ *et al.*, 2012. Cophylogeny on a fine scale: *Geomydoecus* chewing lice and their pocket gopher hosts *Pappogeomys bulleri*. *Journal of Parasitology* 98: 262–270.
- Didelot, X. & Falush, D. 2007. Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. *Genetics* 175(3): 1251–1266.
- Doyon, J. P., Ranwez, V., Daubin, V. & Berry, V. 2011. Models, algorithms and programs for phylogeny reconciliation. *Briefings in Bioinformatics* 12: 392–400.
- Drinkwater, B. & Charleston, M. A. 2014. An improved node mapping algorithm for the cophylogeny reconstruction problem. *Coevolution* 2: 1–17.
- Ebach, M. C., Morrone, J.J., Parenti, L.R. & Vilorio, A. L. 2008. International code of area nomenclature. *Journal of Biogeography* 35: 1153–1157.
- Eleftherianos, I., Atri, J., Accetta, J. & Castillo, J. C. 2013. Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system? *Frontiers in Physiology* 4: 46.

- Elias– Costa, A. J., Confalonieri, V. A., Lanteri, A. A., & Rodriguero, M. S. 2019. Game of clones: Is *Wolbachia* inducing speciation in a weevil with a mixed reproductive mode? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 133: 42–53.
- Engelstadter, J. & Fortuna, N. Z. 2019. The dynamics of preferential host switching: host phylogeny as a key predictor of parasite distribution. *Evolution* 73: 1330–1340.
- Erixon, P., Svennblad, B., Britton, T., & Oxelman, B. 2003. Reliability of Bayesian posterior probabilities and bootstrap frequencies in phylogenetics. *Systematic Biology* 52(5): 665–673.
- Fast, E. M., Toomey, M. E., Panaram, K., Desjardins, D., Kolaczyk, E. D. & Frydman, H. M. 2011. *Wolbachia* enhance *Drosophila* stem cell proliferation and target the germline stem cell niche. *Science* 334: 990–992.
- Fenn, K. & Blaxter, M. 2004. Are filarial nematode *Wolbachia* obligate mutualist symbionts? *Trends in Ecology & Evolution* 19: 163–166.
- Fenton, A., Johnson, K. N., Brownlie, J. C. & Hurst, G. D. D. 2011. Solving the *Wolbachia* paradox: modeling the tripartite interaction between host, *Wolbachia*, and a natural enemy. *The American Naturalist* 178: 333–342.
- Fernandez Goya, L., Lanteri, A. A., Confalonieri, V. A., & Rodriguero, M. S. 2022. New host– parasitoid interactions in *Naupactus cervinus* (Coleoptera, Curculionidae) raise the question of *Wolbachia* horizontal transmission. *Symbiosis* 86(3): 325–336.
- Frydman, H. M., Li, J. M., Robson, D. N. & Wieschaus, E. 2006. Somatic stem cell niche tropism in *Wolbachia*. *Nature* 441: 509–512.
- Fujii, Y., Kageyama, D., Hoshizaki, S., Ishikawa, H., & Sasaki, T. 2001. Transfection of *Wolbachia* in Lepidoptera: the feminizer of the adzuki bean borer *Ostrinia scapulalis* causes male killing in the Mediterranean flour moth *Ephesia kuehniella*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 268(1469): 855–859.

