

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**CAUSAS DEL AISLAMIENTO REPRODUCTIVO EN DOS ESPECIES DE *MACROHALTICA*
(COLEOPTERA, CHRYSOMELIDAE)**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología

RODOLFO ACHOY MORA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica
2015

DEDICATORIA

A Reinis, mi madre, y a mis hermanos
De manera especial a mi esposa Elsa Mayela y
a mis hijos, Daniela y Rodolfo

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer un reconocimiento especial al profesor William G. Eberhard, director de este trabajo, por su apoyo, orientación y estímulo constantes. A los profesores Ramiro Barrantes, Paul Hanson y Daniel Briceño, miembros del tribunal, por las sugerencias y el apoyo brindado. A los directores del Programa del Posgrado en Biología, Virginia Solís, Ramiro Barrantes y Jorge Azofeifa, por su apoyo, su paciencia y tolerancia durante todos estos años. A Jorge Gómez Laurito (q.d.D.g) por la identificación de las especies vegetales. A mis compañeros de estudio, por su apoyo y los momentos agradables que compartimos. Al personal docente y a Hannia Ramírez, secretaria del SEP de Biología. A Julio Arias, Federico Bolaños, Julián Monge, Mario Portilla, por su disposición y apoyo durante diferentes momentos de este estudio. A Mary Jane West Eberhard y Carolina Godoy por su apoyo, motivación y estímulo.

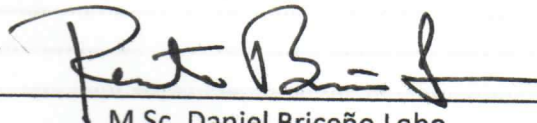
Agradezco de manera especial a la Vicerrectoría de Investigación y a la Escuela de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Estatal a Distancia, particularmente a Olman Díaz y a Luis Montero, directores de Escuela, y a Ligia Garro, Encargada de Laboratorio, por el apoyo y estímulo que me brindaron en mi condición de funcionario de esta Benemérita Institución.

A mi querida familia por su apoyo y motivación durante tantos años.

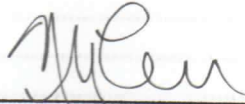
A todas las personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo.

Al Señor, Creador del Cosmos, por esta y otras tantas bendiciones... por todo.

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología"



M.Sc. Daniel Briceño Lobo
Representante de la Decana del SEP



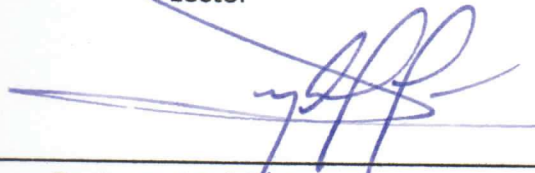
Dr. William G. Eberhard Cabtree
Director de Tesis



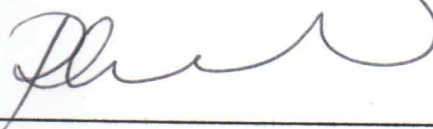
Dr. Ramiro Barrantes Mesén
Lector



Dr. Paul Hanson Snortum
Lector



Dr. Jorge Azofeifa Navas
Director del Programa de Posgrado en Biología



Rodolfo Achoy Mora
Candidato

Índice	Página
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	ii
Página de aprobación.....	iii
Lista de figuras.....	v
Prefacio.....	vi
Capítulo 1.....	1
Causas del aislamiento reproductivo en dos especies de <i>Macrohaltica</i> (Coleoptera, Chrysomelidae).....	2
Resumen y palabras clave.....	2
Introducción.....	3
Materiales y Métodos.....	6
Las poblaciones y su ubicación.....	6
Procedimiento general.....	6
Cruces controlados.....	7
Comportamiento reproductivo.....	8
Resultados.....	9
Discusión.....	14
Referencias.....	17

Lista de figuras

- Fig.1. Progenie de hembras de *M. jamaicensis* después de copular con *M. jamaicensis* (primer macho) y luego con *M. crypta* (segundo macho).....11
- Fig.2. Progenie de hembras de *M. jamaicensis* después de copular con *M. crypta*, como segundo macho12
- Fig.3. Tiempo de expulsión del espermatozoido , en minutos, al finalizar la cópula con macho *M. jamaicensis* y con macho *M. crypta*13

