

Aportes de la biología molecular a la conservación de los insectos

Analfía A. Lanteri,
Marta S. Loíacono
& Cecilia Margaría

Departamento Científico de
Entomología, Museo de La Plata,
Facultad de Ciencias Naturales y
Museo, UNLP, Paseo del Bosque s/n,
1900 La Plata, Argentina

Proyecto de
Red Iberoamericana de Biogeografía
y Entomología Sistemática **PRIBES 2002**.
**C. COSTA, S. A. VANIN, J. M. LOBO
& A. MELIC (Eds.)**

ISBN: 84-922495-8-7

m3m : Monografías Tercer Milenio
vol. 2, SEA, Zaragoza, Julio-2002.
pp.: 207-220.

RIBES : Red Iberoamericana de
Biogeografía y Entomología Sistemática.
<http://entomologia.rediris.es/pribes>
Coordinadores del proyecto:
Dr. Jorge LLorente Bousquets (coord.)
Dra. Cleide Costa (coord. adj.)

Coeditores del volumen:

Sociedad Entomológica Aragonesa -SEA
<http://entomologia.rediris.es/sea>
Avda. Radio Juventud, 37
50012 Zaragoza (ESPAÑA)
amelic@retemail.es

CYTED— Programa Iberoamericano de
Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
Subprograma Diversidad Biológica.
Coordinador Internacional:
Dr. Peter Mann de Toledo

**APORTES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR A LA
CONSERVACIÓN DE LOS INSECTOS**

Analfía A. Lanteri, Marta S. Loíacono
& Cecilia Margaría

Resumen

El conocimiento de la diversidad genética resulta de fundamental importancia en Biología de la Conservación, pues es la base de la variación orgánica y por lo general tiene una estrecha correlación con el ajuste de las especies al medio. El objetivo principal de la presente contribución es comentar los métodos de análisis y algunos resultados obtenidos, con respecto a la estimación de la diversidad genética de especies y poblaciones de insectos, con fines de conservación. Se brindan ejemplos sobre la aplicación de la técnica de RAPD (Análisis al azar de polimorfismos del ADN) para reconocer biotipos de himenópteros parasitoides utilizados en control biológico, y para identificar el origen geográfico de insectos plaga pertenecientes a Curculionidae. Se discute la metodología de análisis de secuencias de ADN mitocondrial para reconocer "unidades evolutivas significativas" en conservación de la biodiversidad de insectos y en estudios de filogeografía. Se analizan además las implicancias de estas metodologías en investigaciones sobre genética y ecología de poblaciones, para evaluar los efectos biológicos de la fragmentación de los hábitats naturales.

Palabras clave: Diversidad genética, Técnicas moleculares, Filogeografía, Fragmentación, Control Biológico.

Genetic diversity and conservation of insects

Abstract

The knowledge of genetic diversity is an outstanding aspect of Biological Conservation, because organic variation depends on genetic diversity, that it is usually correlated to environmental fitness of species. The main objective of the present contribution deals with the analytical methods and results, on estimation of genetic diversity of insect species and populations, for conservation. We give examples of application of RAPD technique (Random analysis of polymorphic DNA) to recognize biotypes of parasitoid Hymenoptera used in biological control, and to identify the geographic origin of insect pests of Curculionidae. We discuss the methodology of mitochondrial DNA sequencing to recognize "significant evolutionary units" for conservation of insect biodiversity and for phylogeographic studies. We also analyze the uses of these methodologies, in genetic and ecological studies of populations, to assess the biological effects of habitat fragmentation.

Key words: Genetic diversity, Molecular techniques, Phylogeography, Fragmentation, Biological control.

Introducción

Los cambios más importantes que han ocurrido en las ciencias biológicas en los últimos veinte años, han surgido, principalmente, de la aplicación de técnicas moleculares del ADN para abordar una gran variedad de problemas. El enfoque molecular asociado con el filogenético, ha tenido un gran impacto en las clasificaciones biológicas, el modo de interpretar procesos evolutivos, el estudio de las vías de dispersión de distintos organismos (filogeografía) y la estimación de edades geológicas mediante relojes moleculares (Avice, 1994). Asimismo, estas técnicas se están aplicando con éxito en Biología de la Conservación (Avice & Hamrick, 1996), especialmente en lo que respecta al estudio de especies en riesgo de extinción (Landweber & Dobson, 1999).

Con el transcurso del tiempo y en forma creciente, la estructura genética de muchas poblaciones naturales se ha visto afectada por la destrucción y fragmentación de los hábitats y otros factores antropogénicos como la polución, el calentamiento global, la introducción de especies exóticas y/o la sobreexplotación de los recursos naturales (Lande, 1999). La reducción en el tamaño de las poblaciones ha colocado la viabilidad de muchas especies en riesgo, por pérdida de variabilidad genética, depresión por endocría y/o fijación de mutaciones deletéreas por deriva génica (Lande, 1999).

Estudios demográficos y de genética de poblaciones aplicando marcadores moleculares han aportado datos científicos para adoptar medidas en favor de la conservación de varias especies de vertebrados, entre ellas el oso pardo europeo, el elefante africano y la ballena franca (Baker & Palumbi, 1994; Georgiadis *et al.*, 1994; Kohn *et al.*, 1995; Landweber, 1999). Las investigaciones sobre la diversidad de los insectos con fines de conservación son menos frecuentes, dado que éstos despiertan menor interés que los vertebrados y además, existe la creencia bastante general de que resultan perjudiciales para el hombre, cuando el número de especies de insectos de importancia agronómica o médico-veterinaria es realmente escaso (Samways, 1994). Los insectos, sin embargo, reúnen la mayor diversidad genética del planeta y son componentes vitales de la mayoría de los ecosistemas, reportando numerosos beneficios ecológicos (McArdle & Woiwod, 1998). En los ecosistemas de selvas tropicales juegan roles clave como polinizadores, herbívoros y detritívoros, además de servir como fuente de alimento para numerosos organismos (Malcolm, 1997).

La "Convención sobre Diversidad Biológica" ha dado directivas para proteger la diversidad biológica a todos los niveles, desde el genoma hasta los ecosistemas (Caughley, 1994; Hunter, 1996). En este contexto, el conocimiento de la diversidad genética resulta fundamental para la Biología de la Conservación, pues es la base de la cual depende toda la variación orgánica (Harwood & Amos, 1999). Además, dado que la diversidad genética se correlaciona habitualmente con el ajuste de las especies y poblaciones al medio, se interpreta que las unidades evolutivas genéticamente más diversas, deberían ser capaces de dar una mejor respuesta adaptativa frente a la acción de parásitos, depredadores y/o cambios ambientales (Mitton & Grant, 1984; Allendorf & Leary, 1986).

La diversidad genética de las poblaciones naturales depende de varios factores, tales como tiempo desde que se separaron, flujo génico interpoblacional, variación genética inicial en la población fuente y en cada población local, número de eventos fundacionales y presiones de selección (Hartl, 1980). Los cambios en los niveles de diversidad genética dentro de las especies o poblaciones son consecuencia de un balance entre procesos opuestos de ganancia (mutación y flujo génico) y pérdida (deriva génica y selección natural). Una importante conclusión a la que se ha arribado es que cambios muy grandes o muy rápidos en la variabilidad genética, es más probable que ocurran por pérdida que por ganancia, pues los procesos que incrementan la variabilidad son lentos o menos frecuentes. Los estudios de polimorfismos genéticos de isozimas y análisis del ADN, resultan de gran importancia para detectar estas pérdidas (Lande, 1999).

En la actualidad el análisis genético, junto con los estudios de ecología de poblaciones, se ha convertido en una parte central de la Biología de la Conservación, ya que al detectar la declinación poblacional, aporta elementos para evitar la extinción de las especies (Landweber & Dobson, 1999). Asimismo, dado que cada población podría dar origen a una nueva especie, las reducciones de tamaño y viabilidad de las poblaciones, amenazan la evolución potencial de las especies (Lande, 1999). Si cada especie de

insecto posee varios miles de genes y las especies que habitan en los trópicos se están extinguiendo a razón de 1000 por año, en esta región del planeta se estaría produciendo una pérdida anual de 10 millones de alelos (Samways, 1994).

El objetivo principal de la presente contribución es comentar los métodos de análisis y algunos resultados obtenidos, con respecto a la estimación de la diversidad genética de especies y poblaciones de insectos, con fines de conservación. Los ejemplos elegidos se refieren principalmente a la familia Curculionidae y a los Hymenoptera de la serie parasítica.

Técnicas para el análisis genético de las poblaciones naturales

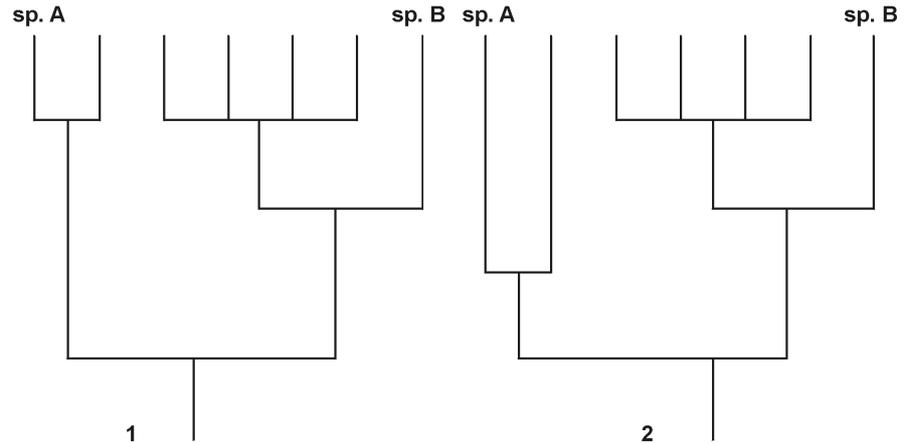
Desde la primera mitad del siglo XX, la genética de poblaciones aportó las bases teóricas y metodológicas para cuantificar los cambios producidos en la estructura de las poblaciones naturales, por mutación, selección natural y deriva génica (Hartl, 1980; Wright, 1977; Mallett, 1996). Asimismo, la ecología de poblaciones aportó algunos conceptos teóricos fundamentales para identificar las posibles causas de la declinación o persistencia de las poblaciones, tales como el concepto de "población mínima viable" (Gilpin & Soulé, 1986), y las teorías de "biogeografía de islas" (MacArthur & Wilson, 1967) y de la "dinámica metapoblacional" (Hanski & Simberloff, 1997).

