

2010

RELACIONES FILOGENÉTICAS Y DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) DE MÉXICO, BASADA EN LA SECUENCIA DEL CITOCROMO OXIDASA I

Aurora M. Alvarado



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

**RELACIONES FILOGENÉTICAS Y DIVERSIDAD  
GENÉTICA EN POBLACIONES DE *Anthonomus  
grandis* (Coleoptera: Curculionidae) DE MÉXICO,  
BASADA EN LA  
SECUENCIA DEL CITOCROMO OXIDASA I**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Recursos Bióticos

Presenta

Ing. Agro. Aurora Mariana Alvarado

Santiago de Querétaro  
Octubre de 2010



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Recursos Bióticos

**RELACIONES FILOGENÉTICAS Y DIVERSIDAD GENÉTICA EN  
POBLACIONES DE *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) DE  
MÉXICO, BASADA EN LA SECUENCIA DEL CITOCROMO OXIDASA I**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Recursos Bióticos

**Presenta:**

Aurora Mariana Alvarado

**Dirigida por:**

Dr. Robert W. Jones

SINODALES

Dr. Robert W. Jones  
Presidente

Dra. Mahinda Martínez y Díaz  
Secretario

Dr. Luis G. Hernández S.  
Vocal

Dr. Rolando T. Bárcenas L.  
Suplente

Dr. Fausto Arellano Carbajal  
Suplente

Biol. Jaime Ángeles Angeles  
Director de la Facultad de  
Ciencias Naturales

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Dr. Luis G. Hernández Sandoval  
Director de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Octubre de 2010  
México

## RESUMEN

El picudo del algodón *Anthonomus grandis* es la más importante plaga del algodón en el continente americano. Evidencias históricas y morfológicas indican que su origen es Mesoamericano. En este estudio se llevaron a cabo análisis de variación genética, flujo de genes y filogenia en seis poblaciones de *A. grandis* de México. Para ello, se secuenció parte del gen Citocromo Oxidasa I (COI). La variación genética, flujo de genes y estructuración de las poblaciones mexicanas fue estimada a través de un análisis de varianza molecular (AMOVA) hecho con las secuencias de 67 individuos. Dicho análisis mostró una alta variabilidad genética en las poblaciones del sur de México las cuales se encuentran sobre hospederas silvestres (*Hampea* y *Cienfuegosia*). Se evidencia también una clara estructuración entre las poblaciones del este y oeste de México. El análisis filogenético se llevó a cabo con los haplotipos encontrados y los ya publicados en el GenBank. En el árbol obtenido por máxima parsimonia se obtienen dos clados, los cuales están fuertemente asociados con las regiones este y oeste de América y ambas relacionadas con poblaciones del sur de México. Esas evidencias son congruentes con la hipótesis del origen Mesoamericano de la especie, con una posterior dispersión al noreste y noroeste en México y reciente colonización de algodón cultivado en el sur de Estados Unidos y Sur América.

**(Palabras claves:** *Anthonomus grandis*, COI, variación genética, análisis filogenético).

## SUMMARY

The boll weevil *Anthonomus grandis* Boh. is most serious insect pest of cotton in America. This study investigated population genetics of *A. grandis*. Six populations of *Anthonomus grandis* Boh. from Mexico were analyzed. The weevils were captured on cultivated and wild host plants (*Hampea*, *Cienfuegosia* and cotton cultures). Sequences of 314 bp region of the mitochondrial COI gene were applied to detect diversity and genetic differentiation of *A. grandis* populations. The degree of genetic diversity was measured with an analysis of molecular variance (AMOVA). Comparisons the genetic diversity between populations, It showed that the genetic diversity of Southern Mexico (on wild host plants) was higher than that of cotton cultures. Phylogenetic analysis of haplotypes, revealed a significant regional subdivision: Eastern and Western of America. This support the hypothesis proposed for Burke, about Meso-American origin of boll weevil.

**(Keywords:** *Anthonomus grandis*, COI, genetic diversity, phylogenetics).

## ***DEDICATORIA***

*A mi querida madre, Judith Alvarado  
incansable guardiana de mis sueños  
y a Rolis mi hermanito consentido.*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Jones por invitarme a participar en este proyecto

A la Dra Mahinda Martínez y al Dr. Luis Hernández por permitirme trabajar en el Laboratorio de Botánica.

Al Dr. Rolando Bárcenas por su paciencia y buena disposición.

A Víctor (*mi San Víctor de Reading, Señor de las PCR*), Verónica Torres y Rigoberto López Zavala por su invaluable colaboración y sugerencias.

A Yola, Luz, Mónica y Alejandro por su colaboración y sobre todo por su amistad y los inolvidables momentos de camaradería.

A Lizbeth Pérez, Arcelia Cortes, Julia Vega y Horacio Palancares por ser mi “familia mexicana” brindarme su cariño y apoyo durante este tiempo.

A Santiago por su amistad, amor y comprensión.

A todos aquellos que me brindaron su amistad e hicieron de ésta una gran experiencia no solo académica sino de vida.

## INDICE

RESUMEN .....	i
SUMMARY .....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
INDICE .....	v
INDICE DE CUADROS .....	vii
INDICE DE FIGURAS .....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISION DE LITERATURA .....	4
2. 1. Picudo del algodón, <i>Anthonomus grandis</i> .....	4
2.1.1. Origen .....	4
2.1.2. Hospederos silvestres de <i>A. grandis</i> .....	5
2.1.3. Dispersión .....	6
2.1.4. <i>Anthonomus hunteri</i> especie hermana de <i>A. grandis</i> .....	8
2.2. ADN Mitocondrial.....	8
2.3. Hipótesis .....	10
2.4. Objetivos.....	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
3.1. Colección del material biológico y trabajo de laboratorio.....	11
3.2. Análisis y Alineamiento de Secuencias.....	13
3.3. Análisis de la Diversidad Genética.....	14
3.4. Diferenciación Genética y Flujo de Genes.....	15
3.5. Análisis Filogenético .....	15

3.5.1. Parsimonia .....	17
3.5.2 Bayesiano .....	17
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	18
4.1. Diversidad Genética Intrapoblacional .....	18
4.2. Diferenciación Genética y Flujo de Genes.....	20
4.3. Análisis Filogenético .....	20
4.3.1. Análisis de Parsimonia. ....	21
4.3.2. Análisis Bayesiano. ....	21
V. CONCLUSIONES. ....	25
LITERATURA CITADA .....	26
ANEXOS .....	34
Apéndice 1.- Algunos hospederos silvestres de <i>A. grandis</i> . ....	35
Apéndice 2.- Imágenes de geles de los productos de PCR obtenidos con los primers C1-J1718 y C1-J2191 .....	36
Apéndice 3.- Alineamiento de las secuencias de haplotipos de <i>A. grandis</i> usados para el análisis filogenético. ....	37



## INDICE DE CUADROS

		Pag.
Cuadro 3.1	Localidad y Hospedero de las poblaciones de <i>A. grandis</i> y <i>A. hunteri</i> colectadas	12
Cuadro 3.2	Haplotipos de <i>A. grandis</i> publicados por Scataglini (2006)	16
Cuadro 3.2	Haplotipos de <i>A. grandis</i> usados en el análisis filogenético.	16
Cuadro 4.1	Distribución de los haplotipos de <i>A. grandis</i> en las poblaciones muestreadas.	19
Cuadro 4.2	Diversidad genética para cada población de <i>A. grandis</i> en México.	19
Cuadro 4.3	Valores de diferenciación genética en las poblaciones de <i>A. grandis</i> en México.	20

## INDICE DE FIGURAS

Fig		Pag
1 y 2	Picudo del algodón, <i>Anthonomus grandis</i> .	4
3	Dispersión de <i>A. grandis</i> propuesta por Burke (1986).	7
4	Sitios de colectas de <i>Anthonomus grandis</i> en plantas silvestres y cultivadas en México.	11
5	Cladograma de haplotipos de COI encontrados en las poblaciones de <i>Anthonomus grandis</i> . Boh. generado por el análisis de parsimonia.	22
6	Cladograma de los haplotipos de <i>Anthonomus grandis</i> . Boh, obtenido del Mr. Bayes. (2 000 000 de generaciones).	23

# I. INTRODUCCIÓN

El picudo del algodón *Anthonomus grandis* Boheman, es la plaga de mayor importancia en cultivos de algodón en América (Burke et al. 1986). Actualmente, se encuentra en todas las regiones algodonerías de México, Centroamérica, Arizona, Texas y sureste de los Estados Unidos (Roehrdanz 2001). En Suramérica éste se encuentra en Brasil, Colombia, Venezuela, Paraguay y el norte de Argentina (Lanteri et al. 1999.). Se ha estimado que el costo económico anual de la plaga es mayor a 200 millones de dólares en los Estados Unidos y aunque no calculados, los costos en México, Centro y Suramérica, también son considerables (Vázquez 1998, Haney et al. 2009). Además del daño directo que ocasiona la plaga, se suman los resultantes de su control, como el uso de insecticidas, lo que frecuentemente provoca una serie de brotes de otras plagas y causa contaminación del medio ambiente con riesgos a la salud pública (Cate et al. 1990). Esta plaga tiene una gran habilidad de dispersión (Guerra 1988), no solo por ser buenos voladores sino también por la posibilidad de que sus huevos, larvas y pupas sean transportados dentro de los botones de algodón (Falcon et al. 1986, Manessi 1997).