Prefacio

Una de las principales implicaciones que tiene el concepto biológico de especie (CBE) es que al definir a la especie como un grupo reproductivamente aislado, supone la interrupción del flujo génico con otros grupos (Turelli et al., 2001; Agapow et al., 2004; Harrison, 2014). Con frecuencia se señalan, como debilidades de este criterio biológico, su poca aplicabilidad a organismos de reproducción asexual y la presencia de híbridos en poblaciones naturales (Agapow et al., 2004). Sin embargo, la hibridación puede estar restringida a una zona geográfica delimitada por un gradiente ecológico, y los híbridos, no necesariamente constituyen el flujo genético entre los linajes, particularmente si son inviábiles o infértiles (Buerkle, 2014). Así, los casos en los que el aislamiento reproductivo es parcial, podrían constituir una evidencia de que la formación de especies es un proceso gradual de evolución de barreras intrínsecas al intercambio genético (Futuyma, 1979). El CBE no es de aplicación universal. Sin embargo, a pesar de que persiste en la actualidad, un debate sobre el concepto de especie (de Queiroz, 2005; Harrison, 2014), de que se cuestiona la operatividad del CBE (Agapow et al., 2004), y de que se han propuesto criterios de definición alternativos (Coyne, 1994; de Queiroz, 2005; Harrison, 2014), el CBE es aún de amplia aceptación y es considerado el criterio más útil para el estudio de la evolución de las especies (Coyne & Orr, 1998). De manera semejante, existe un consenso en categorizar a la especie como una unidad natural, más que como un criterio arbitrario y subjetivo (Coyne & Orr, 1998).

En este contexto, el aislamiento reproductivo constituye un factor que interrumpe el flujo de genes entre los linajes y favorece la evolución de las especies (Tyler et al., 2013 b; Buerkle, 2014). Los mecanismos del aislamiento reproductivo pueden actuar antes o después de la cópula. Los precopulatorios incluyen diferencias en ecología, comportamiento, época de reproducción, y el aislamiento sexual (Coyne & Orr, 1998; Harrison, 2014). Los poscopulatorios, pueden ser precigóticos, si tienen lugar después de la cópula pero antes de la fertilización, o poscigóticos, si actúan después de la fertilización (Matute & Coyne, 2010; Harrison, 2014). En este último caso, por ejemplo, tales mecanismos pueden producir la inviabilidad o esterilidad de los híbridos. Entre las causas que comúnmen-

te se asocian a la reducción en la producción de híbridos, están los reordenamientos cromosómicos, la variación en los niveles de ploidía y diferencias en alelos (Coyne & Orr, 1998). Los mecanismos poscopulatorios precigóticos han sido menos estudiados, probablemente debido a que su estudio y detección pueden ser más difíciles (Matute & Coyne, 2010). En este nivel, la acción de estos mecanismos es críptica, ocurre dentro del cuerpo de la hembra, durante y después de la cópula, por lo que los eventos subsiguientes del proceso reproductivo están en gran parte bajo la influencia de la hembra (Eberhard, 1996; 2009). Se ha identificado una serie de procesos controlados por la hembra en diferentes especies, que favorecen la fertilización de sus huevos por determinados machos (Eberhard, 1996; 2009). Estos mecanismos, incluyen entre otros, el control de la penetración, de la deposición óptima del espermatozoide, así como del transporte y el almacenamiento del mismo; además de la producción y la fertilización de los huevos (Eberhard, 1996; 2009).