- Gehrer, L. & Vorburger, C. 2012. Parasitoids as vectors of facultative bacterial endosymbionts in aphids. *Biology letters* 8(4): 613–615.
- Gerth, M., Röthe, J., & Bleidorn, C. 2013. Tracing horizontal *Wolbachia* movements among bees (Anthophila): a combined approach using multilocus sequence typing data and host phylogeny. *Molecular Ecology* 22(24): 6149–6162.
- Gerth, M. 2016. Classification of *Wolbachia* (Alphaproteobacteria, Rickettsiales): no evidence for a distinct supergroup in cave spiders. *Infection, Genetics and Evolution* 43: 378–380.
- Gerth, M. & Bleidorn, C. 2017. Comparative genomics provides a timeframe for *Wolbachia* evolution and exposes a recent biotin synthesis operon transfer. *Nature Microbiology* 2: 16241.
- Glowska, E., Dragun–Damian, A., Dabert, M. & Gerth, M. 2015. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). *Infection, Genetics and Evolution* 30: 140–146.
- Goloboff, P. A., Farris, J. S., & Nixon, K. C. 2004. TNT. *Cladistics* 20: 84.
- Goloboff, P. A. & Catalano, S. 2016. TNT version 1.5, including full implementation of phylogenetic morphometrics. *Cladistics* 32: 221–238.
- Goñalons, C. M., Varone, L., Logarzo, G., Guala, M., Rodriguez, M., Hight, S. D., & Carpenter, J. E. 2014. Geographical range and laboratory studies on *Apanteles opuntiarum* (Hymenoptera: Braconidae) in Argentina, a candidate for biological control of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) in North America. *Florida Entomologist* 97(4): 1458–1468.
- Goya, L. F. 2023. Aspectos cualitativos y cuantitativos de la infección con *Wolbachia* en la tribu Naupactini (Coleoptera, Curculionidae) y su relación con la reproducción (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires).

- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3): 307–321.
- Guo, Y., Hoffmann, A. A., Xu, X. Q., Mo, P. W., Huang, H. J., Gong, J. T., Ju, J. F. & Hong, X. Y. 2018. Vertical transmission of *Wolbachia* is associated with host vitellogenin in *Laodelphax striatellus*. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–12.
- Güz, N., Kocak, E., Emre Akpınar, A., Oktay Gurkan, M., & Neset Kilincer, A. 2012. *Wolbachia* infection in *Trissolcus species* (Hymenoptera: Scelionidae). *European Journal of Entomology* 109(2).
- Guzmán, N. V., Lanteri, A. A. & Confalonieri, V. A. 2012. Colonization ability of two invasive weevils with different reproductive modes. *Evolutionary ecology* 26: 1371– 1390.
- Haegeman, Annelies, A., Vanholme, B., Jacob, J., Vandekerckhove, T. T., Claeys, M., Borgonie, G., & Gheysen, G.. 2009. An endosymbiotic bacterium in a plant- parasitic nematode: member of a new *Wolbachia* supergroup. *International Journal for Parasitology* 39(9): 1045– 1054.
- Hafner, M. S. & Nadler, S. A. 1990. Cospeciation in host- parasite assemblages: comparative analysis of rates of evolution and timing of cospeciation events. *Systematic Biology* 39: 192–204.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95– 98.
- Heath, B. D., Butcher, R. D. J., Whitfield, W. G. F. & Hubbard, S. F. 1999. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Current Biology* 9: 313–316.
- Howden, A.T. 1996. Neotropical *Pandeletheius* (Coleoptera: Curculionidae) with irregular elytral striae. *The Canadian Entomologist* 128: 877–955.

Hutchinson, M. C., Cagua, E. F., Balbuena, J. A., Stouffer, D. B., & Poisot, T. 2017. PACo: implementing Procrustean Approach to Cophylogeny in R. *Methods in Ecology and Evolution* 8(8): 932–940.

Johnson, K.P., Adams, R.J., Page, R.D.M. & Clayton, D.H. 2003. When do parasites fail to speciate in response to host speciation? *Systematic Biology* 52: 37–47.

Johnson, K.P. & Clayton, D.H., 2003. Coevolutionary history of ecological replicates: comparing phylogenies of wing and body lice to columbiform hosts. In: Page, R.D.M. (Ed.), *Tangled Trees. Phylogeny, Cospeciation, and Coevolution*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 262–286.

Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. 2018. Open– access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research* 3.

Kaur, R., Shropshire, J. D., Cross, K. L., Leigh, B., Mansueto, A. J., Stewart, V., ... & Bordenstein, S. R. 2021. Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia*: A centennial review. *Cell Host & Microbe* 29(6): 879–893.