En cuanto al origen de esta plaga, la mayoría de los autores proponen las tierras bajas tropicales de Mesoamérica, es decir, sur y sureste de México y Centroamérica (Burke et al. 1986, Jones 2001). Estos autores sugieren que la dispersión hacia el norte fue hacia el noroeste de México y sur de Arizona, así como hacia el noreste de México y que posiblemente esto tuvo lugar durante el Pleistoceno. Hace un poco más de 100 años, hubo una rápida dispersión de la plaga por todo el Cinturón Algodonero del sureste de Estados Unidos debido a la disponibilidad del algodón cultivado como hospedero (Loftin 1946, Jones 2006); así como la colonización de Suramérica, es también, relativamente reciente, muy

probablemente de material contaminado proveniente de Norteamérica (Burke *et al.* 1986).

Aunque, se conoció a *A. grandis* primero como plaga de algodón, las evidencias indican que *A. grandis* evolucionó sobre árboles tropicales del género *Hampea* en el sur de México (Burke *et al.*, 1986, Jones, 2001). Un análisis filogenético indica que el ancestro del complejo de especies *A. grandis* estuvo restringido a *Hampea* para su reproducción (Jones 2001). Hay 21 especies de *Hampea* distribuidas por México, Centroamérica y norte de Colombia (Fryxell 1979). Por otra parte, México es uno de los centros de domesticación del algodón, y por lo tanto, es muy probable que sea sede de evolución de las plagas asociadas a este cultivo (Brubaker y Wendel 1994, Jones 2001). Es importante aclarar el origen de *A. grandis* a fin de entender su evolución y comportamiento en toda su distribución geográfica, para lo cual los avances en técnicas moleculares nos brindan útiles herramientas para alcanzar este objetivo.

Las técnicas moleculares han resultado ser útiles en varias ramas de la biología. Una de ellas es la sistemática, dando origen a la sistemática molecular. Tres áreas de aplicación son: a) la estructura genética de poblaciones, b) delimitación de especies y c) inferencias filogenéticas (Baverstock y Moritz, 1996). Por lo que su aplicación ofrece la oportunidad de analizar la diversidad genética de las poblaciones de *A. grandis* y proponer hipótesis sobre la dispersión de la especie y los cambios genéticos ocurridos en el proceso.

Estudios previos sobre origen y dispersión del picudo del algodón, tomaron en cuenta aspectos morfológicos, comportamiento y también genético de la especie (Isoenzimas, RAPD y RFLP). Sin embargo, sigue siendo un tema de controversia. Los estudios moleculares de *A. grandis* se han enfocado principalmente en poblaciones de Estados Unidos y Suramérica. Sin embargo, son muy escasos los estudios genéticos de las poblaciones de *A. grandis* en México y sólo en algunos se han usado técnicas moleculares para estudiar la variación de su genoma a lo largo de su distribución (Scataglini *et al.* 2000; Roehrdanz 2001;

Lanteri *et al.* 2003; Kim y Sappington, 2004). Por lo que se considera pertinente emprender este estudio a fin de generar información que contribuya a dilucidar el origen del picudo del algodónero.

En el presente trabajo se pretende determinar las relaciones de las poblaciones de *Anthonomus grandis* presentes en México y su dispersión, mediante el uso de las secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI). Dicha secuencia han demostrado suficiente variación intra-específica para distinguir poblaciones de insectos (Avisé 2004).

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2. 1. Picudo del algodón, *Anthonomus grandis*.

#### 2.1.1. Origen

*Anthonomus grandis* Boheman (Fig 1 y 2), el picudo del algodón, es la plaga insectil más perjudicial en toda América. Los primeros reportes de daños sobre algodón se registraron alrededor de 1880 cerca de Monclova, Coahuila (Riley 1885). Posteriormente, fue identificado como *Anthonomus grandis* (Townsend 1895). En cuanto a Estados Unidos, el primer informe de daño se dio en 1894, lo que generó una serie de esfuerzos dirigidos a dilucidar el lugar de origen, plantas hospederas y rutas de dispersión de este insecto (Townsend 1895, Fryxell y Lukefarhr 1967, Burke *et al.*1986, Jones 2006)

De los estudios realizados, la mayoría de los autores concluyeron que el picudo del algodón era originario de Mesoamerica (sur y sureste de México). Esto basado en la adaptación de la plaga a las condiciones tropicales de estos lugares, así como la variación geográfica, relación con especies hermanas de *Anthonomus* de México y Centroamérica y a las plantas hospederas (Burke *et al.*1986, Burke 1986, Jones 2001).



Fig 1 y 2. El picudo del algodón *Anthonomus grandis*.

Burke (1986) concluyó que existían tres formas reconocibles de *Anthonomus grandis*. Morfológicamente todas las formas son similares y su identificación es problemática. La identificación de las formas está basada principalmente en las áreas en las que se encuentran y su preferencia en cuanto a hospederos. Se tienen entonces:

a) *El picudo del Sureste*, el cual se encuentra sobre algodón cultivado en Estados Unidos, Haití, República Dominicana, Venezuela, Colombia, Brasil, Paraguay y Argentina.

b) *El picudo mexicano*, sobre algodón cultivado y hospederos silvestres en México, Centroamérica y en Arizona.

c) *El picudo "thurberia"* que se encuentra sobre *Gossypium thurberi* en Arizona y el noroeste de México.

### **2.1.2. Hospederos silvestres de *A. grandis***

Por mucho tiempo, se especuló que el hospedero ancestral de *A. grandis* era el algodón (*Gossypium spp*), posiblemente *Gossypium hirsutum* o *Gossypium aridum* en el sur de México o Guatemala. Sin embargo, evidencias actuales indican que el hospedero original eran especies del género *Hampea*, el cual es endémico de México, Centroamérica y norte de Colombia y posee 21 especies distribuidas en dicha área (Burke *et al.* 1986; Jones 2001). Análisis filogenéticos sugieren que *Hampea* se diversificó en el sur de México y norte de Centroamérica, y luego se dispersó hacia el norte y el sur (Jones *et al.* 1997), lo que hizo posible un proceso de coevolución generado por la interacción planta-insecto provocando presiones de selección que llevaron a la especialización del insecto (Percy 2000)

Esta hipótesis se basa principalmente en cuatro evidencias:

a) El “complejo de especies *A. grandis*”, conformado por *A. grandis* Boheman, *A. hunteri* Burke y Cate, *A. mallyi* Jones y Burke, *A. palmeri* Jones y Burke y *A. townsendi* Jones y Burke; utilizan exclusivamente especies de *Hampea* para su reproducción (Burke y Cate, 1979; Jones y Burke, 1997).

b) Análisis filogenéticos indican que el ancestro de este complejo de especies probablemente estuvo restringido a *Hampea* para su reproducción (Jones 2001).

c) La diversidad de parásitos que atacan a las especies de *Anthonomus* en plantas de *Hampea* es mucho mayor que la que se encuentra en algodón (Burke *et al.* 1986; Cate *et al.* 1990). Además estas especies de parásitos ofrecen un amplio rango de especificidad y posibilidades para el control biológico del picudo (Jones 1998).

d) El complejo de especies *A. grandis* presenta un comportamiento muy específico a la morfología y fenología de *Hampea* (Stansly 1985; Jones y Baro-Peruyero, 2002).

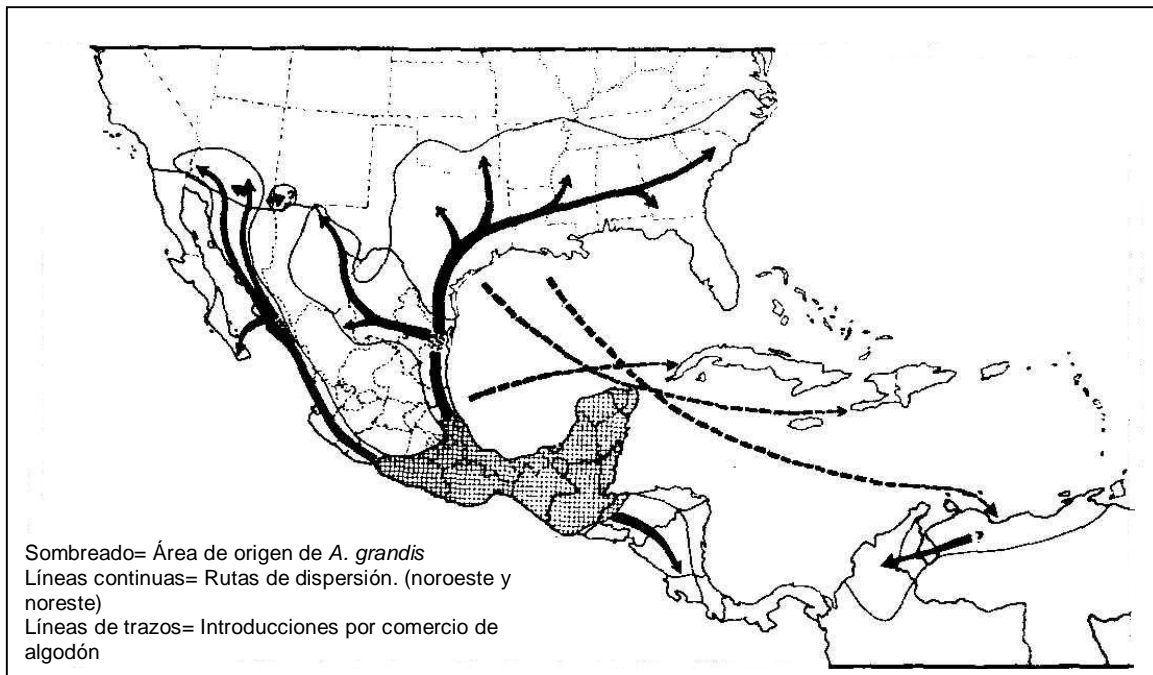
### **2.1.3. Dispersión**

La disciplina que estudia la distribución de los seres vivos tanto en el tiempo como en el espacio, es la biogeografía. Uno de los enfoques biogeográficos para explicar la distribución de los seres vivos es el dispersalismo. El objetivo básico de éste, es descubrir la historia biogeográfica de un taxón, a través de la dispersión a partir de un centro de origen (Morrone 2002).