En la actualidad, la investigación sobre especiación se centra en el estudio de barreras reproductivas poscopulatorias precigóticas (Howard, 1999; Matute & Coyne, 2010). Uno de los resultados relevantes en este campo, es la evidencia de que la selección puede favorecer algunos de estos mecanismos y originar barreras poscopulatorias entre grupos cercanos (Howard, 1999; Matute & Coyne, 2010; Tyler et al. 2013a). Particularmente, la precedencia de espermatozoide conespecífico, puede constituir una barrera reproductiva poscopulatoria precigótica que reduce el flujo génico entre distintas poblaciones o especies (Price et al., 2000; Tyler et al., 2013a). Este mecanismo se manifiesta cuando una hembra inseminada por dos machos, uno conespecífico y otro heteroespecífico, utiliza preferentemente el espermatozoide conespecífico para producir su progenie (Howard, 1999; Price et al. 2000). Este mecanismo se ha documentado en diversas plantas y animales (Howard, 1999). Estos hallazgos, frecuentemente producto de experimentos o ensayos de competencia gamética, denotan una variedad de manifestaciones de la precedencia de espermatozoide conespecífico. Si bien el conocimiento sobre este tipo de barrera reproductiva es incipiente y, por ello, incompleto, los casos documentados sugieren que los mecanismos que intervienen pueden ser muy variados (Howard, 1999). Así, la hembra puede poner al macho heteroespecífico en desventaja por varios mecanismos. Puede que transfiera poca

cantidad de esperma heteroespecífico durante la copulación, o bien que su esperma sea menos viable o no se almacene bien en el tracto reproductivo de la hembra, o bien que haya una falta de reconocimiento de esperma heteroespecífico-huevo (Price et al., 2000; 2001).

Drosophila es un género históricamente utilizado en estudios genéticos. Particularmente, es un grupo ideal para estudios sobre aislamiento reproductivo (Price, 1997, Price et al., 2000, Price et al., 2001; Dixon et al., 2003). Muchas especies tienen marcadores mutantes, lo que facilita el seguimiento del esperma dentro de la hembra. Además, es factible el uso de técnicas para producir machos carentes de esperma o de otros componentes del fluido seminal (Price, 1997). En el complejo de especies *Drosophila simulans* se han logrado determinar tres barreras crípticas a la fertilización heteroespecífica (Price et al., 2001). Cuando hembras *D. simulans* copulan con machos *D. sechellia*, se transfieren pocos espermatozoides aún durante cópulas prolongadas. Por otra parte, las cópulas de las hembras *D. simulans* con machos *D. mauritiana*, con frecuencia, son muy cortas y no hay transferencia de esperma. En las que son suficientemente prolongadas para transferir esperma, solamente una pequeña fracción de este esperma heteroespecífico es almacenado por las hembras y, además, se reduce la cantidad de huevos depositados. De manera semejante, cuando hembras *D. mauritiana* copulan con machos *D. simulans*, se transfiere y almacena esperma en abundancia, pero este se pierde rápidamente del tracto reproductivo de la hembra. En cruces en los que hembras *D. simulans* copulan tanto con machos *D. simulans* como con machos *D. mauritiana*, la gran mayoría de la progenie corresponde al macho conespecífico, independiente del orden de los apareamientos (Price et al., 2000). Los mecanismos propuestos en este caso son el desplazamiento del esperma heteroespecífico por el líquido seminal del macho conespecífico, cuando este copula de segundo, y la incapacitación del esperma heteroespecífico por el líquido seminal del macho conespecífico, cuando este ha tenido la primera cópula (Price et al., 2000). Por su parte, Dixon et al. (2003) encuentran evidencia de una débil precedencia de esperma conespecífica entre dos subespecies de *D. pseudoobscura*, pero ausencia de este tipo de barrera reproductiva entre razas de *D. melanogaster*, concluyendo que en estos grupos el aisla-