En la actualidad, la ecología dispone de métodos para modelar la trayectoria de las poblaciones a través del tiempo, de modo que conociendo su tamaño inicial se puede calcular su tasa de declinación y predecir su tiempo de extinción (McArdle & Woiwod, 1998). De igual modo, la genética de poblaciones cuenta con diversas técnicas que permiten estudiar la estructura y la historia evolutiva de las poblaciones, mediante la obtención de datos que luego son analizados estadísticamente y/o filogenéticamente (Avice, 2000).

La caracterización genética de las poblaciones naturales se realizó en primera instancia, a través del estudio de polimorfismos genéticos de isoenzimas, que permiten detectar una caída en la heterocigosis poblacional (Allendorf & Leary, 1986). Posteriormente empezaron a utilizarse marcadores moleculares del ADN, tales como RFLP (Análisis de polimorfismos para la longitud de fragmentos de restricción) y RAPD (Análisis al azar de polimorfismos del ADN), huellas digitales del ADN y secuenciación del ADN mitocondrial (Soltis *et al.*, 1998). Dado que el polimorfismo es un fenómeno muy común en insectos y que muchas veces sólo puede ser detectado mediante electroforesis de alozimas o secuenciación de ADN mitocondrial, estas técnicas resultan fundamentales para el monitoreo de sus poblaciones (Samways, 1994). Los resultados obtenidos a partir de estas técnicas contribuyen a definir los límites de las poblaciones, estudiar su estructura, revelar patrones de migración, estimar el flujo génico interpoblacional y detectar la posible declinación de las mismas, debido a diferentes factores de disturbio del ambiente (Avice & Hamrick, 1996).

Las alozimas son enzimas solubles, determinadas por alelos alternativos de un mismo locus génico, que se

Fig. 1. Dos cladogramas con igual topología pero diferente longitud de ramas. Se debe tomar una decisión con respecto a la conservación de las especies A y B. Si se considera la longitud de las ramas, en el cladograma 1 se deberá proteger la especie B, y en el cladograma 2, la especie A. (Modificado de Faith, 1994).



estudian mediante la técnica de electroforesis en geles (Avice, 1994). Hasta el presente, han proporcionado una gran cantidad de información sobre distancias genéticas entre especies y medidas intraespecíficas de heterocigosis (Tregenza & Butlin, 1999), pero todavía resta mucho por conocer sobre su posible correlación con la variación morfológica (caracteres cuantitativos continuos), fisiológica y de comportamiento que podría tener un significado adaptativo frente a condiciones ambientales cambiantes (Storfer, 1996).

La técnica de huellas digitales del ADN ("DNA fingerprinting") permite identificar individuos y determinar su grado de parentesco, a partir del estudio de regiones hipervariables no codificantes del genoma (minisatélites y microsátélites), que causan polimorfismos de extensión. El "DNA fingerprinting" se ha empleado con éxito para el estudio de la estructura y dinámica de poblaciones de vertebrados, incluido el hombre, sin embargo no ha sido relevante en el estudio de los insectos, ya que éstos poseen pocos microsátélites y en su mayoría cortos (Amos, 1999). Los métodos más utilizados para estudiar la variabilidad genética de los insectos a nivel intra e interpoblacional, como así también el parentesco entre especies próximas, son la técnica de RAPD y la secuenciación del ADN mitocondrial.

La técnica de RAPD se usa desde hace aproximadamente diez años (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) para analizar la variabilidad genética de poblaciones y especies de insectos (Landry *et al.*, 1993; Roehrdanz *et al.*, 1993; Taberner *et al.*, 1997) y para determinar el origen y dispersión de especies plaga (Lenney Williams *et al.*, 1994; Lanteri *et al.*, 2000; Scatagliini *et al.*, 2000). Se basa en el empleo de distintos "primers" o cebadores al azar, que se recombinan con el ADN total que se desea estudiar. Las bandas RAPDs indican la presencia de alelos dominantes. A partir de la matriz de datos de presencia y ausencia de bandas RAPDs se calculan distancias genéticas (Nei, 1972) que se utilizan para obtener árboles de distancia (e.g. árbol de Neighbor-Joining) y para calcular los índices F_{st} (medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones) (Weir & Cockerham, 1984) y otros estadísticos que permiten estimar el flujo génico interpoblacional (número de migrantes por generación) (Confalonieri, 1994, 1999; Scatagliini *et al.*, 2000).

Las secuencias de genes mitocondriales son ampliamente utilizadas en la actualidad, para realizar estudios filogenéticos de poblaciones o especies próximas (Normark & Lanteri, 1998; Sequeira *et al.*, 2000), pues su tasa de mutación es elevada con respecto a la de otros genes (nucleares o ribosomales) y por lo tanto adecuada a los niveles específico e infraespecífico. Los genes más estudiados son los de la Citocromo Oxidasa, subunidades I y II (COI y COII). Cuando se analizan secuencias de genes mitocondriales, las unidades terminales del análisis filogenético son los haplotipos mitocondriales o variantes del ADN mitocondrial. El número de haplotipos presentes en una especie o población brinda una estima de su diversidad genética y permite realizar inferencias sobre su historia evolutiva (Gómez Zurita *et al.*, 2000; Juan *et al.*, 2000). Los datos de secuencias pueden analizarse mediante algoritmos de simplicidad ("parsimony") o de máxima verosimilitud ("maximum likelihood"), a partir de los cuales se obtienen árboles filogenéticos (Soltis *et al.*, 1998).

Por otra parte, los árboles filogenéticos se emplean en el marco de la Biología de la Conservación, para dar peso a la diversidad biológica, ya que a partir de la década pasada se comenzó a considerar no sólo la riqueza de especies de un área, sino también la importancia filogenética de sus especies, dada por su posición genealógica. En ese contexto se propusieron diferentes medidas, de peso taxonómico (Vane Wright *et al.*, 1991) y de diversidad filogenética, basadas en el conteo de los nodos del árbol (Nixon & Wheeler, 1992; Williams *et al.*, 1994) o en los nodos y la longitud de las ramas (Faith, 1992, 1994). En este último caso se intenta maximizar la riqueza de atributos genéticos estimados a partir de secuencias moleculares, de acuerdo con un modelo anagenético de evolución, según el cual existiría una relación directa entre la longitud de las ramas del árbol y el tiempo cronológico (Fig. 1). De acuerdo con el modelo mencionado, en el que se asume un reloj molecular (Thorpe, 1982), la riqueza de atributos genéticos será máxima en los taxones más divergentes y antiguos (Humphries *et al.*, 1995). Estas medidas de diversidad han sido escasamente empleadas en comparación con otras más sencillas, como por ejemplo la riqueza de especies (Prendergast *et al.*, 1993; Martín-Piera, 1997).