Partiendo de este enfoque Burke *et al.* (1986) proponen la hipótesis de la dispersión natural de *A. grandis* desde las selvas del sur de México (posible centro de origen) a lo largo de las costas del Pacífico y del Golfo, es decir, hacia el



noroeste y noreste de México y Arizona lo que tuvo lugar antes o durante el Pleistoceno (ver Fig 3). La dispersión estuvo acompañada por cambios en los hospederos naturales (*Hampea*) a especies silvestres de *Gossypium* y otras *Gossypieae*. La selección natural habría favorecido la adaptación de las poblaciones a las nuevas condiciones ambientales, las cuales eran más áridas y secas que las de su área de distribución original, mientras que la rápida dispersión a través del Cinturón de Algodón del sureste de Estados Unidos y en Suramérica ocurrió hace poco más de un siglo y se dio por la disponibilidad de algodón cultivado como hospedero (Burke *et al.* 1986). La existencia de picudos preadaptados a condiciones áridas y secas permitió la rápida colonización de las nuevas áreas cultivadas del sur de Estados Unidos. La presencia del picudo en Suramérica se considera el resultado de introducciones sucesivas favorecidas por el auge y comercio del algodón.



**Fig. 3.** Dispersión de *A. grandis* propuesta por Burke (1986).

#### **2.1.4. *Anthonomus hunteri* especie hermana de *A. grandis*.**

*Anthonomus hunteri* (Burke y Cate 1979) fue descrita como la primera especie con una clara afinidad a *A. grandis*. Esta especie está restringida a *Hampea trilobata* Standley, la cual es endémica de la Península de Yucatán. *A. hunteri* muestra características morfológicas en los estados de larva, pupa y adulto con mayor parecido a *A. grandis* que cualquier otro del grupo. Burke (1986) propuso que el ancestro común de *A. grandis* y *A. hunteri* vivió sobre *Hampea* en el sur de México y Centroamérica, un evento de especiación hizo surgir a *A. grandis* sobre algunas especies de *Hampea* (en el presente está sobre *H. nutricia* Frixell, *H. rovirosae* Standley, y *H. latifolia* Standley) y *A. hunteri* quedó restringida a *Hampea trilobata*. Estudios filogenéticos posteriores usando marcadores morfológicos del grupo *Anthonomus grandis*, señalan a *A. hunteri* como especie hermana de *A. grandis* (Burke y Cate 1986, Jones, 2001)

## **2.2. ADN Mitocondrial**

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier fenotipo molecular de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN, que pueden ser detectados y su herencia monitoreada (Solis y Andrade 2005). Uno de los más usados son los basados en la secuenciación de fragmentos de ADN usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Estos marcadores se han convertido en útiles herramientas en muchos campos de la ciencia ya que permiten generar información sobre diversidad genética de poblaciones con el objeto de detectar: niveles de heterocigocidad y polimorfismos existentes, así como, distancias genéticas para estudios evolutivos. Estos datos permiten hacer inferencias sobre estructura de la población, delimitación de especies y la construcción de filogenias (Barverstock y Moritz, 1996).

Dentro de las secuencias de ADN usadas como marcadores moleculares tenemos las de ADN mitocondrial, este marcador ha sido utilizado en estudios de estructura de poblaciones y flujo de genes, hibridación, biogeografía y en el establecimiento de las relaciones filogenéticas (Simon *et al.* 1994, Avise. 2000). El ADN mitocondrial proporciona marcadores útiles para efectuar análisis intraespecíficos, además generó la primera información confiable y accesible para efectuar inferencias filogenéticas a este nivel (Avise *et al.* 1987; Morlais y Severson 2002). Lo antes mencionado debido a:

- No se recombina, lo que implica que los únicos cambios en él se deben a mutaciones a lo largo de varias generaciones.
- Tiene una tasa de sustitución más alta que el ADN nuclear, lo cual hace más fácil la resolución de diferencias entre individuos cercanamente emparentados.
- Presenta un alto número de copias y conservación de nucleótidos.
- Se hereda por línea materna, lo cual permite trazar líneas genéticas directas.

Dentro del genoma mitocondrial tenemos al gen que codifica para la proteína Citocromo Oxidasa I (COI), la cual es una subunidad del complejo citocromo oxidasa que transporta electrones y transloca proteínas a través de la membrana (Clary y Wolstenholme, 1985, Lunt *et al.* 1996). El sistema de clasificación animal basado en ADN han encontrado en COI una valiosa herramienta por la habilidad que muestran sus secuencias para identificar especies y determinar su lugar de procedencia, de allí que ésta sea usada como código de barra para animales (Hebert *et al.* 2003), por otra parte, el hecho de que este gen se herede por línea materna y esté libre de recombinación, hace que sea corto el tiempo de coalescencias de los linajes, lo que permite la resolución de filogenias y variación intraespecíficas. El gen COI ha sido usado ampliamente en estudios intraespecíficos de otras especies de picudos (Cognato *et al.* 2003, Cognato *et al.* 2005, Kim y Sappington, 2004).

## 2.3. Hipótesis

La hospedera original de *Anthonomus grandis* es *Hampea*, por lo tanto, las poblaciones de *A. grandis* que se encuentran sobre esas hospederas silvestres en México serán más ancestrales, mostrando mayor diversidad genética que las poblaciones que se encuentran sobre algodón cultivado en regiones norte y sur del lugar de origen. Esto debido a que los picudos que se desarrollarían habitualmente sobre plantas silvestres exhibirían una mayor variabilidad lo que les permitiría pasar al algodón cada vez que les fuera posible (Bartlett et al 1983; Roehrdanz y North 1992).

## 2.4. Objetivos

Objetivo general:

- Determinar la diversidad genética y construir una filogenia de *Anthonomus grandis*, basándose en la secuencia del COI.

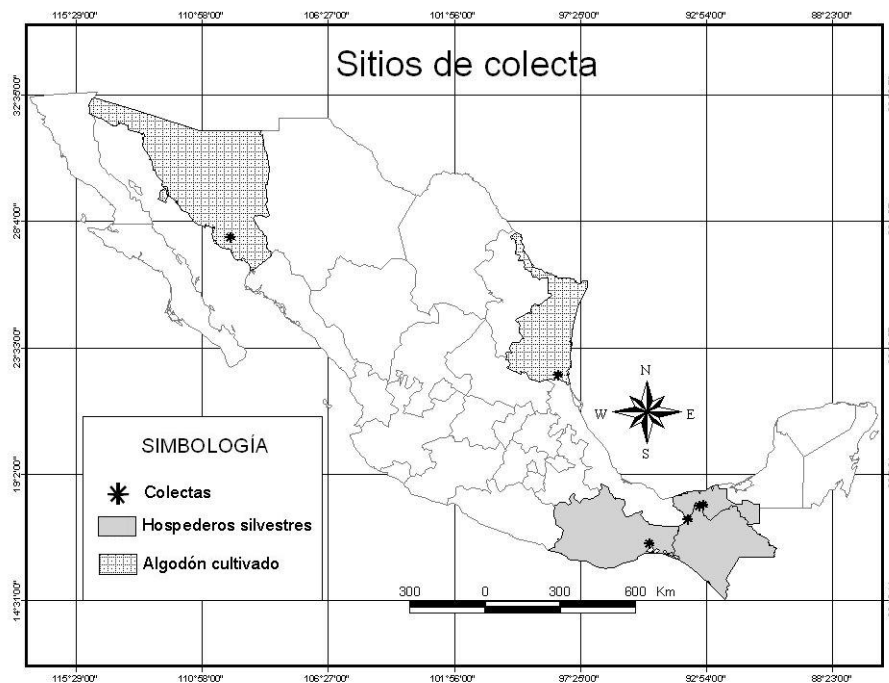
Objetivos específicos:

1. Estimar la diversidad genética de *A. grandis* de poblaciones de plantas hospederas silvestres y cultivadas de México.
2. Determinar la diferenciación genética entre las poblaciones de *A. grandis* de plantas hospederas silvestres y cultivadas de México.
3. Determinar las relaciones filogenéticas de las poblaciones de *A. grandis*.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Colección del material biológico y trabajo de laboratorio

Los insectos fueron colectados de dos formas: usando trampas de feromona y a través de colecta directa. *A. grandis* fue colectado sobre hospederas silvestres y cultivo de algodón (Fig. 4). Para las trampas se usó feromona de agregación comercial para *A. grandis* (Hercon Environmental Co., Emigsville, Pennsylvania, E.U.). Se modificaron las trampas a fin de preservar las muestras directamente en alcohol al 90%. Los insectos fueron preservados en alcohol al 90% y se mantuvieron congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción. Las colectas directas de *A. grandis* y *A. hunteri* (grupo externo) se efectuaron por medio de colecciones de adultos sobre sus plantas hospederas o por medio de colecta de botones florales infestados con el insecto. Estos botones fueron trasladados al laboratorio y puestos en contenedores para la emergencia de los adultos.



**Fig. 4.** Sitios de colectas de *Anthonomus grandis* Boh. en plantas silvestres y cultivadas de México.

Se colectaron muestras en poblaciones del sur, éstas se encontraban sobre hospederos silvestres y las dos poblaciones del norte se encontraban sobre algodón cultivado (Cuadro.3.1). Las muestras se encuentran depositadas en el Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Naturales (UAQ) y, las mismas fueron identificadas por el Dr. Robert Jones.