miento se produce por discriminación de apareamiento y por esterilidad híbrida. Las especies de grillos *Allonemobius fasciatus* y *A. socius* constituyen un interesante caso de interacción interespecífica. En poblaciones mixtas, los individuos puros predominan y los híbridos son muy raros (Gregory & Howard ,1994; Howard et al., 2002). Entre estas especies, el aislamiento precopulatorio es muy reducido. Aunque existe variación específica en el canto, las hembras no lo discriminan, y en experimentos de escogencia de pareja, tanto los machos como las hembras muestran poca tendencia a aparearse con individuos de su propia especie (Gregory & Howard ,1994). De igual forma, las barreras poscigóticas entre estos grupos no son fuertes, lo que se demuestra por la viabilidad y fertilidad de los híbridos obtenidos en cruces interespecíficos. Estudios basados en experimentos de competencia espermática demostraron la existencia de precedencia de espermatozoos conespecíficos. Cuando hembras de estas especies se cruzan con dos machos, uno macho heteroespecífico y uno conespecífico, la mayoría de la progenie es engendrada por el macho conespecífico, independiente del orden de los cruces (Gregory & Howard ,1994). De este modo, parece que este es el mecanismo más fuerte de aislamiento reproductivo identificado entre estas especies (Howard et al., 1998). Nakano (1985, citado por Howard ,1999) estudió las especies simpátricas de las mariquitas *Epilachna vigintioctomaculata* y *E. pustulosa*. Estos son insectos fitófagos que habitan plantas huéspedes distintas en el norte de Japón, pero con frecuencia se observan formando parejas heteroespecíficas en el campo. Sin embargo, este tipo de cruces produce huevos con muy poca viabilidad y presentan una tasa de eclosión muy reducida. Contrariamente, cuando la hembra ha copulado tanto con un macho conespecífico como con uno heteroespecífico, la tasa de eclosión de huevos aumenta a niveles comparables a los de hembras que copularon con dos machos de su propia especie. Este hallazgo, probablemente, representa un caso de precedencia de espermatozoos conespecíficos, el cual reduce el impacto negativo de un cruce heteroespecífico (Howard ,1999). Por otra parte, en invertebrados marinos es frecuente que los eventos reproductivos se produzcan sin mediar interacción física directa o de comportamiento entre machos y hembras, limitándose a una interacción a nivel de la superficie de los gametos que están mezclados en el agua (Galindo et al., 2003). Entre este tipo de orga-

nismos, se ha establecido claramente que esta interacción está mediada por moléculas de proteínas que participan activamente en la identificación y la unión con el huevo. En erizos de mar, por ejemplo, la proteína del espermatozoide responsable es la bindina. Modificaciones de esta molécula pueden alterar la interacción espermatozoide-huevo (Howard, 1999). Recientemente, se ha demostrado precedencia de espermatozoide conespecífico en erizos de mar del género *Echinometra*. Las especies *E. oblonga* y *Echinometra* sp. son muy cercanas y son interfértiles en el laboratorio; no se han observado híbridos naturales. Geyer & Palumbi (2005) evaluaron mediante ensayos de fertilización competitiva la posibilidad de precedencia de espermatozoide conespecífico, y demostraron que los huevos de ambas especies tienen una marcada preferencia por el espermatozoide conespecífico cuando está mezclado con el heteroespecífico. Con frecuencia, aun cuando se documenta la existencia de la precedencia de espermatozoide conespecífico, no es posible concluir que su establecimiento ocurrió antes de que el proceso de especiación se completara. En otros estudios, la evidencia indica que la formación de las especies no ha sido determinada por la precedencia de espermatozoide conespecífico (Dixon et al., 2003). Por otra parte, en la mayoría de los casos, los mecanismos que la originan son desconocidos, o bien, su comprensión se encuentra en etapas iniciales (Howard, 1999).

Las especies de los crisomélidos del género *Macrohaltica jamaicensis*, y *M. crypta* ofrecen una oportunidad para identificar posibles mecanismos que mantienen a sus poblaciones aisladas reproductivamente. Estas especies cohabitan en Costa Rica en algunas de sus plantas hospedadoras. En el campo se observan con frecuencia apareamientos interespecíficos, y en cautiverio producen híbridos viables y fértiles (Eberhard et al., 1993). En el presente estudio, se presentan los resultados de experimentos diseñados para identificar posibles mecanismos que pueden favorecer el aislamiento reproductivo entre las dos especies.