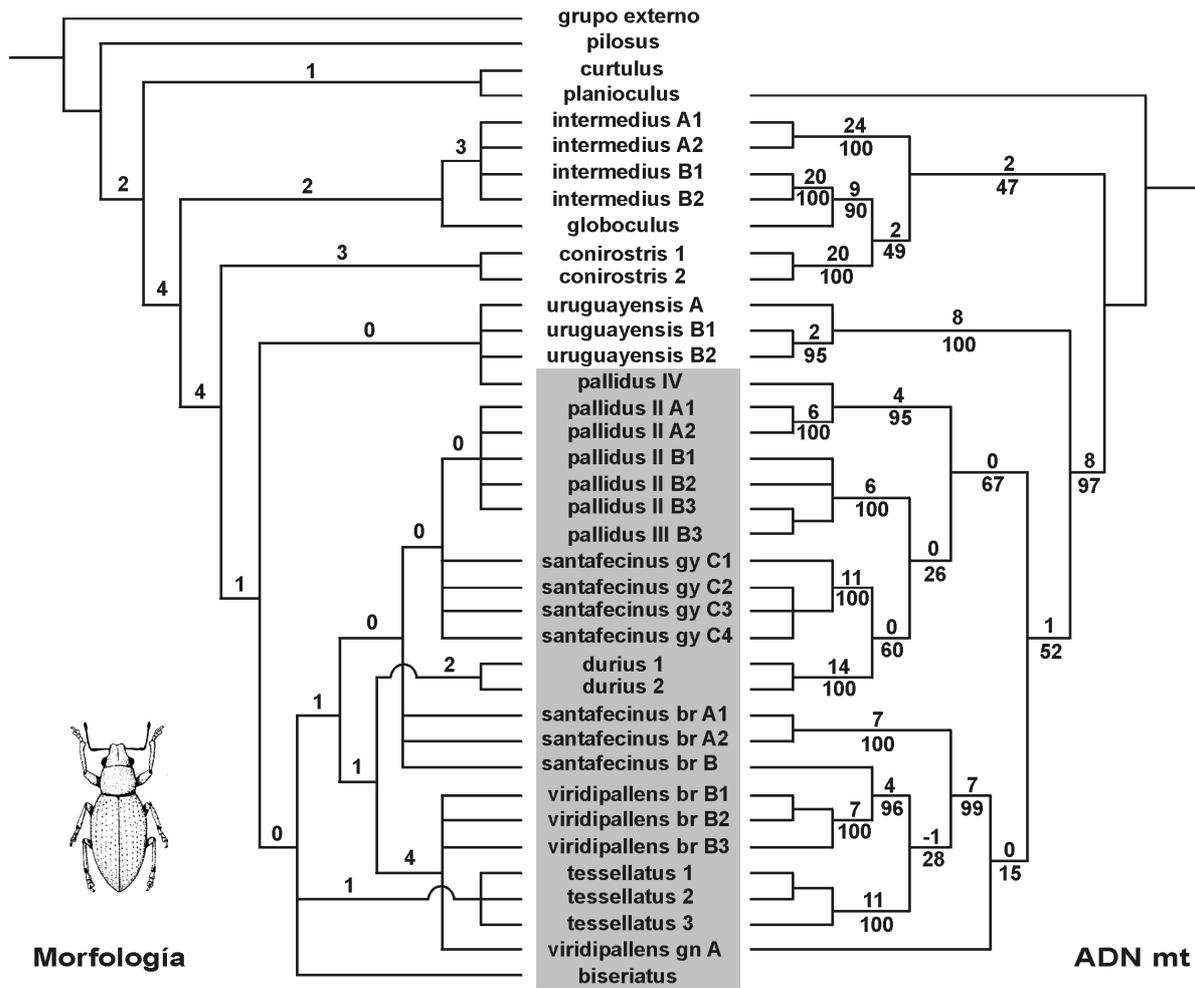


Fig. 2. Cladogramas de *Aramigus* (Coleoptera: Curculionidae) basados en caracteres morfológicos (izquierda) y secuencias de ADNmt (gen COI) (derecha). Las unidades terminales corresponden a haplotipos mitocondriales. La especie compleja *A. tessellatus* (indicada con fondo gris), incluye 24 haplotipos diferentes. Los valores en las ramas expresan medidas de soporte de los grupos: por encima, soporte de Bremer; por debajo, porcentajes de "bootstrap". (Modificado de Normark & Lanteri, 1998).

Estudios de filogenia molecular y su importancia en Biología de la Conservación

Las filogenias de los organismos proveen una descripción de la biodiversidad, dado que brindan información acerca de cómo se distribuye la diversidad genética (expresada en caracteres) entre los taxones estudiados (Moritz, 1995). Se pueden reconstruir filogenias de individuos de una población, con el objeto de obtener información relevante sobre la dinámica histórica de dicha población, o filogenias de especies o poblaciones, que aportarán evidencias sobre cómo ha ocurrido la evolución de un grupo (Harvey & Steers, 1999).

Dado que los caracteres morfológicos son en muchos casos insuficientes para delimitar especies, subespecies, linajes o biotipos, y para reconstruir su filogenia, la evidencia molecular resulta particularmente importante, pues permite ampliar el conocimiento sobre la diversidad genética del grupo (Vanlerberghe-Masutti, 1994; Silva *et al.*, 1999). Un ejemplo interesante en este sentido lo

constituye *Aramigus* Horn (Coleoptera, Curculionidae), género distribuido en Argentina, Uruguay y sur de Brasil que reúne ocho especies, una de las cuales, *A. tessellatus* Say, fue introducida en Chile, México y USA, y reviste importancia agronómica (Lanteri & Díaz, 1994; Normark & Lanteri, 1996). *Aramigus tessellatus* es una especie compleja, sin autapomorfias a nivel morfológico, en la cual se discriminaron seis morfotipos sobre la base de caracteres morfométricos externos, de la espermateca y del conducto espermatecal (Lanteri & Díaz, 1994). El estudio de *Aramigus* mediante secuencias de ADN mitocondrial (gen COI) permitió justificar el monofiletismo del complejo de *A. tessellatus* y distinguir dentro del mismo varios linajes, bisexuales y partenogenéticos (estos últimos generalmente poliploides), y numerosos haplotipos mitocondriales (Normark, 1996a, 1996b; Normark & Lanteri, 1998) (Fig. 2). Las restantes especies del género presentan menor diversidad genética, ya que incluyen entre uno y cuatro haplotipos mitocondriales diferentes y una distribución geográfica más restringida.

La urgencia por realizar un inventario de la diversidad biológica, sumada a los resultados obtenidos a partir de la aplicación de técnicas moleculares en sistemática, ha reactualizado la controversia en torno al concepto de especie (Wheeler & Meier, 2000). Dado que no existe un concepto universal de especie (Claridge *et al.*, 1997), algunos biólogos de la conservación han visto la necesidad de reconocer “unidades evolutivas significativas”, es decir linajes con evolución potencial independiente (Vogler & DeSalle, 1994).

¿Qué unidades evolutivas y áreas prioritarias deberían conservarse tomando en cuenta el caso de *Aramigus* y/o de otros taxones con características similares?

Si se aplicara el criterio de tratar de conservar la mayor cantidad de diversidad genética posible (Harvey & Steers, 1999) nos encontraríamos con la siguiente situación:

- a. Las máxima diversidad específica del género *Aramigus* (cinco especies) se halla en selvas subtropicales de los estados de Mato Grosso do Sul, Paraná y Santa Catarina en Brasil, y en la provincia de Misiones, en Argentina. Estas especies son relativamente homogéneas desde el punto de vista genético.
- b. El mayor número de linajes y haplotipos mitocondriales corresponde a la especie compleja *Aramigus tessellatus*, cuya distribución es parcialmente simpátrida con la de las restantes del género, pero cuyo rango es mucho más amplio, pues abarca el estado de Río Grande do Sul en Brasil, Uruguay, y un área muy extensa de Argentina, desde Misiones hasta la provincia patagónica de Río Negro.

Creemos que en el caso de *Aramigus* las unidades evolutivas significativas no deberían ser las especies, sino los linajes reconocidos mediante caracteres morfométricos y principalmente, gracias al análisis filogenético de secuencias de ADN mitocondrial.

Asimismo, se han planteado dos posiciones diferentes con respecto a la conservación de estas unidades (Tregenza & Butlin, 1999):

- a. Las poblaciones genéticamente más homogéneas están en mayor riesgo y requieren mayor intervención.
- b. Las poblaciones genéticamente más variables tienen mayor valor desde el punto de vista de la biodiversidad y el mayor potencial evolutivo, por lo tanto deberían ser más valoradas.

La distribución del complejo de *A. tessellatus* en un área geográfica de formación geológica reciente (Cuaternaria), su posición en el árbol filogenético y la presencia de linajes con partenogénesis geográfica y poliploidía, sugieren que este complejo se hallaría en plena evolución, como ocurre con muchos otros grupos de insectos que habitan en las praderas de Argentina, Brasil y Uruguay, y que estarían bien adaptados a ambientes altamente disturbados. Estos taxones, aunque poco diversos a nivel específico, son importantes como reservorios de diversidad genética, y su preservación implica salvaguardar su evolución futura, pues cada linaje podría evolucionar en una nueva especie (Lande, 1999).

Los estudios moleculares llevados a cabo en *Aramigus*, y en particular en el complejo *tessellatus*, contribuyen a sustentar la propuesta de algunos biólogos de la conservación, sobre la necesidad de preservar no solamente áreas de megadiversidad o de máxima diversidad genética, sino también, áreas menos ricas en este sentido, pero que constituyen reservorios de diversidad genética de evolución potencial (Brakefield, 1991; Spellerberg, 1991).

Diversidad genética en microhimenópteros parasitoides y sus huéspedes

Entre las especies de insectos que reportan beneficios directos al hombre, se incluyen los himenópteros de la serie parasítica, ampliamente utilizados en el control biológico de plagas agrícolas. Durante las últimas décadas es mucho lo que se ha avanzado en el conocimiento de la filogenia de estos insectos, basada en caracteres morfológicos (Gibson, 1985, 1986; Ronquist, 1995, 1999), sin embargo, en algunos casos dichos caracteres resultan insuficientes para el reconocimiento de especies próximas y linajes partenogénicos, por lo que los marcadores moleculares se han constituido en una poderosa herramienta de estudio (Edwards & Hoy, 1993; Vanlerberghe-Masutti, 1994; Lasalle *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 1999). Además, las técnicas moleculares han adquirido gran significación en la aplicación de estrategias de control biológico, ya que permiten la identificación de biotipos endocriados y silvestres (Aljanabi *et al.*, 1998).

En experiencias de control biológico por medio de parasitoides criados masivamente en laboratorio, se ha observado que al cabo de un cierto período de tiempo se produce una pérdida de efectividad, que puede atribuirse a la disminución de la variabilidad genética (Roehrdanz *et al.*, 1993). Por esta razón resulta fundamental el monitoreo de la diversidad genética dentro y entre linajes o biotipos de especies que se usan como enemigos naturales, a fin de detectar una posible deriva génica que redunde en una pérdida de los atributos que las hacen más efectivas (Rodríguez-Clark, 1999). Asimismo, es preciso cuantificar el flujo génico entre los biotipos liberados en un área determinada y los biotipos indígenas, y comparar su efectividad relativa.