**Cuadro 3.1.** Localidad y hospedero de las poblaciones de *Anthonomus grandis* Boh. colectadas y del grupo externo *Anthonomus hunteri* Burke y Cate.

Especie	Región	Localidad	Coordenadas	Hospedero
<i>Anthonomus grandis</i>	Norte	<b>Sonora</b> Mpio. Cajeme	109° 56'06" 27°29' 21.01	Algodón cultivado
		<b>Tamaulipas</b> Mpio. Altamira	98° 10.69' 22° 34.42'	Algodón Cultivado
	Sur	<b>Chiapas.</b> Mpio. Reforma Miguel Hidalgo	93° 07.42' 17° 54.39'	<i>Hampea nutricia</i>
		<b>Tabasco</b> Mpio. Cárdenas	93° 32.09' 17° 23.77'	<i>Hampea nutricia</i>
		<b>Tabasco</b> Mpio. Villahermosa	92° 59.39' 17° 55.39'	<i>Hampea rovirosae</i>
		<b>Oaxaca</b> Mpio. Unión Hidalgo	94° 54.74' 16° 33.7'	<i>Cienfuegosia rosei</i>
<i>Anthonomus hunteri</i> (grupo externo)		<b>Campeche</b> Mpio. Escárcega Campo Exp El Tormento	90° 48.50' 18° 36.78'	<i>Hampea trilobata</i>

El ADN genómico fue extraído de cada individuo usando el DNeasy Tissue Kit (Qiagen Incorporated, Valencia, C.A), con algunas modificaciones del protocolo como el tiempo de incubación y el volumen final. La amplificación del fragmento se realizó a través de una reacción en cadena polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos usados para obtener la secuencia del citocromo oxidasa I son C1-

J1718 (5' GGA GGATTTGGAAATTGATTAGTTCC 3') diseñado por B. Farrel para escarabajos fitófagos y otros coleópteros y C1-J2191 (5' CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC 3') diseñado el Laboratorio Harrison, funcionando muy bien para varios órdenes de insectos (Simon *et al.* 1994). Cada reacción con 25 µl de volumen final, contenía aproximadamente: 2.5 µl de Buffer 10xPCR s/Mg, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.5 µl de dNTPs, 0.4 µl de cada "primer" (C1-J-1718 y C1-N-2191) cuya concentración era 10µM; 0.25 µl de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen Corporation) y 5 µl del ADN genómico. La reacción se llevó a cabo en el termociclador (TechneTC-412, Barloworld Scientific) usando el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94° C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto (desnaturalización), 45° C por 1 minuto (anillamiento) y 72° C por 2 minutos (extensión). Una fase de extensión final a 72° C por 7 min. Los productos obtenidos se mantuvieron a 4° C.

La visualización de los productos de PCR o amplicones, se hizo a través de una electroforesis tomando 2µl de producto de PCR y 1µl de buffer de carga (azul de bromofenol) colocándolos luego en una matriz de agarosa al 1% a 100 voltios por 30 min.

La purificación y secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo en el laboratorio comercial MacroGen Inc. (Corea del Sur), fue una secuenciación automática normal en un Secuenciador Automático 3730XL.

### **3.2. Análisis y Alineamiento de Secuencias.**

Las secuencias de *A. grandis* fueron leídas y editadas manualmente con Chromas 2.33. (Technelysium Pty. Ltd.). Se obtuvieron secuencias consensos, las cuales fueron sometidas al BLAST para comprobar su similitud con otras secuencias de *A. grandis* publicadas en GenBank Posteriormente las secuencias de *A. grandis* fueron alineadas con la secuencia del gen COI de *Drosophila*

*yakuba* (NCBI\_Reference Sequence: NP\_006903). Correspondiendo a las posiciones 264 a 664 de *D. yakuba* (Clary y Wolstenholme, 1985). A continuación se procedió a realizar un nuevo alineamiento con otras secuencias correspondientes a otros Coleópteros y a otros órdenes de insectos, lo que permitió observar aquellas áreas conservadas, esto a fin de disminuir la posibilidad de haber amplificado pseudogenes (Lunt et al., 1996). Para buscar la presencia de cambios en el marco de lectura de la región codificante (frame shifts) los cuales son indicadores de pseudogenes, se usó el programa Genewise2 ([www.ebi.uk/tools/wise2](http://www.ebi.uk/tools/wise2)), usando como referencia comparativa la secuencia de proteína COI de *Drosophila yakuba* (NCBI\_Reference Sequence: NP\_006903). Al haber certificado la ausencia de pseudogenes en las secuencias de *A. grandis*, se hizo el alineamiento “final” con el programa CLC Sequence Viewer 6.1 (<http://www.clcbio.com>).

### 3.3. Análisis de la Diversidad Genética

El análisis de varianza molecular (AMOVA), es un método basado en el análisis de la varianza de las frecuencias génicas, pero teniendo en cuenta el número de cambios nucleotídicos entre los haplotipos (Excoffier *et al.* 1992). Para los análisis de diversidad genética se usará la matriz de datos obtenida como resultado del alineamiento de las 67 secuencias de COI de las poblaciones mexicanas de *A. grandis* obtenidas.

Se utilizó el software DnaSP (DNA Sequence Polymorphism) versión 5.0 (Rozas et al. 2003), para calcular el AMOVA y así comprobar como se distribuye la diversidad genética de las poblaciones de *A. grandis* estudiadas, usando los estimadores diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y diversidad haplotípica (**H**). La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), es una medida más adecuada de variabilidad genética obtenida de secuencias, ya que no es dependiente del tamaño de la muestra ni del tamaño



de la secuencia; por lo que es más usada y permite comparaciones con otros estudios (Nei 1987).

### **3.4. Diferenciación Genética y Flujo de Genes**

La diferenciación genética entre las poblaciones analizadas se estimó utilizando el estadístico  $F_{st}$  (Hudson *et al.* 1992) el cual se basa en el número promedio de diferencias entre secuencias de la misma población y el número promedio de diferencias entre las secuencias de dos poblaciones diferentes. El  $F_{st}$  permite estimar la proporción de la variación genética que se encuentra dentro y entre las poblaciones. Por otra parte, este estimador y sus análogos permiten calcular el  $Nm$  o número efectivo de migrantes por generación. Los estimadores fueron calculados usando el módulo “Gene Flow” de DnaSP5 (<http://www.ub.es/dnasp/>).

### **3.5. Análisis Filogenético**

La reconstrucción filogenética o estimación de las relaciones entre las poblaciones de *A grandis*, se llevó a cabo con el alineamiento de las secuencias de los nuevos haplotipos encontrados en las poblaciones mexicanas estudiadas, más los 21 haplotipos que se encuentran publicados en el GenBank por Scataglini (2006) (Ver cuadro 3.2). El análisis filogenético se llevó a cabo usando dos metodologías: máxima parsimonia y análisis bayesiano, Huelsenbeck y Ronquits 2001, Eguiarte *et al* 2007). Se usó máxima parsimonia para maximizar la similitud evolutiva que se puede explicar como homóloga (por ancestría compartida) minimizando a su vez la homoplasia (similitud no heredada directamente del ancestro) y el criterio de optimización de máxima parsimonia es el cambio o evolución mínima. (Arnedo 1999). El enfoque bayesiano para la filogenética estima el árbol y medidas de incertidumbre para los grupos del árbol. El campo de la estadística bayesiana está cercanamente relacionado con Máxima

Verosimilitud. Análisis de simulaciones hechos a varios métodos de inferencia filogenética encontró que uno de los más precisos eran los de verosimilitud. Por lo tanto se considera el método bayesiano una alternativa rápida y precisa.

**Cuadro 3.2.** Haplotipos de *A. grandis* publicados en Genbank, por Scataglini (2006)

Haplotipo	Localidad	Estado/País	Hospedero
<b>Tx</b>	Lubbock	Texas / E.U.	Algodón cultivado
<b>Te</b>	Tecomán	Colima / México	Algodón cultivado
<b>Lo</b>	Londrina	Paraná / Brasil	Algodón cultivado
<b>Pe</b>	Puerto Península	Misiones/ Argentina	Algodón cultivado
<b>Ig</b>	P. N. Iguazú	Misiones/ Argentina	Vegetación silvestre

**Cuadro 3.3.** Haplotipos de *A. grandis* usados en el análisis filogenético.

Haplotipo	Localidad	Estado	País	Hospedero
<b>SM</b>	Sur de México	Chiapas Tabasco Oaxaca		Vegetación silvestre ( <i>Hampea nutricia</i> <i>Hampea rovirosae</i> <i>Cienfuegosia rosei</i> )
<b>Son</b>	Mpio. Cajeme	Sonora	México	Algodón cultivado
<b>Tm</b>	Mpio. Altamira	Tamaulipas		Algodón cultivado
<b>Tecomán</b>	Tecomán	Colima		Algodón cultivado
<b>Tx</b>	Lubbock	Texas	USA	Algodón cultivado
<b>Lo</b>	Londrina	Paraná	Brasil	Algodón cultivado
<b>Pe</b>	Puerto Península	Misiones		Algodón cultivado
<b>Iguazú</b>	P. N. Iguazú	Misiones	Argentina	Vegetación silvestre

### 3.5.1. Parsimonia

Las relaciones filogenéticas fueron estimadas usando PAUP 4.0 (Swofford 1998). Se realizó una búsqueda heurística bajo criterios de máxima parsimonia usando adición de secuencias al azar (random addition) con 1000 réplicas y el algoritmo TBR. (*tree bisection reconnection*). Los nodos del árbol fueron evaluados usando Bootstrap con 500 réplicas y las demás opciones por default.