Kittayapong, P., Jamnongluk, W., Thipaksorn, A., Milne, J. R., & Sindhusake, C. 2003. *Wolbachia* infection complexity among insects in the tropical rice-field community. *Molecular Ecology* 12(4): 1049–1060.

Kraaijeveld, K., Reumer, B. M., Mouton, L., Kremer, N., Vavre, F., & van Alphen, J. J. 2011. Does a parthenogenesis– inducing *Wolbachia* induce vestigial cytoplasmic incompatibility? *Naturwissenschaften* 98: 175– 180.

Lachowska, D., Kajtoch, Ł., & Knutelski, S. 2010. Occurrence of *Wolbachia* in central European weevils: correlations with host systematics, ecology, and biology. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 135(1): 105– 118.

Lanteri, A.A. 1994. Bases para el control integrado de los gorgojos de la alfalfa. Ediciones de La Campana, La Plata.

- Lanteri, A. A., Díaz, N. B., Loíacono, M. S. & Marvaldi, A. E. 1997. Gorgojos perjudiciales a los cultivos de trigo en Argentina (Coleoptera: Curculionidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 56: 77– 89.
- Lanteri, A. A., Loiacono, M., Díaz, N., & Marvaldi, A. 1998. Natural enemies of weevils (Coleoptera: Curculionoidea) harmful to crops in Argentina. *Revista Brasileira de Entomología* 41: 517– 522.
- Lanteri, A. A., & Normark, B. B. 1995. Parthenogenesis in the tribe Naupactini (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of the Entomological Society of America* 88(6): 722–731.
- Lanteri, A. A., Marvaldi, A. E., & Suárez, S. M. 2002. Gorgojos de la Argentina y sus plantas huéspedes. *Publicación Especial de la Sociedad Entomológica Argentina*, 1.
- Lanteri, A. A., Guzman, N. V., Del Río, M. G., & Confalonieri, V. A. 2013. Potential geographic distributions and successful invasions of parthenogenetic broad-nosed weevils (Coleoptera: Curculionidae) native to South America. *Environmental Entomology* 42(4): 677– 687.
- Lapointe, F. J., & Legendre, P. 1992. Statistical significance of the matrix correlation coefficient for comparing independent phylogenetic trees. *Systematic Biology* 41(3): 378– 384.
- Le Clec'h, W., Chevalier, F. D., Genty, L., Bertaux, J., Bouchon, D., & Sicard, M. 2013. Cannibalism and predation as paths for horizontal passage of *Wolbachia* between terrestrial isopods. *PloS One* 8(4), e60232.
- Lefoulon, E., Clark, T., Borveto, F., Perriat– Sanguinet, M., Moulia, C., Slatko, B. E. & Gavotte, L. 2020. Pseudoscorpion *Wolbachia* symbionts: diversity and evidence for a new supergroup S. *BMC Microbiology* 20: 188.
- Legendre, P., Desdevises, Y. & Bazin, E. 2002. A statistical test for host–parasite coevolution. *Systematic Biology* 51(2): 217– 234.