Entre los parasitoides de huevos de Curculionidae se encuentran los microhimenópteros de la familia Mymaridae. Dos especies de dicha familia, *Anaphes sordidatus* y *Anaphes* sp., se usaron para el control de *Listronotus oregonensis*, conocido en USA como “gorgojo de la zanahoria”. Estas especies parasitan el 52% de los huevos de *L. oregonensis*, ejerciendo un control muy importante (Landry *et al.*, 1993). Dichos autores identificaron tres biotipos de *Anaphes* sp. nov. y dos de *Anaphes sordidatus* mediante la técnica de RAPD. Las relaciones genealógicas entre los cinco biotipos estudiados mostró una correlación positiva con la distancia geográfica (Fig. 3). Desde el punto de vista económico, *Anaphes* sp. nov. es una especie más beneficiosa como agente de control biológico, que su especie hermana *A. sordidatus*. Los autores explicaron las posibles causas de la mayor diversidad genética de *Anaphes* sp. nov. con respecto a su especie hermana, basándose en diferencias en su comportamiento reproductivo. Dado que

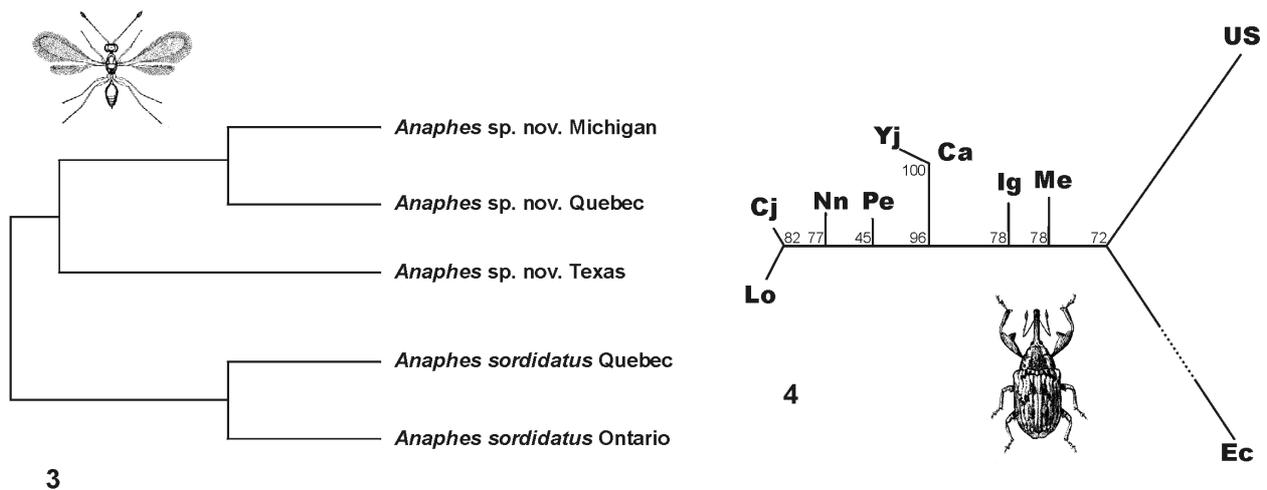


Fig. 3. Cladograma de dos especies de *Anaphes* (Hymenoptera: Mymaridae). Las unidades terminales corresponden a diferentes biotipos, identificados mediante la técnica de RAPD, con diferente distribución geográfica (Modificado de Landry *et al.*, 1993).

Fig. 4. Árbol de Neighbor-Joining de nueve poblaciones de *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) de Brasil (Cj, Lo), Argentina (Nn, Pe, Ig), Paraguay (Yj, Ca), México (Me) y USA (US) y una población de *Anthonomus vestitus* de Ecuador (Ec). Acrónimos= Cj: Carajá, Lo: Londrina, Nn: Laguna Naick Neck, Pe: Puerto Península, Ig: Iguazú, Yj: Yjhoivi, Ca: Caacupé, Me: Tecmán, US: Mississippi, Ec: San Clemente. Los valores en la base de las ramas expresan medidas de soporte de los grupos (porcentajes de "bootstrap") (Modificado de Scataglini *et al.*, 2000).

A. sordidatus es una especie gregaria, la cópula ocurriría frecuentemente entre individuos cercanos (emergidos del mismo huevo o de huevos de la misma postura) y esta intensa endocria sería la causante de su menor heterogeneidad genética y de su distribución geográfica más restringida. En el caso de *Anaphes* sp. nov. habría una mayor variabilidad, pues de cada huevo de *L. oregonensis* emerge un solo individuo del parasitoide, que deberá cruzarse necesariamente con individuos surgidos a partir de otras posturas.

Otro aspecto a tener en cuenta al implementar un programa de control biológico, es que los enemigos naturales de los insectos fitófagos que se comportan como plagas, deberán buscarse preferentemente en el área de distribución original de dicha plaga (DeBach, 1974). En este sentido, las técnicas moleculares constituyen una herramienta de gran utilidad, pues permiten determinar con bastante exactitud, el área de origen de las especies plaga.

En Nueva Zelanda, Lenney Williams *et al.* (1993) aplicaron la técnica de RAPD para conocer el origen de *Listronotus bonariensis*, especie denominada vulgarmente "gorgojo argentino del tallo", causante de perjuicios importantes en cereales y pasturas. Los autores tomaron muestras de poblaciones de Argentina, Chile y Uruguay, y después de analizar la variabilidad genética de las mismas y de compararla con la de las poblaciones establecidas en Nueva Zelanda, concluyeron que la especie había sido introducida desde alguna localidad ribereña del Río de La Plata.

Scataglini *et al.* (2000) emplearon la misma técnica para determinar el origen y dispersión en América del Sur, de *Anthonomus grandis*, especie conocida vulgarmente

como "picudo mexicano del algodón". El árbol de Neighbor-Joining de las poblaciones de Argentina, Brasil y Paraguay, donde se incluyeron además muestras de México y USA (potenciales fundadoras o fuente), muestra que la población de Iguazú (Argentina), procedente de un área de vegetación nativa se relaciona estrechamente con la de México, a pesar de la gran distancia geográfica que las separa (Fig. 4). En consecuencia, se planteó la hipótesis de una posible conexión histórica entre las poblaciones de ambas áreas (pertenencia a una misma biota ancestral), la cual se vio corroborada por los resultados preliminares de un estudio filogeográfico llevado a cabo por las mismas autoras Confalonieri *et al.* (2000). El sur de México sería el área de distribución original del picudo del algodón (Burke *et al.*, 1986), y allí se encontró un importante agente de control biológico, el pteromárido *Catolaccus grandis*.

Finalmente cabe mencionar el interrogante que se ha planteado con respecto a la compatibilidad de los estudios clásicos de control biológico y la conservación de los insectos (Samways, 1988). Si una plaga exótica se considera un contaminante biótico, el establecimiento de un agente de control biológico también exótico, representaría una contaminación subsecuente, aunque reduzca los niveles de la primera introducción, por lo tanto control biológico y conservación no serían totalmente compatibles (Samways, 1994).

Hasta el presente no se han registrado casos bien documentados de enemigos naturales introducidos que hayan causado daños en faunas nativas. Sin embargo, la práctica de liberación inundativa de biocontroladores exóticos se realiza actualmente con mayor precaución que en los primeros años del control biológico, ya que se

considera que si no son específicos, podrían afectar a los huéspedes indígenas o a las poblaciones de enemigos naturales nativos (Samways, 1994).

El control biológico clásico es favorable a la conservación cuando un herbívoro oligófago causa perjuicios en una reserva natural. Por ejemplo, la cochinilla *Aonidiella aurantii* infestaba árboles como *Trichilia* spp y *Rhus* spp. en reservas de Sudáfrica, y fue controlada por el parasitoide introducido *Aphytis melinus* y por la mariquita *Chilocorus nigritus*, como así también por la especie indígena *Aphytis africanus* (Samways, 1994).

Estudios filogeográficos y su importancia en Biología de la Conservación

Los análisis estadísticos de la variación genética (Nei, 1972; Wright, 1977; Lynch & Crease, 1990) son sumamente útiles para el estudio de la estructura y dinámica de las poblaciones, pero ignoran los factores históricos que afectan la distribución poblacional. Las nuevas técnicas para el estudio de secuencias del ADN mitocondrial permiten analizar la diversidad genética de las poblaciones y superponer los árboles o redes obtenidos, con la distribución geográfica (filogeografía). De este modo se estudia la distribución de los haplotipos mitocondriales (variantes del ADN mitocondrial) dentro y entre las poblaciones en relación con la historia de esos haplotipos (Roderick, 1996).

Una población se considera ancestral o antigua, cuando posee numerosos y muy diferentes haplotipos, y reciente o colonizadora, si tiene uno o unos pocos haplotipos. Asimismo, la presencia de un mismo haplotipo en varias poblaciones, es evidencia de su origen común. Los estudios de filogeografía empleando análisis de ADN mitocondrial permiten interpretar la historia evolutiva de las especies y su dispersión, ya que brindan información relevante sobre su rango de expansión, colonización y fragmentación pasada y sobre la estructura de sus poblaciones (Avice, 2000).

En la actualidad, la filogeografía está siendo muy utilizada para estudiar la colonización y diversificación de diferentes grupos de organismos, en varios archipiélagos. Algunos de los trabajos más relevantes corresponden al archipiélago de Canarias y están basados en el estudio de insectos (Emerson *et al.*, 1999, 2000; Juan *et al.*, 2000; Rees *et al.*, 2001a, 2001b). Lanteri y colaboradores han comenzado a realizar investigaciones similares en el archipiélago de Galápagos, que son una continuación de trabajos anteriores (Lanteri, 1992; Sequeira *et al.*, 2000) (Fig. 5) y están llevando a cabo un estudio filogeográfico en el picudo del algodón *Anthonomus grandis* (Confalonieri *et al.*, 2000).

En el caso de los archipiélagos, se ha comprobado que la filogeografía de ciertas especies se ajusta a un modelo de colonización secuencial, desde islas más antiguas a otras geológicamente más nuevas; pero en otros casos los modelos son más complejos, con varias colonizaciones, recolonizaciones desde islas próximas, especiación dentro de una misma isla y extinciones (Juan *et al.*, 2000). La metodología de análisis aplicada en filogeografía puede tener implicancias muy importantes en Biología de la

Conservación, en especial en el estudio de la fragmentación de los hábitats naturales, ya que los fragmentos se comportan en gran medida como islas (Diamond, 1975), y por lo tanto en ellos se dan procesos de migración, colonización, recolonización y extinción, como ocurre en los archipiélagos (Burkey, 1995).