### 3.5.2 Bayesiano

El alineamiento de los haplotipos para el análisis filogenético fue sometido a un análisis evolutivo para la selección del modelo evolutivo más ajustado a los datos. La evaluación llevada a cabo por Modeltest (Posada y Crandal 1998). Usando los resultados de LRT, determinó que el modelo que maximizaba el valor de probabilidad para el análisis de los datos era HKY+ G. Por lo tanto se tomó en consideración la diferencia de tasas entre transiciones y transversiones nucleotídicas (Ts/Tv) y las frecuencias nucleotídicas.

Modelo	-lnL	AIC	Frecuencias de Bases			
			A	C	G	T
HKY + G	1734.0750	3478.1499	0.32	0.19	0.15	0.33

Una vez seleccionado el modelo se hizo el análisis con en Mr Bayes 3.0b4 (Ronquist y Huelsenbeck 2003), con 4 cadenas de Markov, muestreando cada 1000 generaciones. Se estimaron los valores de los parámetros del modelo evolutivo a partir de los datos, luego fueron iniciados con las propiedades a priori predeterminadas en Mr. Bayes. Se eliminaron del análisis el 25% de los árboles (Burnin=501). Con los árboles restantes se realizó un árbol consenso utilizando la regla del 50% (50% Majority-rule consensus tree)

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1. Diversidad Genética Intrapoblacional

Se alinearon 67 secuencias parciales de COI correspondiente a las 6 poblaciones de *A. grandis* estudiadas (ver Cuadro 4.1), de un total de aproximadamente 498 pb el número de posiciones alineadas se redujo a 314 pb al eliminar aquellas áreas que resultaron problemáticas para alinear, como sugiere Lunt *et al.* 1996. Se identificaron en total 45 sitios polimórficos. Se encontraron un total de 18 haplotipos en las poblaciones del sur y norte de México. Al comparar los nuevos haplotipos mexicanos obtenidos con los de Scataglini (2006), se encontró que tres de estos haplotipos se correspondieron a tres reportados por Scataglini, éstos fueron: Son3=Tecomán5, SM5= Tecomán4 y SM8= Tx1. En las poblaciones del sur (sobre hospederos silvestres), el haplotipo SM1 resultó el más frecuente y se encontró en todas las poblaciones sobre *Hampea*. Los haplotipos de Sonora (Son) estuvieron asociados solo a esa localidad. (Cuadro 4.1) La población de Oaxaca fue la que mostró mayor cantidad de haplotipos (6). Tamaulipas la de menor cantidad de haplotipos (2), uno de los cuales (Tm1) se encontraba también en Chiapas.

Se observó una alta diversidad nucleotídica total ( $\pi = 0.030 \pm 0.002$ ) y haplotípica ( $H = 0.92 \pm 0.001$ ) como algunas reportadas para otras especies de Coleópteros (Ruiz *et al.* 2007 y Cai *et al.* 2008). Las poblaciones del sur mostraron los niveles más altos de diversidad genética. (Cuadro 4.2), siendo la población sobre *Cienfuegosia rosei* en Oaxaca, la población que mostró mayor diversidad. Las poblaciones del norte de México (Sonora y Tamaulipas) mostraron baja diversidad siendo Tamaulipas la menos diversa ( $\pi = 0.001 \pm 0.0004$ ,  $H = 0.43 \pm 0.13$ ).

**Cuadro 4.1.** Distribución de los haplotipos de *A. grandis* en las poblaciones muestreadas.

<b>Población</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Haplotipos</b>
Chiapas	<i>Hampea nutricia</i>	Sur	<b>SM1(4), SM4(2), Tm1(2), SM7(2), SM8(2)</b>
Tabasco	<i>Hampea nutricia</i>	Sur	<b>SM1(4), SM3(1), SM4(1), SM6(2), SM9(1), SM12(2)</b>
Tabasco	<i>Hampea rovirosae</i>	Sur	<b>SM1(2), SM2(1), SM6(3), SM11(1), SM12(3)</b>
Oaxaca	<i>Cienfuegosia rosei</i>	Sur	<b>SM2(1), SM5(3), SM6(2), SM9(3), SM10(1), SM11(1)</b>
Sonora	Cultivo de Algodón	Noroeste	<b>Son1(1), Son2(8), Son3(1), Son4(2)</b>
Tamaulipas	Cultivo de Algodón	Noreste	<b>Tm1(8), Tm2(2)</b>

**Cuadro 4.2.** Diversidad Genética para cada población de *A. grandis* en México.

<b>Población</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Tamaño de Muestra</b>	<b>Diversidad Haplotípica (Hd)</b>	<b>Diversidad Nucleotídica (<math>\pi</math>)</b>
Chiapas	<i>Hampea nutricia</i>	12	0.84 ± 0.06	0.013 ± 0.001
Tabasco	<i>Hampea nutricia</i>	11	0.82 ± 0.08	0.01 ± 0.001
Tabasco	<i>Hampea rovirosae</i>	10	0.88 ± 0.06	0.02 ± 0.006
Oaxaca	<i>Cienfuegosia rosei</i>	11	0.90 ± 0.06	0.03 ± 0.006
Sonora	Cultivo de Algodón	12	0.56 ± 0.15	0.001 ± 0.003
Tamaulipas	Cultivo de Algodón	11	0.43 ± 0.13	0.001 ± 0.0004
<b>TOTAL</b>		<b>67</b>	<b>0.92 ± 0.01</b>	<b>0.030 ± 0.002</b>

## 4.2. Diferenciación Genética y Flujo de Genes.

La diversidad genética de las poblaciones de *A. grandis* en el sur de México indicó que hubo una baja diferenciación genética ( $F_{st}=0.210$ ) indicando que hay un considerable flujo genético entre ellos, de acuerdo al número de migrantes por generación  $Nm>1$ (Cuadro 4.3). Esos resultados sugieren que las poblaciones sobre plantas silvestres en la región representa una sola población panmítica. La mayor diferenciación genética interpoblacional se presenta entre las poblaciones de Sonora y Tamaulipas. ( $F_{st}= 0.870$ ) y altamente significativo.

**Cuadro 4.3.** Valores de diferenciación genética encontrada en las poblaciones de *A. grandis* de México.

Región	N° de Poblaciones	N° de Haplotipos	$F_{st}$	P- value	$Nm$
Todos	6	18	0.372	< 0.001	0.84
Sur	4	14	0.210		1.88
Sur/Tamaulipas	5	15	0.340	<0.001	0.94
Sur/Sonora	5	17	0.400	<0.001	0.69
Sonora/Tamaulipas	2	6	0.870	<0.001	0.07

## 4.3. Análisis Filogenético

Para el análisis filogenético fueron excluidos los haplotipos Iguazú 3,4 y 5 encontrados por Scataglini (2005) ya que resultaron ser muy disímiles al resto de las secuencias incluyendo al grupo externo *A. hunteri*. Lo que sugiere que dichas secuencias no corresponden a *A. grandis*.

#### 4.3.1. Análisis de Parsimonia.

La matriz de haplotipos de *A grandis*, usada para el análisis contenía 86 sitios variables, de los cuales, 50 fueron parsimoniosamente informativos. La frecuencia de las bases fueron A= 0.32, C= 0.19, G= 0.15, T=0.33. Hubo una mayor proporción de A y T, tendencia presente también en otros Curculionidae (Langor y Sperling 1997, Sequeira *et al.* 2000, Scataglini 2006). Del análisis de parsimonia, se obtuvieron 110 árboles de 143 pasos de longitud. Los índices de homoplasia evidencia una moderada homoplasia de los caracteres (**CI**=0.727, **RI**=0.833, **RC**=0.606, **HI** =0.273). El árbol consenso escogido (Fig. 2) muestra la separación entre las regiones este (clado A) y oeste (clado B), ambas regiones comparten haplotipos del sur de México. Quedando agrupados en el clado B o región oeste los haplotipos de Tecomán (1 al 4), Sonora (Son1 y Son2), Tabasco (SM3) y Oaxaca (SM5). La región del este que contiene haplotipos de norte y suramérica, quedó subdividida en los clados C y D. El clado C contiene haplotipos del sur de México Tamaulipas y Texas, con excepción de Iguazú 1 (Argentina) que queda ubicado en este grupo. El clado D está conformado por haplotipos de Suramérica, y un haplotipo de poblaciones de *Hampea* del sur de México.