- Lewis, P. O. 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology* 50(6): 913– 925.
- Li, S. J., Ahmed, M. Z., Lv, N., Shi, P. Q., Wang, X. M., Huang, J. L., & Qiu, B. L. 2017. Plant-mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. *The ISME Journal* 11(4): 1019– 1028.
- Libeskind– Hadas, R., Yi– Chieh, W., Bansal, M.S. & Kellis, M. 2014. Pareto–optimal phylogenetic tree reconciliation. *Bioinformatics* 30: i87–i95.
- Lindsey, A. R. I., Bordenstein, S. R., Newton, I. L. G. & Rasgon, J. L. 2016. *Wolbachia pipientis* should not be split into multiple species: a response to Ramírez– Puebla *et al.*, “species in *Wolbachia*? Proposal for the designation of ‘*Candidatus Wolbachia bourtzisii*’, ‘*Candidatus Wolbachia onchocercicola*’, ‘*Candidatus Wolbachia blaxteri*’, ‘*Candidatus Wolbachia brugii*’, ‘*Candidatus Wolbachia taylori*’, ‘*Candidatus Wolbachia collembolicola*’ and ‘*Candidatus Wolbachia multihospitum*’ for the different species within *Wolbachia* supergroups”. *Systematic and Applied Microbiology* 39: 220–222.
- Lo, N., Casiraghi, M., Salati, E., Bazzocchi, C. & Bandi, C. 2002. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Molecular Biology and Evolution* 19: 341–346.
- Loiácono, M. S. 1982. Un nuevo platigástrido (Hymenoptera, Platygasteridae) criado de huevos de *Naupactus xanthographus* Germ (Coleoptera, Curculionidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 41: 85–88.
- Longdon, B., Hadfield, J. D., Webster, C. L., Obbard, D. J. & Jiggins, F. M. 2011. Host phylogeny determines viral persistence and replication in novel hosts. *PLoS pathogens* 7(9): e1002260.
- Martínez– Aquino, A. 2016. Phylogenetic framework for coevolutionary studies: a compass for exploring jungles of tangled trees. *Current Zoology* 62(4): 393– 403.
- Marvaldi, A. E. 1999. Morfología larval en Curculionidae. *Acta Zoologica Lilloana* 45: 7– 24.

Marvaldi, A. E. & del Río, M. G. 2023. Curculionoidea. Biodiversidad de artrópodos argentinos.

Morrow, J. L. 2014. Molecular studies of *Wolbachia* and sex– determination genes in Australian *Bactrocera* species– complementary approaches to improved fruit fly control (Doctoral dissertation, University of Western Sydney, Hawkesbury (Australia)).

Newton, I. L. G., Savytsky, O. & Sheehan, K. B. 2015. *Wolbachia* Utilize host Actin for efficient maternal transmission in *Drosophila melanogaster*. PLoS Pathogens 11: e1004798.

Normark, B. B. 1996. Polyploidy of parthenogenetic *Aramigus tessellatus* (Say) (Coleoptera: Curculionidae). The Coleopterists' Bulletin :73– 79.

Normark, B. B. & Lanteri, A. A. 1998. Incongruence between morphological and mitochondrial– DNA characters suggests hybrid origins of parthenogenetic weevil lineages (genus *Aramigus*). Systematic Biology 47(3): 475– 494.

Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M., Karr, T. L. & Robertson, H. M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America 89: 2699–2702.

Otten, C., Brilli, M., Vollmer, W., Viollier, P. H. & Salje, J. 2018. Peptidoglycan in obligate intracellular bacteria. Molecular Microbiology 107: 142–163.

Page, R. D. M. & Charleston, M.A. 1998. Trees within trees: phylogeny and historical associations. TREE 13: 356–359.

Page, R. D. M. 2003. Tangled Trees: Phylogeny, Cospeciation, and Coevolution. Chicago: University of Chicago Press, 350.

Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. 2004. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. Bioinformatics 20: 289–290.

R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

R Core Team. 2023. R version 4.3.0 (2023-04-21 ucrt) "Already Tomorrow" Copyright (C) 2023 The R Foundation for Statistical Computing Platform: x86\_64-w64-mingw32/x64 (64-bit).

Rambaut, A. 2009. FigTree v1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67(5): 901.

Ramírez-Puebla, S. T., Servín-Garcidueñas, L. E., Ormenño-Orrillo, E., Vera-Ponce de León, A., Rosenbluth, M., Delaye, L., Martínez, J. & Martínez-Romero, E. 2015. Species in *Wolbachia*? Proposal for the designation of '*Candidatus Wolbachia bourtzisii*', '*Candidatus Wolbachia onchocercicola*', '*Candidatus Wolbachia blaxteri*', '*Candidatus Wolbachia brugii*', '*Candidatus Wolbachia taylora*', '*Candidatus Wolbachia collembolicola*' and '*Candidatus Wolbachia multihospitum*' for the different species within *Wolbachia* supergroups. *Systematic and Applied Microbiology* 38: 390–399.