Genética de poblaciones en el estudio de la fragmentación de los hábitats naturales

La distribución espacial de muchas especies se ve actualmente fragmentada en parches de hábitats naturales, separados por grandes áreas que son no adecuadas para su supervivencia. Los efectos de esta estructura espacial tienen consecuencias en la diversidad genética y evolución a largo plazo de las especies, y son de gran interés para los genetistas de poblaciones (Burkey, 1989; Templeton *et al.*, 1990; Harwood & Amos, 1999).

Las investigaciones sobre los efectos biológicos de la fragmentación de los hábitats, ha sido primariamente objeto de estudios ecológicos, que se concentraron en los cambios en la riqueza y composición de especies, y en la dinámica de algunas poblaciones. Recientemente, la atención sobre las consecuencias de la fragmentación en la viabilidad de las especies ha pasado al campo de estudio de la genética de poblaciones (Hedrick, 1996; Young *et al.*, 1996).

Las predicciones iniciales sobre poblaciones reducidas y aisladas en hábitat fragmentados, basadas en la teoría de biogeografía de islas llevaron a la suposición teórica de erosión de la variación genética e incremento de la divergencia entre poblaciones debido a: incremento de la deriva génica, elevada endocria, flujo génico interpoblacional reducido e incremento de la probabilidad de extinciones locales de demos dentro de una metapoblación. Estos factores afectarían la persistencia de las especies: en el corto plazo, la pérdida de la heterocigosis reduciría el ajuste individual y la viabilidad de las poblaciones; en el largo plazo, la reducción en riqueza de alelos, limitaría la habilidad de la especie para responder a presiones de selección cambiantes (Young *et al.*, 1996).

No obstante las predicciones mencionadas, estudios empíricos recientes llevaron a cabo en plantas (Giles & Goudet, 1997) y en insectos (Harrison 1991; Harrison *et al.*, 1998; Pullin, 1995; Thomas & Hanski, 1997), principalmente mariposas, sugieren que no todos los eventos de fragmentación conducirían a la pérdida de variabilidad genética, pues algunos fragmentos pequeños incluyen mayor número de especies que el esperado o son los únicos que contienen poblaciones, también pequeñas, de ciertas especies. Estos hallazgos hicieron resurgir la teoría de la dinámica de metapoblaciones, cuyas predicciones se contraponen en cierta medida con las que surgen de la teoría de biogeografía de islas. Una metapoblación puede definirse como una "población de poblaciones" o una "estructura espacial de poblaciones reproductivas locales, donde la migración entre poblaciones locales tiene efecto en la dinámica a largo plazo, incluyendo la posibilidad de reestablecimiento de poblaciones previamente extinguidas" (Hanski & Simberloff, 1997). Migraciones, colonizaciones y extinciones son los principales procesos involucrados en el estudio de las metapoblaciones.

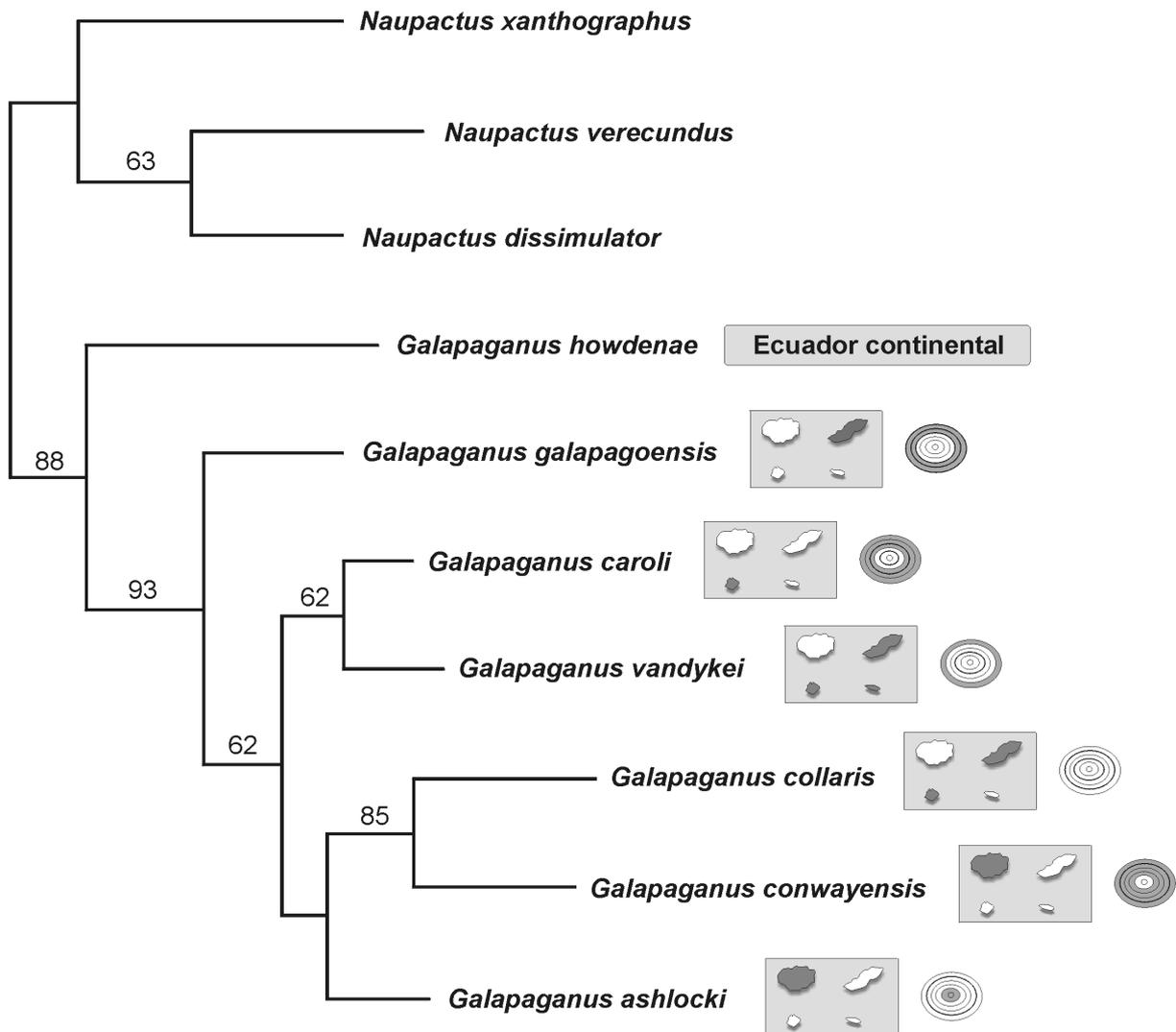


Fig. 5. Arbol filogenético de siete especies de *Galapaganus* (Coleoptera: Curculionidae) y tres especies de *Naupactus*, utilizadas como grupo externo, basado en secuencias de ADNmt (gen COI) y datos morfológicos. La longitud de las ramas es proporcional a la cantidad de divergencia molecular. Los diagramas a la derecha de los nombres indican la distribución de las especies en las islas del archipiélago de Galápagos y la zona ecológica que ocupan dentro de las mismas. Los valores en la base de las ramas expresan medidas de soporte de los grupos (porcentajes de "bootstrap") (Modificado de Sequeira *et al.*, 2000).

El modelo metapoblacional ha sido comprobado en *Euphydryas editha* y otras especies de mariposas (Thomas & Hanski, 1997; Harrison *et al.*, 1998). Verdyck *et al.* (2000) detectaron una estructura metapoblacional, con extinciones y recolonizaciones recurrentes, en el crisomélido endémico de las islas Galápagos, *Nesaecrepida darwini*, utilizando electroforesis de alozimas, RAPDs y secuencias de ADN mitocondrial. La estructura metapoblacional, sin embargo, no puede generalizarse para todos los insectos y menos aun para otros organismos de mayor tamaño corporal. Numerosos estudios indican que poblaciones pequeñas y aisladas tienen escasas posibilidades de persistir a largo plazo / y son más vulnerables a la extinción que las poblaciones grandes (Samways, 1989; Dempster, 1991; Mc Cauley, 1991; Thomas, 1994).

Las predicciones de la teoría de biogeografía de islas y de los modelos de dinámica metapoblacional sirvieron de argumento para el debate sobre cuál es la mejor estrategia para la conservación de las especies: si establecer una sola reserva grande o varias pequeñas (Diamond, 1975; Wilson & Willis, 1975; Wilcox & Murphy, 1985; Spellerberg, 1991). Los resultados de las investigaciones llevadas a cabo en el marco del "Proyecto de Dinámica Biológica de Fragmentos Forestales" (PDBFF), que tiene por objeto evaluar los efectos de la fragmentación de la selva amazónica, mediante la comparación de 25 fragmentos de selva de distintos tamaños (1 a 1000 hectáreas de extensión), aislados entre áreas de pastizales, sugieren que ambas estrategias son necesarias para la conservación del mayor número de especies.

La distancia entre los fragmentos y la capacidad de los organismos o propágulos para moverse entre los mismos, es de importancia crítica para evaluar cómo la estructura espacial afecta la estabilidad y dinámica de las poblaciones locales, como así también su efecto sobre la diversidad genética (Rohani *et al.*, 1997). La movilidad de los insectos determina en gran medida su supervivencia en ambientes modificados de modo que especies estenotópicas de escasa movilidad son más afectadas por los cambios ambientales (Desender & Turín, 1989; Samways, 1989; den Boer, 1990).