Referencias

- Agapow, P.M., Bininda-Emonds, O.R.P., Crandall, K. A., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Marshall, J.C., & Purvis, A. (2004). The impact of species concept on biodiversity studies. *Quar. Rev.Biol.*, 79, 161-179.
- Buerkle, C.A. (2014). Gene flow, hybridization and speciation. En: J.B. Losos, D.A. Baum, D.J. Futuyma, H.E. Hoekstra, R.E. Lenski, A.J. Moore, C.L. Peichel, D. Schluter, M.J. Withlock (Eds), *The Princeton guide to evolution*.(pp. 529-534). Princeton University Press.
- Coyne, J.A. (1994). Ernst Mayr and the origin of species. *Evolution*, 48:, 9-30.
- Coyne, J.A. & Orr, H.A. (1998). The evolutionary genetics of speciation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 353, 287-305.
- de Queiroz, K. (2005). Ernst Mayr and the modern concept of species. *PNAS*,102, *Suppl.1*, 6600-6607.
- Dixon, S.M., Coyne, J.A., & Noor, M.A.F. (2003). The evolution of conspecific sperm precedence in *Drosophila*. *Molecular Biology*, 12, 1179-1184.
- Eberhard, W.G. (1996). *Female control: Sexual selection by cryptic female choice*. Princeton Univ Press, Princeton.
- Eberhard, W.G.(2009). Postcopulatory sexual selection: Darwin's omission and its consequences. *PNAS*,, 106, *Suppl. 1*,10025-32.
- Eberhard, W.G., Achoy, R., Marín, M.C., & Ugalde, J. (1993). Natural history and behaviour of two species of *Macrohaltica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Psyche*, 100, 93-119.
- Futuyma, D.J. (1979). *Evolutionary biology*. Sianuer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Galindo, B.E., Vacquier, V.D., & Swanson, W.J. (2003). Positive selection in the egg receptor for abalone sperm lysin. *PNAS*, 100, 4639-4643.
- Geyer, L.B. & Palumbi, S.R. (2005). Conspecific sperm precedence in two species of tropical sea urchins. *Evolution*, 59, 97-105.
- Gregory, P.G. & Howard, D.J. (1994). A postinsemination barrier to fertilization isolates two closely related ground crickets. *Evolution*, 48, 705-710.

- Harrison, R.G. (2014). Species and speciation. En: J.B. Losos, D.A. Baum, D.J. Futuyma, H.E. Hoekstra, R.E. Lenski, A.J. Moore, C.L. Peichel, D. Schluter, M.J. Withlock (Eds), *The Princeton guide to evolution*.(pp. 489-495). Princeton University Press.
- Howard, D.J. (1999). Conspecific sperm and pollen precedence and speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *30*, 109-32.
- Howard, D.J., Gregory, P.G., Chu, J., & Cain, M.L. (1998). Conspecific sperm precedence is an effective barrier to hybridization between closely related species. *Evolution*, *52*,511-516.
- Howard, D.J., Marshall, J.L., Hampton, D.D., Brith, S.C., Draney, M.L., Chu, J., & Cantrell, R. G. (2002). The genetics of reproductive isolation: a retrospective and prospective look with comments on ground crickets. *Am. Nat. (Suppl)*. *159*,S8-S21.
- Matute, D.R. & Coyne, J.A. (2010). Intrinsic reproductive isolation between two sister species of *Drosophila*. *Evolution*, *64*,903-920.
- Price, C.S.C. (1997). Conspecific sperm precedence in *Drosophila*. *Nature*, *388*,663-666.
- Price, C.S.C., Kim, C.H., Posluszny, J., & Coyne, J.A. (2000). Mechanisms of conspecific sperm precedence in *Drosophila*. *Evolution*, *54*,2028-2037
- Price, C.S.C., Kim, C. H., Gronlund, C.J., & Coyne, J.A. (2001). Cryptic reproductive isolation in the *Drosophila simulans* species complex. *Evolution*, *55*,81-92.
- Turelli, M., Barton, N.H., & Coyne, J.A. (2001). Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, *16*, 330-343.
- Tyler, F., Harrison, X.A., Bretman, A., Veen, T., Rodríguez-Muñoz, R., & Tregenza, T. (2013a). Multiple post-mating barriers to hybridization in field crickets. *Molecular Biology*, *22*, 1640-1649.
- Tyler, F., Rodríguez-Muñoz, R., & Tregenza, T. (2013b). Fertilisation and early developmental barriers to hybridization in field crickets. *BMC Evolutionary Biology*, *13*, 43.