#### 4.3.2. Análisis Bayesiano.

El árbol generado por el análisis bayesiano, mostró una topología diferente al árbol generado por parsimonia, aunque también mostró la división geográfica este y oeste (clados A y B). El clado A (oeste) agrupa a todos los haplotipos de Sonora y dos haplotipos pertenecientes al sur de México (SM3 y SM5). El clado B (este) se subdivide en dos clados (C y D), donde el clado C contiene haplotipos del sur de México, Tamaulipas y Texas, y, el clado D conformado por haplotipos de suramérica, aunque contiene al haplotipo SM 11 (Oaxaca y Tabasco). Se observa que con el análisis bayesiano se obtiene una mejor agrupación del clado del oeste y las incongruencias señaladas anteriormente sobre los haplotipos

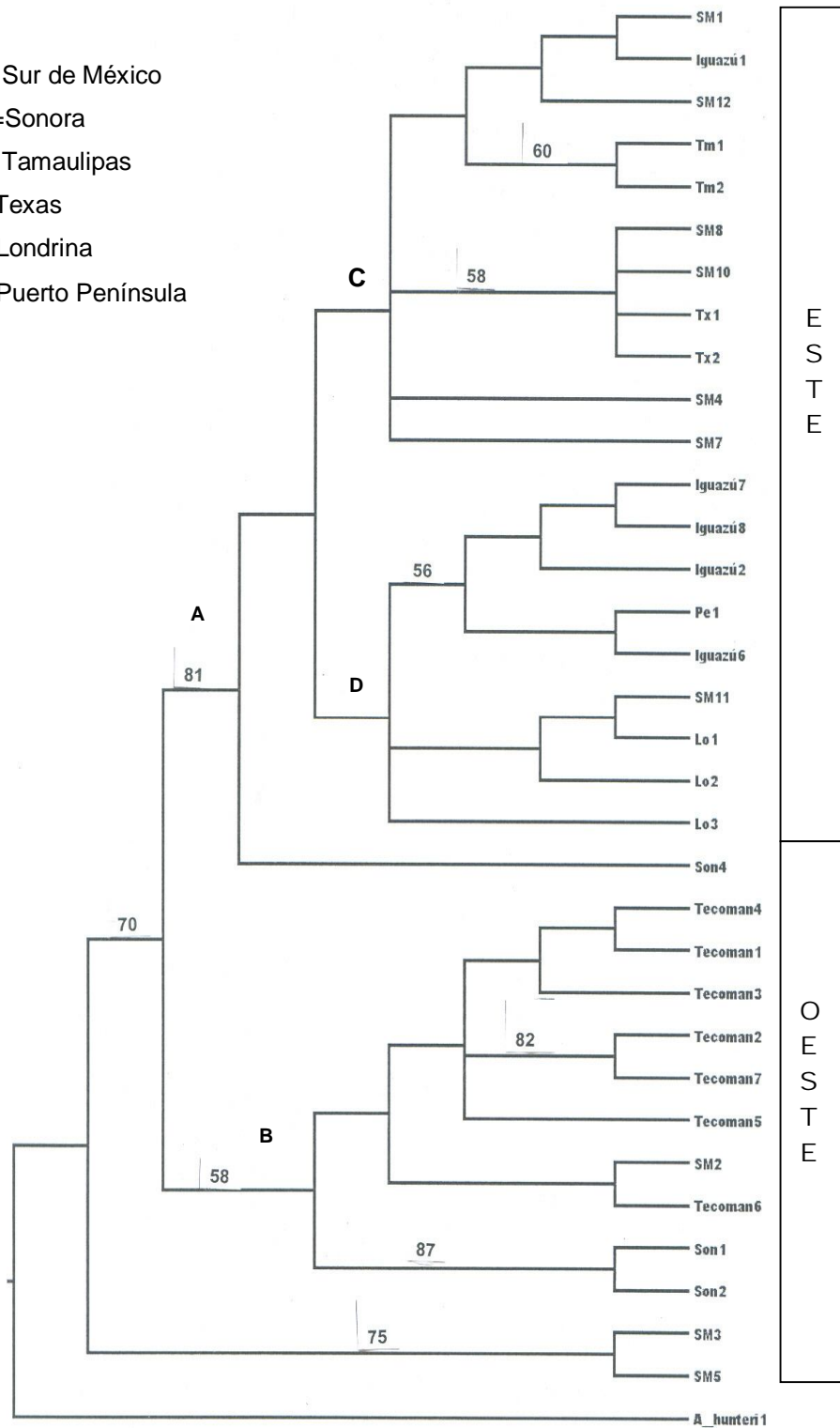
Iguazú1 y SM11 se presentan también en el de parsimonia, por lo que se sugiere para un futuro realizar un estudio sobre las poblaciones de Suramérica.

Las secuencias del COI obtenidas en este estudio, aportaron los datos necesarios para llevar a cabo análisis de genética de poblaciones de *A. grandis* en México, así como un análisis filogenético de los haplotipos de *A. grandis*. Demostrando así la utilidad de la secuencia del COI para realizar estudios de poblaciones y filogenias intraespecíficas. El análisis de las poblaciones mexicanas de *A. grandis* sobre hospederos silvestres mostraron una mayor diversidad genética lo que indica que esas poblaciones se desarrollan habitualmente allí y que tienen el potencial de pasar al algodón como sugirió la hipótesis de Burke sobre el origen Mesoamericano del picudo del algodón.

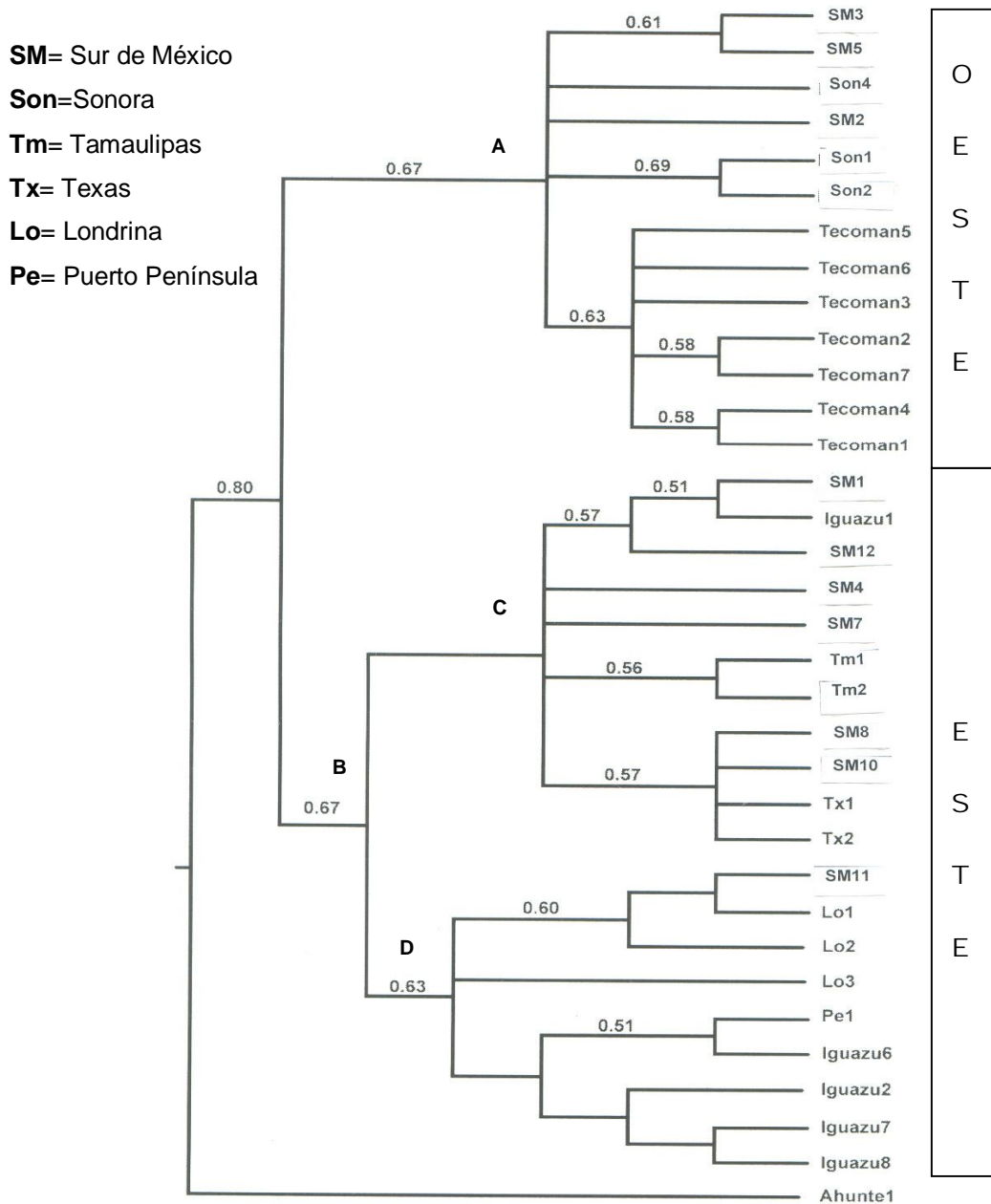
Los análisis filogenéticos efectuados en este estudio revelan que los datos moleculares apoyan la hipótesis propuesta por Burke sobre la dispersión de *A. grandis* desde el sur de México siguiendo dos rutas, una hacia el noreste y otra hacia el noroeste de México y la posterior expansión al sur de Estados Unidos y a suramérica. En ambos análisis se muestra los clados del este y oeste. A su vez los clados pueden ser relacionados con áreas específicas como el clado del este que está subdividido en norte y suramérica. En cuanto a las diferencias mostradas entre los árboles filogenéticos, éstas son factibles ya que como señala Wiens (1995) cuando se trata de variación intraespecífica la aplicación de métodos diferentes puede generar árboles diferentes para el mismo conjunto de datos, ya que la más ligera variación en cómo es tratado el polimorfismo puede tener un impacto significativo sobre la topología del árbol.



**SM**= Sur de México  
**Son**= Sonora  
**Tm**= Tamaulipas  
**Tx**= Texas  
**Lo**= Londrina  
**Pe**= Puerto Península



**Fig. 5.** Cladograma de haplotipos de COI encontrados en las poblaciones de *Anthonomus grandis*. Boh. generado por el análisis de parsimonia. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de bootstrap.



**Fig.6.** Cladograma de los haplotipos de *Anthonomus grandis*. Boh, obtenido del Mr. Bayes (Ronquist y Huelsenbeck 2003). Los números sobre las ramas corresponden a los valores de probabilidad posterior.

## V. CONCLUSIONES.

Las poblaciones de *A. grandis* del sur de México mostraron una mayor variabilidad genética. Se observó que las poblaciones que se encuentran sobre hospederas silvestres (*Hampea* spp. y *Cienfuegosia rosei*) presentaron una mayor variabilidad genética. Así mismo, se observó evidencia que existe un importante flujo genético entre estas poblaciones. De ahí se concluye que la diversidad genética de estas poblaciones es debida a que los picudos habitualmente se desarrollan sobre ellas y es esta misma diversidad genética la que les permitió pasar al algodón dando como resultado poblaciones con menor diversidad. Las poblaciones del norte de México (Sonora y Tamaulipas), exhiben una baja variabilidad genética y una marcada diferenciación genética entre ellas. La población de Sonora muestra una evidente diferenciación con las demás poblaciones mexicanas.