Los estudios sobre los efectos de la fragmentación han develado además otros aspectos importantes sobre el problema de la conservación de las especies. Por ejemplo, la capacidad de carga de los fragmentos estará determinada no sólo por su tamaño (balance entre inmigración /extinción) sino por la extensión del efecto borde (cambios profundos en el hábitat y recursos en los bordes del fragmento) (Murcia, 1995; Malcolm, 1997). Hopkins & Webb (1984) observaron que la diversidad y abundancia de ciertas especies de escarabajos se incrementa en algunos fragmentos, debido a este efecto. Otro factor que tiene gran influencia en la riqueza específica de los fragmentos es la heterogeneidad de hábitats (Hughes *et al.*, 2000), observándose en el caso de los insectos fitófagos, una correlación positiva entre hábitats más heterogéneos y riqueza de sus huéspedes (Brown Jr., 2000).

Se espera que las investigaciones sobre diversidad genética de las poblaciones de insectos en hábitats fragmentados, que actualmente se están llevando a cabo, aporten información fundamental para establecer estrategias de conservación. Uno de los proyectos en marcha que merece destacarse, es el que comenzó a realizarse en 1997 un grupo de investigadores de varias universidades de Bélgica, en la región de Flanders, cuyos bosques cubren actualmente sólo el 10% de la superficie que ocupaban en el pasado. El proyecto sobre biodiversidad de artrópodos que dirige Desender *et al.* (2000a, 2000b) contempla el estudio de 56 sitios, en 40 bosques y trabaja sobre especies de Carabidae, Araneae y dípteros de las familias Empididae y Dolichopodidae. Estos organismos "target" o indicadores, fueron elegidos debido a que su taxonomía y biología han sido bien estudiadas, poseen numerosas especies, se conoce su distribución pasada y presente en la región, y son abundantes en las muestras.

El uso de grupos indicadores bien conocidos como mariposas, aves y mamíferos, para el estudio de la riqueza total de especies de un área, ha sido propuesto por varios especialistas (Brown, 1991; Kremen, 1992; Pearson & Cassola, 1992; Prendergast *et al.*, 1993; Lawton *et al.*, 1998). La elección de grupos indicadores depende en general de varios aspectos, tales como el conocimiento taxonómico y ecológico sobre estos grupos, los objetivos del trabajo y la escala de evaluación, y la disponibilidad de material y de recursos humanos (Samways, 1994). En los estudios sobre los efectos de la fragmentación en los neotrópicos, por ejemplo, se están empleando como grupos indicadores, especies de mariposas, libélulas y hormigas, ya que son abundantes y fáciles de reconocer (Brown Jr., 2000). Para desarrollar investigaciones sobre dinámica poblacional o genética de poblaciones, la elección de

especies o grupos indicadores resulta imprescindible, a pesar de las dificultades que su elección comporta.

En los últimos años del siglo XX, la genética ecológica o ecología molecular (Ford, 1975) se ha convertido en una de las disciplinas fundamentales para el estudio de la biología de la conservación de los insectos (Berry, 1971). Sin embargo, para realizar predicciones con base científica, no resulta suficiente estimar la variación en loci marcadores, ya sean alozimas o secuencias de ADN. Todavía falta mucho por conocer sobre la relación entre diversidad genética y ciertos caracteres críticos para la supervivencia de las poblaciones y especies, como por ejemplo, sistemas de apareamiento y tendencias ecológicas relevantes (Trenza & Butlin, 1999).

No existe ni tiempo ni recursos suficientes para trazar planes de conservación para cada especie particular de organismos y menos aún de grupos "no carismáticos" como son los insectos (Hughes *et al.*, 2000). Los estudios relacionados con la genética y la ecología de poblaciones en determinados grupos de insectos, serán fundamentales para el desarrollo de la Biología de la Conservación en la próxima década.

Conclusiones

- Las modernas técnicas moleculares constituyen herramientas de gran utilidad para estudiar la independencia y/o historia de conexión entre poblaciones, y para revelar patrones de migración. Los datos resultantes, en conjunción con información ecológica y biogeográfica, serán fundamentales en el momento de hacer predicciones sobre la persistencia de las especies, y de adoptar medidas para su preservación.
- La reducción de la variabilidad genética y la heterocigosis de las poblaciones representan factores que pueden ser indicativos del riesgo de extinción de las especies. Esta pérdida puede detectarse mediante el estudio de polimorfismos de isozimas, análisis del ADN y variación de caracteres morfométricos.
- Mantener las poblaciones en un efectivo poblacional alto, previene la depresión por endocria y la pérdida de variabilidad, dos factores que afectan la adaptabilidad o ajuste de las especies al medio. Sin embargo debe tenerse en cuenta que la reducción de la variabilidad de las poblaciones no depende sólo de su tamaño, sino también de otros factores que intervienen en la dinámica poblacional, tales como patrones de apareamiento, tipo de reproducción, estructura de edades, tasas de mortalidad, migraciones etc.
- La diversidad genética es uno de los atributos de la biodiversidad, en consecuencia, cuando se adopten medidas sobre la conservación de las especies se deberá tomar en cuenta la necesidad de preservar la mayor cantidad de diversidad genética posible.
- Las filogenias de distintos grupos de organismos describen cómo la diversidad genética se distribuye entre los taxones. El largo de las ramas de un árbol filogenético expresa la cantidad de cambio genético entre los nodos y desde los nodos hasta el extremo

terminal, y permite estimar las tasas de cambio de los caracteres.

- La información que proveen los estudios moleculares permite reconocer especies, subespecies, biotipos y linajes que son indistinguibles utilizando sólo datos morfológicos. De este modo, el conocimiento de la biodiversidad se ve acrecentado.
- Los insectos cumplen papeles importantes en el funcionamiento ecológico de los ecosistemas. El estudio de la diversidad genética de al menos algunas de las especies “target” o indicadoras, permitirá evaluar posibles declinaciones y riesgos de extinción, y adoptar las medidas más convenientes.
- Los marcadores moleculares son de capital importancia para monitorear la diversidad genética de las especies benéficas, por ejemplo, los microhimenópteros que se utilizan en el control biológico de plagas.

Agradecimiento

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Argentina (CONICET), por su constante apoyo a nuestras investigaciones. Asimismo agradecemos a los evaluadores anónimos del manuscrito y a los editores de este volumen especial de *PriBES*, por los aportes y sugerencias realizadas, para mejorar este trabajo.