Rodriguero, M. S. 2009. Origen y consecuencias de la reproducción asexual en una especie de gorgojo de importancia agronómica. PhD thesis.

Rodriguero, M. S., Confalonieri, V. A., Guedes, J. V. C., & Lanteri, A. A. 2010. *Wolbachia* infection in the tribe Naupactini (Coleoptera, Curculionidae): Association between thelytokous parthenogenesis and infection status. *Insect Molecular Biology* 19(5): 631–640.

Rodriguero, M. S., Lanteri, A. A. & Confalonieri, V. A. 2013. Speciation in the asexual realm: Is the parthenogenetic weevil *Naupactus cervinus* a complex of species in statu nascendi? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68(3): 644–656.

- Rodriguero, M. S., Scannapieco, A. C., Monti, D. S., Chifflet, L., Elias-Costa, A. J., Lanteri, A. A. & Confalonieri, V. A. 2021. Dependence of egg hatching on *Wolbachia* density in a parthenogenetic weevil revealed by antibiotic treatment. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 169(4): 384–392.
- Roig– Juñent, S., Claps, L. E., & Morrone, J. J. 2014. Biodiversidad de artrópodos argentinos. Editorial Sociedad Entomológica Argentina, Mendoza.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12): 1572–1574.
- Sanaei, E., Husemann, M., Seiedy, M., Rethwisch, M., Tuda, M., Toshova, T. B., Kim, M. J., Atanasova, D. & Kim, I. 2019. Global genetic diversity, lineage distribution, and *Wolbachia* infection of the alfalfa weevil *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). *Ecology and Evolution* 9: 9546–9563.
- Sanaei, E., Charlat, S. & Engelstädter, J. 2021. *Wolbachia* host shifts: routes, mechanisms, constraints and evolutionary consequences. *Biological Reviews* 96(2): 433–453.
- Sanaei, E., Albery, G. F., Yeoh, Y. K., Lin, Y. P., Cook, L. G., & Engelstädter, J. 2023. Host phylogeny and ecological associations best explain *Wolbachia* host shifts in scale insects. *Molecular Ecology* 32(9): 2351–2363.
- Sanderson, A. R. 1973. 3.—The Cytology of the Parthenogenetic Australian Weevil *Listroderes costirostris* Schönh. *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh* 69(3): 71–89.
- Scataglioni, M. A., Lanteri, A. A. & Confalonieri, V. A. 2005. Phylogeny of the *Pantomorus–Naupactus* complex based on morphological and molecular data (Coleoptera: Curculionidae). *Cladistics* 21(2): 131–142.
- Schilthuizen, M. & Stouthamer, R. 1997. Horizontal transmission of parthenogenesis inducing microbes in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London B* 264: 361– 366.