Los análisis filogenéticos muestran una clara separación fuertemente asociadas a las localidades del este y oeste de México. Con el análisis bayesiano se obtuvo la total agrupación de los haplotipos del oeste. Se consideró que el análisis de parsimonia refleja el aspecto evolutivo de la especie.

La alta variabilidad genética de las poblaciones del sur de México y la estructuración genética asociada al este y oeste del país resultan congruentes con la hipótesis propuesta por Burke *et al.* (1986), sobre el origen Mesoamericano y posterior dispersión de *Anthonomus grandis* en América

## LITERATURA CITADA

- Arnedo, M. A. 1999.** Cladismo: La reconstrucción filogenética basada en parsimonia. Bol S. E. A. N° 26: 57-84.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. y Saunders, N. C. 1987.** Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst 18: 489-522.
- Avise, J. C. 2000.** Phylogeography: The history and formation of species. Harvard Univ. Press, Cambridge, M. A. 109-210
- Avise, J.C. 2004.** Molecular markers, natural history and evolution. 2da Edición Sinauer Associates Sunderland, M.A.
- Baverstock P.R. y Moritz C. 1996.** Project design 17-27. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable B. K. (eds) Molecular Systematic. Segunda Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Bartlett, A. C., W. C. Randall y J. E. May. 1983.** Allozyme variation among populations of boll weevils in Arizona and Mexico. Southwest. Entomol. 8: 118-130.
- Brubaker C.L. y Wendel J. F. 1994.** Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*; Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). Am. J. Bot. 81(10):1309-1326.

**Burke H. R. y J. R. Cate. 1979.** A new species of Mexican *Anthonomus* related to the boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) Ann. Entomol. Soc. Am. 72: 189-192.

**Burke, H. R. 1986.** Situação taxonomica do bicudo do algodoeiro no Brasil e em outras areas da America do norte e do sul. pp. 89-134. *In* O Bicudo do Algodoeiro. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Departamento de Difusão de Tecnologia, Brasília, D. F.

**Burke H. R., W. E. Clark, J. R. Cate, y P. A. Fryxell 1986.** Origin and dispersal of the boll weevil. Bull. Entomol. Soc. Am. 32 (4): 228-238.

**Cai, Y-W., X-Y.Cheng, D-H, Duan y L. R. Kirkendall 2008.** Genetic diversity and biogeography of red turpentine beetle *Dendroctonus valens* in its native and invasive regions. Insect Sci. 15:291-301.

**Cate, J. R., P. C. Krauter y K. E. Godfrey 1990.** Pest of cotton. In: D. H. Habeck et al. (eds). Classical Biological Control in the Southern United States. Southern Coop. Series Bull n° 355 Nov.1990

**Clary, D. O y D. R. Wolstenholme, 1985.** The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. J. Mol. Evol. 22:252-271.

**Cognato, A.I., Harlin, A. D. y M. L. Fisher. 2003.** Genetic structure among pinyon pine beetle populations (Scolytinae: *Ips confusus*). Mol. Ecol. Evol. 32:1262-1270.

**Cognato, A. I., J. Sun, M. A. Anducho-Reyes y D. R. Owen. 2005.** Genetic variation and origin of red turpentine beetle (*Dendroctonus valens*

LeConte) introduce to the people's Republic of China. For. Entomol. 7:87-94.

**Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre. 2007.** Ecología Molecular. Impreso electrónico. [www2. ine.gob.mx/publicaciones/530 pdf](http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/530.pdf). México

**Excoffier, L., P. E. Smouse y J. M. Quattro. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genet. 131:479-491.

**Falcon, L. A., A. P. Guetiérrez y D. Mueller-Bellschmidt. 1986.** Exotic pest profile-boll weevil. Dept. Entomol. Science, Univ. of California, Berkeley, CA, 91 pp.

**Felsenstein, J. 1978.** Cases in which parsimony or compatible methods will be positively misleading. Syst. Zool. 27: 27-33.

**Fryxell, P. A. 1979.** The Natural History of the Cotton Tribe. Texas A&M Univ. Press, College Station, Texas, 245 pp.

**Fryxell, P. A. y M. J. Lukerfahr. 1967.** *Hampea* Schlecht: posible primary host of the boll weevil. Sci. 155: 1568-1569.

**Guerra, A. A. 1988.** Seasonal boll weevil movement between northeastern Mexico and the Rio Grande Valley of Texas, USA. Southwest. Entomol. 13:261-271.

**Haney, P.B., W. J. Lewis y W. R. Lambert. 2009.** Cotton Production and the Boll Weevil in Georgia: History, Cost of Control and Benefits of Eradication. College of Agricultural and Environmental Sciences. The University of Georgia. Research Bulletin. N° 428.

- Hebert, P.D., Ratnasingham, S. y deWaard J. R. 2003.** Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl)* 270: S96-S99.
- Hudson, R. R., M. Slatkin y W. P. Maddison. 1992.** Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*. 132: 583-589.
- Jones, R. W., 2006.** March of the Weevils. *Natural History*. 2(06): 30-35
- Jones, R. W y D. Baro-Peruyero 2002.** Reproductive ecology of two species of the *Anthonomus grandis* species group (Coleoptera: Curculionidae) on their *Hampea* (Malvales: Malvaceae) hosts plants in Southern Mexico. *Envirom. Entomol.* 39: 691-703.
- Jones, R. W. 2001.** Evolution of the host plant associations of the *Anthonomus grandis* species group (Coleoptera: Curculionidae): Phylogenetic tests of various hypotheses. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94: 51-58.
- Jones, Robert W.1998.** Hospederas silvestres y origen del picudo del algodnero: implicaciones para su control biológico. *Vedalia*. 5: 71-83
- Jones, R. W. y H. R. Burke. 1997.** New species and host plants of the *Anthonomus grandis* species Group (Coleoptera: Curculionidae). *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 99: 705-719.
- Jones, R. W., Frixell P. A. y D. M. Baro. 1997.** Phylogenetics análisis of the genus *Hampea* (Malvales: Malvaceae: Gossypieae). *An. Inst. Biol. UNAM Serie Botánica*. 68(1): 21-42.

- Kim, S. K y T. M. Sappington. 2004.** Boll Weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) Dispersal in the southern United States: Evidence from mitochondrial DNA variation. *Environmental Entomology*. 33 (2):457-470.
- Langor, D. W. y F. A. H. Sperling. 1987.** Mitochondrial DNA sequence divergente in weevils of the *Pissodes strobi* species complex (Coleoptera: Curculionidae) *Insect Mol. Biol.* 6 (3): 255-265.
- Lanteri, A. A., V. A. Confalonieri y M. A Scataglini. 1999.** Migración del picudo del algodón en Sudamérica: evidencias de los estudios moleculares. Proc. III International Workshop on IPM of Cotton Boll Weevil, in Argentina, Brazil and Paraguay. 33-35.
- Lanteri, A. A., V. A. Confalonieri y M. A. Scataglini. 2003.** El picudo del algodón en la Argentina: Principales resultados e implicancias de los estudios moleculares. *Rev Soc. Entomol. Argent.* 62 (4): 1-15.
- Loftin, V. C. 1946.** Living with the boll weevil for fifty years. *Smithson. Inst. Res. Rep. Publ.* 3827: 273-292
- Lunt, D.H., D. X. Zhand, J. M. Szymura y G. M. Hewitt. 1996.** The insect cytochrome oxidase I gene evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetics studies. *Insect. Mol. Bio.* 5(3): 153-165.
- Manessi, O. G. 1997.** El Picudo del Algodonero, la super plaga. FULCPA. Buenos Aires. 594.
- Morlais, I. y D. W. Severson. 2002.** Complete mitochondrial DNA sequence and amino acid analysis of the cytochrome c oxidasa subunit I (COI) from *Aedes aegypti*. *DNA Sequence.* 13:123-127.



- Morrone, J. J. 2002.** El espectro del dispersalismo: de los centros de origen a las áreas ancestrales. *Rev. Entomol. Argent.* 61(3-4): 1-4.
- Nei, M. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press, New York USA.
- Percy, D. 2000.** Origins and host specificity of legume-feeding psyllids ( Psylloidea, Hemiptera) in the Canarian islands. University of Glasgow. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/~dpercy/psyllids.htm>
- Riley, C. V. 1885.** Natural history of other species of the genus *Anthonomus*. Report of Agriculture Commissioner for 1885. Washington D.C. 278-279.
- Roehrdanz, R. L. 2001.** Genetic differentiation of southeastern boll weevil and *Thurberia* weevil populations of *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) using mitochondrial DNA. *Ann. Entomol. Soc. Am.* Vol. 94 (6): 928-935.
- Roehrdanz, R. L., Szalanski, A. L. y Levine, E. 2003.** Mitochondrial DNA and *ITS1* differentiation in geographical populations of northern corn rootworm, *Diabrotica barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae): identification of distinct genetic populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* Vol. 96(6): 901-913.
- Roehrdanz, R. L. y D. T. North. 1992.** Mitochondrial DNA restriction fragment variation and biosystematics of the boll weevil *Anthonomus grandis*. *Southwest Entomol.* 17(2): 101-108.
- Ronquist, F. y J. P Huelsenbeck. 2003.** Mr. Bayes: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 19: 1572-1574.