Bibliografía

- ALJANABI, S. M., M. S. LOIÁCONO, R. T. LORUENÇO, M. BORGES & M. S. TIGANO 1998. RAPD analysis revealing polymorphism in egg parasitoids of soybean stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae). *An. Soc. Entomol. Bras.* **27**(3): 413-420.
- ALLENDFORD, W. & R. F. LEARY 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. In: SOULÉ, M. E. (ed.). *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, págs. 57-76.
- AMOS, W. 1999. Two problems with measurement of genetic diversity and genetic distance. In: LANDWEBER, L. F. & A. P. DOBSON (eds.). *Genetics and the extinction of species. DNA and the conservation of biodiversity*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, págs. 75-100.
- AVISE, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Chapman and Hall, New York.
- AVISE, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- AVISE, J. C. & J. L. HAMRICK (eds.) 1996. *Conservation genetics, case histories from nature*. Chapman and Hall, New York.
- BAKER, C. S. & R. S. PALUMBI 1994. Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science* **265**: 1538-1539.
- BERRY, R. J. 1971. Conservation aspects of the genetical constitution of populations. In: DUFFEY, E. & A. S. WATT (eds.). *The scientific management of animal and plant communities for conservation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, págs. 177-206.
- DEN BOER, P. J. 1990. The survival value of dispersal terrestrial arthropods. *Biol. Cons.* **54**: 175-192.
- BRAKEFIELD, P. M. 1991. Genetics and the conservation of invertebrates. In: SPELLERBERG, I. F., F. B. GOLDSMITH & M. G. MORRIS (eds.). *The scientific management of temperate communities for conservation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, págs. 45-79.
- BROWN, K. S. 1991. Conservation of neotropical environments: insects as indicators. In: COLLINS N. M. & J. A. THOMAS (eds.). *The conservation of insects and their habitats*. 15th Symposium of the Royal Entomol. Soc. London, Academic Press, New York, págs. 350-404.
- BROWN, K. S. Jr. 2000. Butterflies as indicators for conservation in fragmented landscapes in the neotropics. *XXI International Congress of Entomology, Brasil. Abstract*, Book I: 107.
- BURKE, H. R., W. E. CLARK, J. R. CATE & P. A. FRYXELL 1986. Origin and dispersal of the boll weevil. *Bull. Entomol. Soc. Am.* **32**: 228-238.
- BURKEY, T. V. 1989. Extinction in nature reserves: the effect of fragmentation and the importance of migration between reserve fragments. *Oikos* **55**: 75-81.
- BURKEY, T. V. 1995. Extinction rates in archipelagoes: Implications for populations in fragmented habitats. *Cons. Biol.* **9**: 527-541.
- CAUGHLEY, G. 1994. Directions in conservation biology. *J. Animal Ecol.* **63**: 215-244.
- CLARIDGE, M. F., H. A. DAWAHK & M. R. WILSON 1997. *Species: the units of biodiversity*. Chapman and Hall, London.
- CONFALONIERI, V. A. 1994. Inversion polymorphisms and natural selection in *Trimerotropis pallidipennis* (Orthoptera). I. Correlations with geographical variables. *Hereditas* **121**: 79-86.
- CONFALONIERI, V. A., 1999. Polimorfismos cromosómicos y selección natural en *Trimerotropis pallidipennis*: análisis de caracteres isoenzimáticos y del ADN. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* **58**(1-2): 137-145.
- CONFALONIERI, V. A., M. A. SCATAGLINI & A. A. LANTERI 2000. Origin and dispersal of the cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: a mtDNA phylogeographic study. *XXI Int. Cong. Entomol. (ICE), Brazil. Abstracts*, Book 1, pág. 566.
- DEBACH, P. 1974. *Biological control by natural enemies*. Cambridge University Press, London, UK.
- DEMPSTER, J. P. 1991. Fragmentation, insolation and mobility of insect populations. In: COLLINS, N. M. & J. A. THOMAS (eds.). *The conservation of insects and their habitats*. 15th Symposium of the Royal Entomol. Soc. London, págs. 143-153.
- DESENDER, K. & H. TURIN 1989. Loss of habitats and changes in the composition of the ground and tiger beetle fauna in four west European countries since 1950 (Coleoptera: Carabidae, Cicindelidae). *Biol. Cons.* **48**: 277-294.
- DESENDER, K., D. DE BAKKER, P. GROOTAERT, M. POLLET, L. DE BRUYN, B. DE VOS & J. P. MAELFAIT 2000a. Beetles, spiders and flies as bio-indicators in forests: a large scale research project in Flanders (Belgium). *XXI Int. Congr. Entomol., Brasil, Abstract*, Book I: 482.
- DESENDER, K., P. VERDYCK, V. VERSTEIRT & J. Y. RASPLUS 2000b. Carabid beetles as model organisms in population genetic studies on highly fragmented temperate forest (Flanders, Belgium). *XXI Int. Congr. Entomol., Brasil. Abstract*, Book I: 482.
- DIAMOND, J. M. 1975. The island dilemma: lessons of modern biogeographic studies for the design of natural reserves. *Biol. Cons.* **7**: 129-146.
- EDWARDS, O. R. & M. A. HOY 1993. Polymorphism in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Biol. Contr.* **3**: 243-257.
- EMERSON, B. C., P. OROMÍ & G. M. HEWITT 1999. mtDNA phylogeography and recent intra-island diversification among Canary Island *Calathus* beetles (Carabidae). *Molec. Phylog. Evol.* **13**: 149-158.
- EMERSON, B. C., P. OROMÍ & G. M. HEWITT 2000. Tracking colonization and diversification of insect lineages on islands: mitochondrial DNA phylogeography of *Tarphius canariensis* (Coleoptera: Colydiidae) on the Canary Islands. *Proc. R. Soc. Lond. B* **267**: 2199-2205.
- FAITH, D. P. 1992. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol. Cons.* **61**: 1-10.
- FAITH, D. P. 1994. Phylogenetic diversity: a general framework for the prediction of feature diversity. In: FOREY, P. L., C. J. HUMPHRIES & I. VANE-WRIGHT (eds.). *Systematics and conservation evaluation*. Systematics Association, Special vol. 50, Clarendon Press, Oxford, págs. 251-268.
- FORD, E. B. 1975. *Ecological genetics*, Chapman and Hall, London.
- GEORGIADIS, N., L. BISCHOF, A. TEMPLETON, J. PATTON, W. KARESH & D. WESTERN 1994. Structure and history of African elephant populations: I. Eastern and southern Africa. *J. Heredity* **85**: 100-104.
- GIBSON, G. A. P. 1985. Some pro- and mesothoracic characters important for phylogenetic analysis of Hymenoptera, with a review of terms used for structures. *Can. Entomol.* **117**: 1395-1443.
- GIBSON, G. A. P. 1986. Evidence for monophyly and relationships of Chalcidoidea, Mymaridae, and Mymaromatidae (Hymenoptera: Terebrnates). *Can. Entomol.* **118**: 205-240.
- GILES, B. E. & J. GOUDET 1997. A case study of genetic structure in a plant metapopulation. In: HANSKI, I. & M. GILPIN (eds.). *Metapopulation dynamics: ecology, genetics, and evolution*. Academy Press, New York, págs. 429-454.
- GILPIN, M. E. & M. E. SOULÉ 1986. Minimum viable populations: processes of species extinction. In: SOULÉ M. E. (ed.). *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Massachusetts, págs. 19-34.

- GÓMEZ ZURITA, J., E. PETITPIERRE & C. JUAN 2000. Nested cladistic analysis, phylogeography and speciation in the *Timarcha goettingensis* complex (Coleoptera, Chrysomelidae). *Molec. Ecol.* **9**: 557-570.
- HANSKI, I. & D. SIMBERLOFF 1997. The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation. In: HANSKI, I. & M. E. GILPIN (eds.). *Metapopulation biology: ecology, genetics and evolution*. Academic Press, San Diego, CA. págs. 5-26.
- HARLT, D. L. 1980. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
- HARRISON, S. 1991. Local extinctions in a metapopulation context: an empirical evaluation. In: GILPIN, M. E. & I. HANSKI (eds.). *Metapopulation dynamics: empirical and theoretical investigations*. Academic Press, London, págs. 73-88.
- HARRISON, S., D. D. MURPHY & P. R. EHRLICH 1998. Distribution of the bay checkerspot butterfly, *Euphydryas editha bayensis*: evidence for a metapopulation model. *Am. Nat.* **132**: 360-382.
- HARVEY, P. & H. STEERS 1999. One use of phylogenies for conservation biologists: inferring population history from gene sequences. In: LANDWEBER, L. F. & A. P. DOBSON (eds.) *Genetics and the extinction of species. DNA and the conservation of biodiversity*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, págs. 101-120.
- HARWOOD, J. & W. AMOS 1999. Genetic diversity in natural populations. In: MARGURRAN, A. E. & R. M. MAY (eds.). *Evolution of Biological Diversity*. Oxford University Press, New York.
- HEDRICK, P. W. 1996. Conservation genetics and molecular techniques: a perspective. In: SMITH, T. B. & R. K. (eds.), *Molecular Genetic Approaches in conservation*. Oxford University Press, New York, págs. 459- 477.
- HOPKINS, P. J. & N. R. WEBB 1984. The composition of the beetle and spider faunas on fragmented heathlands. *J. Appl. Ecol.* **21**: 935-946.
- HUGHES, J.B., G. C. DAILY & P. R. EHRLICH 2000. Conservation of insect diversity: a habitat approach. *Cons. Biol.* **14**(6): 1788-1797.
- HUMPHRIES, C. J., P. H. WILLIAMS & R. I. VANE-WRIGHT 1995. Measuring biodiversity value for conservation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **26**: 93-111.
- HUNTER, M. L. Jr. 1996. *Fundamentals of conservation biology*, Blackwell Science, Cambridge, MA.
- JUAN, C., B. C. EMERSON, P. OROMÍ & G. M. HEWITT 2000. Colonization and diversification: towards a phylogeographic synthesis for the Canary Islands. *TREE* **15**: 104-109.
- KOHN, M., F. KNAUER, A. STOFFELLA, W. SCHRODER & S. PÄÄBO 1995. Conservation genetics of the European brown bear - a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molec. Ecol.* **4**: 95- 103.
- KREMEN, C. 1992. Assessing the indicator properties of species assemblages for natural areas monitoring. *Ecol. Appl.* **2**: 203-217.
- LANDE, R. 1999. Extinction risks from anthropogenic, ecological and genetic factors. In: LANDWEBER, L. F. & A. P. DOBSON (eds.) *Genetics and the extinction of species. DNA and the conservation of biodiversity*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, págs. 1-22.
- LANDRY, B. S., L. DEXTRAZE & G. BOIVIN 1993. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. *Genome* **36**: 580-587.
- LANDWEBER, L. F. 1999. Something old for something new: the future of ancient DNA in conservation biology. In: LANDWEBER, L. F. & A. P. DOBSON (eds.) *Genetics and the extinction of species. DNA and the conservation of biodiversity*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, págs. 163-186.
- LANDWEBER, L. F. & A. P. DOBSON (eds.) 1999. *Genetics and the extinction of species. DNA and the conservation of biodiversity*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 189 pp.
- LANTERI, A. A. 1992. Systematics, cladistics and biogeography of a new weevil genus *Galapaganus* (Coleoptera: Curculionidae) from the Galápagos Islands, and coasts of Ecuador and Perú. *Trans. Am. Entomol. Soc.* **118**(2): 227-267.
- LANTERI, A. A. & N. B. DÍAZ 1994. Systematic study and cladistic analysis of the genus *Aramigus* Horn (Coleoptera: Curculionidae). *Trans. Am. Entomol. Soc.* **120**(2): 113-144.
- LANTERI, A. A., M. A. SCATAGLINI & V. A. CONFALONIERI 2000. Caracterización de las poblaciones de *Anthonomus grandis* en Argentina, Brasil y Paraguay, mediante la técnica de RAPD's. *III Seminario Internacional del Proyecto de Manejo Integrado del Picudo del algodón en Argentina, Brasil y Paraguay. Actas*: 33-40.
- LASALLE, J. N., N. GAUTHIER, D. L. QUICKE & H. C. L. GODFRAY 1999. Phylogeny of the Eulophidae: morphological, molecular and biological perspectives. *Abstracts of the 4th International Hymenopterists Conference*, 6-11th January 1999, Canberra, Australia, 44.
- LAWTON, J. H., D. E. BIGNELL, B. BOLTON, G. F. BLOEMERS, P. EGGLETON, P. M. HAMMOND, M. HODDA, R. D. HOLT, T. B. LARSEN, N. A. MAWDSLEY, N. E. STORK, D. S. SRIVASTAVA & A. D. WATT 1998. Biodiversity inventories, indicator taxa, and effects of habitat modification in tropical forest. *Nature* **391**: 72-76.
- LENNEY WILLIAMS, C., S. L. GOLDSON, D. B. BAIRD & D. W. BULLOCK 1994. Geographical origin of an introduced insect pest, *Listronotus bonariensis* (Kuschel), determined by RAPD analysis. *Heredity* **72**: 412-419.
- LYNCH, M. & T. J. CREASE 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molec. Biol. Evol.* **7**: 377-394.
- MAC ARTHUR, R. H. & E. O. WILSON 1967. *The theory of island biogeography*. Princeton Univ. Press, Princeton, NY.
- MALCOLM, J. R. 1997. Insect biomass in Amazonian forest fragments. In: STORK, N.E., J. ADIS & R. K. DIDHAM (eds.). *Canopy arthropods*. Chapman & Hall, London, págs. 510-533.
- MALLETT, J. 1996. The genetics of biological diversity: from varieties to species. In: GASTON, K. J. (ed.). *Biodiversity: a biology of numbers and difference*. Oxford: Blackwell Science, págs. 13-53.
- MARTÍN-PIERA, F. 1997. Apuntes sobre biodiversidad y conservación de insectos: Dilemas, ficciones y ¿soluciones? *Bol. SEA* (volumen monográfico Los Artrópodos y el Hombre) **20**: 25-55.
- MCARDLE, B. H. & I. P. WOIWOD 1998. Extinction and the variability of populations. In: BAUMGÄRNER *et al.* (eds.). *Population and Community Ecology for insect management and conservation*, págs. 75-87.
- MCCAULEY, D. E. 1991. Genetic consequences of local population extinction and recolonization. *TREE* **6**: 5-8.
- MITTON, J. B. & M. C. GRANT 1984. Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **15**: 479-499.
- MORITZ, C. 1995. Uses of molecular phylogenies for conservation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **349**: 113-118.
- MURCIA, C. 1995. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *TREE* **10**: 58-62.
- NEI, M. 1972. Genetic distances between populations. *Am. Nat.* **106**: 283-292.