- Sheehan, K. B., Martin, M., Lesser, C. F., Isberg, R. R. & Newton, I. L. G. 2016. Identification and characterization of a candidate *Wolbachia pipientis* type IV effector that interacts with the Actin cytoskeleton. *mBio* 7, e00622– 16.
- Sicard, M., Dittmer, J., Greve, P., Bouchon, D. & Braquart– Varnier, C. 2014. A host as an ecosystem: *Wolbachia* coping with environmental constraints. *Environmental Microbiology* 16: 3583–3607.
- Sintupachee, S., Milne, J. R., Poonchaisri, S., Baimai, V. & Kittayapong, P. 2006. Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. *Microbial Ecology* 51: 294–301.
- Stahlhut, J. K., Desjardins, C. A., Clark, M. E., Baldo, L., Russell, J. A., Werren, J. H. & Jaenike, J. 2010. The mushroom habitat as an ecological arena for global exchange of *Wolbachia*. *Molecular Ecology* 19(9): 1940–1952.
- Stolzer, M. L., Lai, H., Xu, M., Sathaye, D., Vernot, B *et al.*, 2012. Inferring duplications, losses, transfers and incomplete lineage sorting with nonbinary species trees. *Bioinformatics* 28: 409–415.
- Suomalainen, E. 1969. Evolution in parthenogenetic Curculionidae. *Evolutionary Biology* 3: 261–296.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. & Hurst, G. D. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Reviews in Microbiology* 53: 71–102.
- Taylor, M. J., Bandi, C. & Hoerauf, A. 2005. *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Advances in Parasitology* 60: 245–284.
- Thompson, J. N. 2010. Four central points about coevolution. *Evolution: Education and Outreach* 3: 7–13.
- Thompson, J. N. & Medel, R. 2010. Coevolution and the web of life. *Evolution: Education and Outreach* 3: 6.
- Thompson, J. N. 2012. The role of coevolution. *Science* 335: 410–411.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position– specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22): 4673– 4680.

Toomey, M. E., Panaram, K., Fast, E. M., Beatty, C. & Frydman, H. M. 2013. Evolutionarily conserved *Wolbachia*– encoded factors control pattern of stem– cell niche tropism in *Drosophila* ovaries and favor infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(26): 10788– 10793.

Turelli, M., Cooper, B. S., Richardson, K. M., Ginsberg, P. S., Peckenpaugh, B., Antelope, C. X., ... & Hoffmann, A. A. 2018. Rapid global spread of wRi– like *Wolbachia* across multiple *Drosophila*. *Current Biology* 28(6): 963–971.

Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P., & Boulétreau, M. 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host– parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution* 16(12): 1711–1723.

Vepsäläinen, K. & Järvinen, O. 1979. Apomictic parthenogenesis and the pattern of the environment. *American Zoologist* 19(3): 739–751.

Weeks, A. R., Turelli, M., Harcombe, W. R., Reynolds, K. T. & Hoffmann, A. A. 2007. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biology* 5: e114.

Weinert, L. A., Araujo– Jnr, E. V., Ahmed, M. Z, & Welch, J. J. 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282(1807): 0249.

Werren, J. H., Zhang, W. & Guo, L. R. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*– reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society B* 261: 55–63.

Werren, J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology* 42: 587–609.

- Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* 6(10): 741-747.
- Werren, J. H. & Bartos, J. D. 2001. Recombination in *Wolbachia*. *Current Biology* 11: 431–435.
- Werren, J. H. & Windsor, D. M. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 267: 1277–1285.
- White, P. M., Pietri, J. E., Debec, A., Russell, S., Patel, B. & Sullivan, W. 2017. Mechanisms of horizontal cell– to– cell transfer of *Wolbachia* spp. in *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology* 83: e03425–e03416.
- Wilmes, M., Meier, K., Schiefer, A., Josten, M., Otten, C. F., Klockner, A., Henrichfreise, B., Vollmer, W., Hoerauf, A. & Pfarr, K. 2017. AmiD is a novel peptidoglycan amidase in *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 353.
- Yang, Z. & Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Rev Genet* 13: 303–314.
- Zhou, W., Rousset, F. & O'Neill, S. 1998. Phylogeny and PCR– based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265(1395): 509–515.
- Zug, Roman; Hammerstein, Peter. 2015. Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. *Biological Reviews* 90(1): 89– 111.

## 9– ANEXOS

9.1 ANEXO 1. Tabla S1. Matriz de 45 caracteres morfológicos de 31 especies de gorgojos del complejo *Pantomorus– Naupactus*, incluyendo las unidades evolutivas recientemente reportadas para la especie nominal *N. cervinus* (Rodríguez *et al.*, 2013). En las columnas se enumeran del 0– 44 los caracteres morfológicos y en las filas las especies de gorgojos. Matriz realizada por María Guadalupe del Río.