- Rozas, J., Sanchez-Del Barrio, J. C., Messeguer, X y R. Rozas. 2003.** DnaSP, DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19: 2496-2497.
- Ruiz E. A., J. L. Hayes, J. E. Rinehart y G. Zuñiga 2007.** Phylogeographic análisis of the Douglas-fir beetle *Dendroctonus pseudotsugae* Hopkins (Coleoptera:Curculionidae:Scolytinae). Third Workshop Proceedings. USDA Forest Service Proceedings. 29-32.
- Scataglini, M. A., V. A. Confalonieri y A. A. Lanteri. 2000.** Dispersal of the cotton weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: evidence of RAPD analysis. *Genetica*. 108: 127-136.
- Scataglini, M. A., A. A. Lanteri y V. A. Confalonieri. 2006.** Diversity of boll weevil populations in South America: a phylogeographic approach. *Genetica*. 126: 353-368.
- Simon, C., Frati, F. Beckenbach, A. Crespi, B., Liu, H y P. Flook. 1994.** Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.
- Sequeira, A., A. A. Lanteri, M. A. Scataglini, V. A. Confalonieri y B. Farrell. 2000.** Are flightless *Galapaganus* weevils older than the Galápagos Island they inhabit? *Heredity*. 85: 20-29.
- Solis, R. L. Y y A. Andrade. 2005.** ¿Qué son los marcadores moleculares? La Ciencia y el Hombre. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*. 13(1): 8-10

**Stansly, P. A. 1985.** Life history and ecology of the boll weevil on a native host plant in southeastern Mexico. PhD Dissertation. Texas A&M University, College Station, TX.

**Towsend, C. H. T. 1895.** Report of the boll weevil in Texas (*Anthonomus grandis* Boheman). *Insect Life*. 7: 295-309.

**Vázquez Navarro, J. M. 1998.** Breve historia del picudo del algodón en México y los métodos empleados para su control. *Vedalia* 5: 61-70.

**Wiens, J. J. 1995.** Polymorphic characters in phylogenetic systematics. *Syst. Biol.* 44: 482-500

**Wiens, J. J. y M. R. Servedio. 1998.** Phylogenetic análisis and intraespecific variation: Performance of parsimony, likelihood, and distance methods. *Syst. Biol.* 47(2): 228-253.

## **ANEXOS**

**Apéndice 1.- Algunos hospederos silvestres de *A. grandis*.**



*Hampea nutricia*. Flores masculinas



*Hampea nutricia*. Flores femeninas.

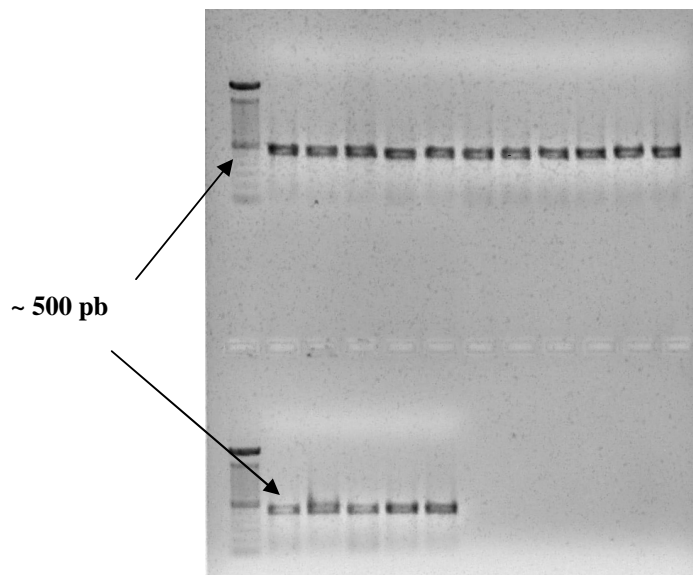
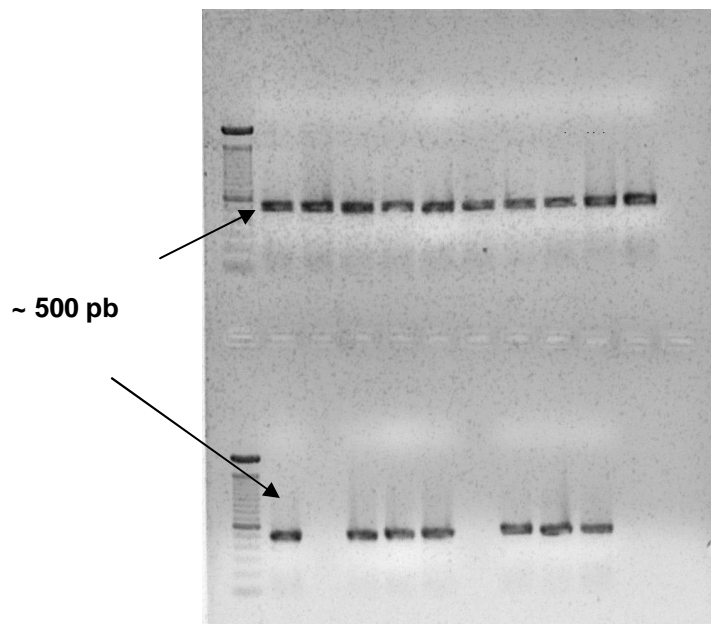


*Hampea rovirosae*. Flores perfectas



*Cienfuegosia rosei*.

**Apéndice 2.- Imágenes de geles de los productos de PCR  
obtenidos con los primers C1-J1718 y C1-J2191**



## Apéndice 3.- Alineamiento de las secuencias de haplotipos de *A. grandis* usados para el análisis filogenético.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	115
Sen3	ATAAGATTTTGATTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
SM3	ATAAGATTTTGATTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
SM5	TTTAGATTTTGATTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Sen4	ATAAGATTTCTGGCTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
SM2	ATAAGATTTCTGATTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Sen1	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGGGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Sen2	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGGGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Tecoman5	ATAAGATTTTGATTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Tecoman6	ATAAGATTTCTGATTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
SM1	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTGGCTC												
SM12	ATAAGATTTTGACTATTACCTCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
SM4	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
SM6	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
SM7	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Tm1	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTGACCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Tm2	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTGACCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
SM8	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
SM9	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
SM10	TTTAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
SM11	ATCAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Tx1	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Lo1	ATCAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Lo2	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Tecoman3	ATAAGATTTTGATTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTCAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Tx2	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Lo3	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Tecoman2	ATAAGATTTTGATTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTCAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Tecoman4	ATAAGATTTTGATTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTCAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Pe1	GTTAGATTTCTGGAGATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Tecoman7	ATAAAATTTTGGTGATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Tecoman1	ATAAGATTTTGATTATTACCCCCCTCTTTAACTCTTTCAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Iguazu5	TTTATTTTTGGAGGTTACCCCCAATTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Iguazu1	TTTATTTTTGACGATTACCCCCATCTTTAACTCTTTAAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Iguazu2	ATAAGATTTTGACTATTACCCCCATCTTTAACTCTTTGATTTTAAAGAAGAATTGTCAGAAAAGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Iguazu7	TTTATTTTTGGCGGTTACCCCCATCTTTAACTCTCTGTTTAAAGAATAATTGTCAGAAAAGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
Iguazu8	TTTATTTTTGGCGATTACCCCCATCTTTAACTCTCTGATTAAAGAATAATTGTCAGAAAAGGAACTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCACTCTCTTCTAATTTAGCTC												
A_hunter1	ATAAGATTTTGACTTTTACCACCTTCTTAATCTTCTAATTTAAGAAGAATTGTAAGAAAAGGGGCTGGAACAGGATGAACAGTTTATCCCCCTCTTCTTCTAATTTAGCTC												





	231	240	250	260	270	280
Son3	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCAGTAAAAATTACAGCTA					
SM3	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTTTGAGCAGTAAAAATTACAGCTA					
SM5	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTTTGAGCAGTAAAAATTACAGCTA					
Son4	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCAGTAAAAATTACAGCTA					
SM2	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCAGTAAAAATTACAGCTA					
Son1	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCAGTAAAAATTACAGCTA					
Son2	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCAGTAAAAATTACAGCTA					
Tecoman5	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCAGTAAAAATTACAGCT-					
Tecoman6	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCAGTAAAAATTACAGCT-					
SM1	AAGCTTAGAGCAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCTA					
SM12	AAGCTTAGAGCAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCTA					
SM4	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCTA					
SM6	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCTA					
SM7	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCTA					
Tm1	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCTA					
Tm2	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCTA					
SM8	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAG- TA					
SM9	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCT-					
SM10	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCTA					
SM11	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCT-					
Tx1	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCT-					
Lo1	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCT-					
Lo2	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCT-					
Tecoman3	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCAGTAAAAATTACAGCT-					
Tx2	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCT-					
Lo3	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACCGCT-					
Tecoman2	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCAGTAAAAATTACAGCT-					
Tecoman4	AAGCTTAGAACAAATACCTCTATTTGTATGAGCAGTAAAAATTACAGCC-					
Pe1	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCT-					
Tecoman7	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCAGTAAAAATTACAGCT-					
Tecoman1	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCNGTAAAAATTACAGCT-					
Iguazu6	AAGCTTAGAACAAATACCTTTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCT-					
Iguazu1	AAGCTTAGAGCAAATACCTCTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCT-					
Iguazu2	AAGCTTAGAACAAATACCTCTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCT-					
Iguazu7	AAGCTTAGAACAAATACCTCTATTTGTATGAGCTGTAAAAATTACAGCT-					
Iguazu8	AAGCTTAGAACAAATACCTCTATTCGTATGAGCTGTATAATTACAGCT-					
A_hunter1	AAGATTAACAACAAATACCTTTATTTGTTTGAGCTGTAAAAATTACAGCCA					