- NIXON, K. C. & Q. D. WHEELER 1992. Measures of phylogenetic diversity. *In: NOVACEK, M. J. & Q. D. WHEELER (eds.). Extinction and phylogeny.* Columbia University Press, New York, págs. 216-234.
- NORMARK, B. B. 1996 a. Phylogeny and evolution of parthenogenetic weevils of the *Aramigus tessellatus* species complex (Coleoptera: Curculionidae: Naupactini): Evidence from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* **50**: 734-745.
- NORMARK, B. B. 1996 b. Polyploidy of parthenogenetic *Aramigus tessellatus* (Say) (Coleoptera: Curculionidae). *Coleopt. Bull.* **50**: 73-79.
- NORMARK, B. B. & A. A. LANTERI 1996. *Aramigus uruguayensis* (Coleoptera: Curculionidae), a new species based on mitochondrial DNA and morphological characters. *Entomol. News* **107**(5): 311-316.
- NORMARK, B. B. & A. A. LANTERI 1998. Incongruence between morphological and mitochondrial DNA characters suggests hybrid origins of parthenogenetic weevil lineages (genus *Aramigus*). *Syst. Biology* **47**(3): 475-494.
- PEARSON, D. L. & F. CASOLA 1992. World-wide species richness patterns of tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae): indicator taxon for biodiversity and conservation studies. *Cons. Biol.* **6**: 376-391.
- PRENDERGAST, R. J., R. M. QUINN, J. H. LAWTON, B. C. EVERS-HAM & D. W. GIBBONS 1993. Rare species: the coincidence of diversity hotspots and conservation strategies. *Nature* **365**: 335-337.
- PULLIN, A. S. (ed.) 1995. *Ecology and conservation of butterflies*, Chapman & Hall, Londres.
- REES, D. J., B. C. EMERSON, P. OROMÍ & G. M. HEWITT 2001a. Mitochondrial DNA, ecology and morphology: interpreting the phylogeography of the *Neosotes* (Coleoptera: Tenebrionidae) of Gran Canaria (Canary Islands). *Molec. Ecol.* **10**: 427-434.
- REES, D. J., B. C. EMERSON, P. OROMÍ & G. M. HEWITT 2001b. Reconciling gene trees with organism history: the mtDNA phylogeography of three *Neosotes* species (Coleoptera: Tenebrionidae) on the Western Canary islands. *J. Evol. Biol.* **14**: 139-147.
- RODERICK, G. K. 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annu. Rev. Entomol.* **41**: 325-352.
- RODRÍGUEZ-CLARK, K. 1999. Genetic theory and evidence supporting current practices in captive breeding for conservation. *In: LANDWEBER, L. F. & A. P. DOBSON (eds.) Genetics and the extinction of species. DNA and the conservation of biodiversity.* Princeton University Press, Princeton, New Jersey, págs. 47-74.
- ROEHRDANZ, R.L., D.K. REED & R.L. BURTON 1993. Use of polymerase chain reaction and arbitrary primers to distinguish laboratory-raised colonies of parasitic Hymenoptera. *Biol. Contr.* **3**: 199-206.
- ROHANI, P. R. M. MAY & M. P. HASSELL 1997. Metapopulations and equilibrium stability - the effects of spatial structure. *J. Theor. Biol.* **181**: 97-109.
- RONQUIST, F. 1995. Phylogeny and early evolution of the Cynipoidea (Hymenoptera). *Syst. Ent.* **20**: 309-335.
- RONQUIST, F. 1999. Phylogeny, classification and evolution of the Cynipoidea. *Zool. Scr.* **28** (1-2): 139-164.
- SAMWAYS, M. J. 1988. Classical biological control and insect conservation: are they compatible? *Environ. Cons.* **15**(4): 349-355.
- SAMWAYS, M. J. 1989. Insect conservation and landscape ecology: a case-history of bush crickets (Tettigoniidae) in southern France. *Environ. Cons.* **16**: 217-226.
- SAMWAYS, M. J. 1994. *Insect conservation biology.* Chapman & Hall, London, New York.
- SCATAGLINI, M. A., V. A. CONFALONIERI, & A. A. LANTERI 2000. Dispersal of the cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: evidence of the RAPD's analysis. *Genetica* **108**: 127-136.
- SEQUEIRA, A., A. A. LANTERI, M. A. SCATAGLINI, V. CONFALONIERI & B. FARRELL 2000. Are flightless *Galapaganus* weevils older than the Galápagos Islands they inhabit?. *Heredity* **85**: 20-29.
- SILVA, I. M. M. S., J. HONDA, F. VAN KAN, J. HU, L. NETO, B. PINTUREAU 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *Biol. Contr.* **16**: 177-184.
- SOLTIS, D. E., P. S. SOLTIS & I. J. DOYLE 1998. *Molecular systematics of plants II, DNA sequencing.* Kluwer Academic Publishers Boston, Dordrecht, London.
- SPELLERBERG, I. F. 1991. Biogeographical basis of conservation. *In: SPELLERBERG, I. F., F. B. GOLDSMITH & M. G. MORRIS (eds.) The scientific management of temperate communities for conservation.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, págs. 293-322.
- STORFER, A. 1996. Quantitative genetics: a promising approach for the assessment of genetic variation in endangered species. *TREE* **11**: 343-348.
- TABERNER, A., J. DOPAZO & P. CASTANERA 1997. Genetic characterization of populations of a new arisen sugar beet pest, *Aubeonymus mariaefranciscae* (Coleoptera, Curculionidae), by RAPD analysis. *J. Mol. Evol.* **45**(1): 24-31.
- TEMPLETON, A. R., K. SHAW, E. ROUTMAN & S. K. DAVIS 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **77**: 13-27.
- THOMAS, C. D. 1994. Extinction, colonization and metapopulations: environmental tracking by rare species. *Cons. Biol.* **8**: 373-378.
- THOMAS, C. D. & I. HANSKI 1997. Butterfly metapopulations. *In: HANSKI, I. & M. GILPIN (eds.) Metapopulation dynamics: ecology, genetics, and evolution.* Academic Press, New York, págs. 359-386.
- THORPE, J. P. 1982. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **13**: 139-168.
- TREGENZA, T. & R. K. BUTLIN 1999. Genetic diversity: do marker genes tell us the whole story?. *In: MAGURRAN, A. E. & R. M. MAY (eds.) Evolution of biological diversity.* Oxford University Press Inc., New York, págs. 37-55.
- VANE-WRIGHT, R. I., C. J. HUMPHRIES & P. H. WILLIAMS 1991. What to protect?- Systematics and the agony of choice. *Biol. Cons.* **55**: 235-254.
- VANLERBERGHE-MASUTTI, F. 1994. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. *Insect Molec. Biol.* **3**(4): 229-237.
- VERDYCK, P., K. DESENDER & H. DHUYVETTER 2000. Genetic patterns in phytophagous beetles of the Galápagos archipelago. *XXI Int. Congr. Entomol., Brasil. Abstract*, Book I: 588.
- VOGLER, A. P. & R. DESALLE 1994. Diagnosing units of conservation management. *Cons. Biol.* **8**: 354-363.
- WEIR, B. S. & C. C. COCKERHAM 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- WELSH, J. & M. MCCLELLAND 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* **18**: 7213-7218.
- WHEELER, Q.D. & R. MEIER 2000. *Species concepts and phylogenetic theory. A debate.* Columbia Univ. Press, New York.
- WILCOX, B. A. & D. D. MURPHY 1985. Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. *Am. Nat.* **125**: 879-887.

- WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI & S. V. TINGEY 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6531-6535.
- WILLIAMS, P. H., K. J. GASTON & C. J. HUMPHRIES 1994. Do conservationists and molecular biologists value differences between organisms in the same way? *Biodiversity letters* **2**: 67-78.
- WILSON, E. O. & E. O. WILLIS 1975. Applied biogeography. In: CODY, M. L. & J. M. DIAMOND (eds.). *Ecology and evolution of communities*. Belknap Press, Harvard University, Cambridge, MA, págs. 523-534.
- WRIGHT, S. 1977. *Evolution and the genetics of populations: Volume 3, Experimental results and evolutionary deductions*. University of Chicago Press, Chicago.
- YOUNG, A., T. BOYLE & T. BROWN 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *TREE* **11**: 413-418.