	0	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		
<i>Cyrtomon_inhalatus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1
<i>Aramigus_tessellatus_tessellatus</i>	2	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	?	?	?	
<i>Aramigus_tessellatus_santafecinus</i>	2	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	[1 2]	0	2	?	?	?		
<i>Aramigus_tessellatus_palidus</i>	2	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	[1 2]	0	2	0	0	1		
<i>Aramigus_conirostris1</i>	0	2	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	?	?	
<i>Atrichonotus_taeniatulus</i>	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	
<i>Eurymetopus_fallax</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	?	2	0	1	1	0	0	?	?		
<i>Eurymetopus_globosus</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	?	2	0	1	1	0	0	?	?			
<i>Floresianus_sordidus</i>	0	1	2	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	2	1	0	1	0	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2	0	1	1	0	0	?		
<i>Lanterius_inermis1</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Naupactus_cervinus_EC</i>	0	1	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	2	2	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	
<i>Naupactus_cervinus_FC</i>	0	1	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	2	2	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	
<i>Naupactus_cervinus_GC</i>	0	1	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	2	2	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	
<i>Naupactus_cinereidorsum</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0		
<i>Naupactus_condecoratus</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Naupactus_dissimilis</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	2	0	0	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	
<i>Naupactus_dissimulator1</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	2	2	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Naupactus_leucoloma1</i>	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	[1 2]	1	0	1	0	0	0	1	0	?	?		
<i>Naupactus_minor1</i>	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	?	?	
<i>Naupactus_peregrinus</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	

<i>Naupactus_purpureoviolaceus</i>	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>Naupactus_tremolerasi</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	
<i>Naupactus_tucumanensis</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
<i>Naupactus_verecundus</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	
<i>Naupactus_versatilis1</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0		
<i>Naupactus_xanthographus</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	2	0	0	1	0	2	2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1		
<i>Pantomorus_auripes</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	?	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	
<i>Pantomorus_cinerosus</i>	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	?	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	
<i>Pantomorus_postfasciatus_W</i>	1	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	2	?	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
<i>Pantomorus_postfasciatus_U</i>	1	1	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	2	?	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
<i>Pantomorus_viridisquamosus</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	2	1	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

## 9.2 ANEXO 2. Lista de caracteres morfológicos.

0. Rostro, curvatura de márgenes laterales: subparalelos (0); levemente convergentes hacia adelante (1); fuertemente convergentes hacia adelante (2).
1. Rostro, carenas laterales: ausentes (0); presentes (1).
2. Piezas bucales, prementón, setas largas en el margen externo: presentes (0); ausentes (1).
3. Rostro, impresión anteocular: evidente (0); no evidente (1).
4. Cabeza, ojos: planos (0); convexos (1); fuertemente convexos (2)
5. Cabeza, constricción post-ocular: ausente o muy sutil (0); presente (1).
6. Antenas, forma del escape: clavada, ancha (0); capitada, delgada (1).
7. Antenas, largo del escapo: no alcanza el margen posterior del ojo (0); alcanza el margen posterior del ojo (1).
8. Antenas, largo relativo del antenómero 1 y 2: 1 y 2 de similar largo (0); 2 más de 1.5 veces más largo que el 1 (1).
9. Antenas, longitud de los antenómeros 4 a 7: claramente más largos que anchos (0); aproximadamente tan largos a un poco más largo que ancho (1).
10. Pronoto, forma: subcónico (0); subcilíndrico (1).
11. Pronoto, convexidad del disco (machos): plano a ligeramente convexo (0); fuertemente convexo (1).
12. Pronoto, impresiones longitudinales laterales: presentes (0); ausentes (1).
13. Pronoto, tubérculos laterales: ausentes (0); presentes (1).
14. Pronoto, macroescultura del tegumento: foveas irregulares, conectadas (0); granuloso (1); ligeramente granuloso a liso (2).

15. Escutelo, revestimiento: presente (0); ausente (1).
16. Élitros, forma de escamas: redondeadas (0); ovaladas (1)
17. Élitros, setas: decumbentes (0); erectas (1).
18. Élitros, con franjas blancas oblicuas ascendentes, en los lados del tercio posterior: ausentes (0); presentes (1).
19. Élitros, franjas blancas a lo largo de intervalos 6 a 8: ausentes (0); presentes (1).
20. Élitros, máculas rectangulares de color marrón en la mitad del intervalo 3º: ausentes (0); presentes (1).
21. Élitros, contorno del borde anterior: fuertemente bisinuado (0); ligeramente bisinuado (1); recto (2).
22. Élitros, desarrollo de los húmeros: bien desarrollados (0); reducidos (1); ausentes (2).
23. Élitros, tubérculo humeral: ausente (0); presente (1).
24. Élitros, declive del disco: ligeramente a fuertemente ascendente hacia el declive (0); disco elitral que no asciende hacia el declive (1).
25. Élitros, altura en vista lateral: elevado (0); plano (1).
26. Élitros, proximidad de las estrías 9 y 10: mucho más cerca entre sí a lo largo de los 2/3 posteriores (0) ligeramente acercadas entre sí (1)
27. Élitros, presencia de tubérculos apicales: ausentes (0); presentes (1).
28. Patas, separación de las coxas anteriores entre sí (hembras): contiguas (0); separadas (1).
29. Patas, ancho de los fémures anteriores: ligeramente más ancho que los fémures posteriores (0); claramente más ancho que los fémures posteriores (1).

30. Patas, hilera de dentículos en el borde interno de las tibia: ausentes o indistinguibles en todas las tibia (0); presente sólo en las tibia anteriores (1); presente en los tres pares de tibia (2).
31. Patas, mucro de tibia: presente sólo en las tibia anteriores (0); presente en las tibia anteriores y medias (1).
32. Patas, ápice metatibial: levemente ensanchado (0); claramente ensanchado (1).
33. Patas, corbícula en el ápice metatibial: bien desarrollada (0); indistinta, ápice metatibial engrosado (1); ausente (= ápice metatibial simple) (2)
34. Patas, longitud relativa de las crestas en el ápice metatibial: cresta dorsal claramente más larga que la cresta distal (0); peine dorsal y distal de aproximadamente la misma longitud (1); peine dorsal más corto que el peine distal (2).
35. Terminalia femeninos, forma del esternito VIII: subromboidal (0); suboval (1); subpentagonal (2).
36. Terminalia femenina, setas a los lados de los baculi, en su mitad posterior: ausente (0); con tres pares de setas largas (1); con hileras de varias setas (2).
37. Terminalia femenina, esclerotización de coxita distales: ligeramente esclerotizadas (0); fuertemente esclerotizadas, proyectadas en forma de uña corta (1); fuertemente esclerotizado, proyectadas en forma de uña larga (2)
38. Terminalia femenina, estilos: presentes (0); ausentes (1).
39. Conducto espermatecal: recto (0); ondulado a espiralado (1); enroscado (2).
40. Espermateca, paredes del cuerpo: ligeramente engrosadas en la porción proximal (0); fuertemente engrosado en la porción proximal (1).

41. Espermateca, forma y longitud del collum (= nódulo): cónico, corto (0); subcilíndrico, largo (1); subcilíndrico, largo y con prominencia basal (2)
42. Aedeago, longitud del lóbulo mediano en relación con sus apodemas (= temones): lóbulo mediano aproximadamente tan largo como sus apodemas (0); aproximadamente el doble de largo que sus apodemas (1).
43. Aedeago, forma del ápice del lóbulo mediano: agudo a redondeado (0); en forma de flecha (1).
44. Aedeago, escleritos del saco interno: ausentes o si presentes no del tipo *Cyrtomon* (0); escleritos consisten en un par de barras laterales a cada lado de una pieza piriforme conectada con el conducto eyaculador = tipo *Cyrtomon* (1).