Capítulo I

En formato de artículo científico para ser sometido a la Revista de Biología Tropical

**Causas del aislamiento reproductivo en dos especies de *Macrohaltica*
(Coleoptera, Chrysomelidae)**

Rodolfo Achoy

Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica y Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica; rachoy@gmail.com

Resumen

Los crisomélidos *Macrohaltica jamaicensis* y *M. crypta* tienen rangos altitudinales que se traslapan en Costa Rica. Estas especies comparten algunas de sus plantas hospederas. En poblaciones mixtas son frecuentes los apareamientos interespecíficos, pero hay una tendencia a los cruces conespecíficos. En el campo, los híbridos son raros; sin embargo, los cruces interespecíficos producen híbridos viables en cautiverio. En el presente estudio, se realizaron cruces para evaluar la existencia de mecanismos de aislamiento reproductivo entre estas especies. Se identificaron varios factores que pueden contribuir al aislamiento: menor disposición para montar la hembra en parejas heteroespecíficas, botada más pronta de espermatozoides heteroespecíficos y precedencia de espermatozoides homoespecíficos. Las hembras de *M. jamaicensis* que copularon con machos de las dos especies, independiente del orden de cópula, produjeron una progenie mayormente conespecífica. El patrón observado en la producción de híbridos podría ajustarse a un mecanismo dependiente de la cantidad de esperma o de diferencias cualitativas de los espermatozoides, que pondrían en ventaja a los conespecíficos. El desconocimiento de los rangos de estas especies antes de la alteración humana en el ambiente, dificulta discriminar si la evolución de las diferencias observadas es un producto incidental de divergencias en aislamiento o el resultado de la selección natural a favor del aislamiento, cuando estas poblaciones estaban en contacto.

Palabras clave: especiación, aislamiento reproductivo, precedencia de esperma conespecífica, *Macrohaltica*

Introducción

El establecimiento de barreras reproductivas constituye una etapa importante en el proceso de especiación, pues favorece la diferenciación genética entre grupos cercanos (Harrison, 2014). Así, la evolución de mecanismos que interrumpen el flujo génico, puede contribuir al origen y establecimiento de nuevas especies (Howard ,1999). Este enfoque, derivado del concepto biológico de especie, es la base del estudio del proceso de formación de las especies, mediante el análisis del aislamiento reproductivo (Coyne ,1992; Peterson et al., 2005;). Esta parece ser una de las razones por las que muchos biólogos evolucionistas lo han adoptado y han centrado la investigación sobre la especiación en el estudio de barreras reproductivas (Coyne & Orr ,1998; Howard ,1999; Schluter, 2014), para identificar características que influyen en el aislamiento reproductivo y para comprender el modo de acción de la selección natural. (Faria et al., 2014; Via ,2002). La selección natural puede favorecer indirecta o directamente el aislamiento reproductivo (Schluter, 2014). Este aislamiento puede evolucionar incidentalmente como consecuencia secundaria de la diferenciación genética entre poblaciones. Esta resulta de la acción de fuerzas selectivas divergentes sobre características fenotípicas que llevan a la adaptación a diferentes ambientes o nichos (Schluter, 2001; Rundle & Schluter, 2004; Schluter, 2009; Via, 2009; Barton, 2010). La selección también puede actuar directamente contra los híbridos, favoreciendo el aislamiento reproductivo entre poblaciones simpátricas y reduciendo el éxito reproductivo de cruces interespecíficos. (Schluter, 2001; Rundle & Schluter, 2004).

En este contexto, la precedencia de esperma conespecífico puede evolucionar como barrera poscopulatoria precigótica que reduce el flujo génico y la producción de híbridos entre especies cercanas (Howard, 1999; Geyer & Palumbi, 2005). Este es un mecanismo críptico, mediante el cual una hembra que ha copulado con machos de más de una especie, utiliza preferentemente esperma del macho conespecífico para producir la progenie. La precedencia de esperma conespecífica se ha documentado en varios organismos que incluyen, entre otros, a *Drosophila* (Price, 1997, Price et al. 1999, 2000, 2001), los grillos del género *Allonemobius* (Gregory & Howard ,1994; Howard et al. ,1998; Howard et al., 2002), los erizos de mar *Echinometra* (Geyer & Palumbi ,2005)

y los escarabajos de la harina *Tribolium* (Fricke & Arnqvist ,2004). Las investigaciones han demostrado que la precedencia de esperma conespecífica es un fenómeno frecuente, pero que no es universal (Howard, 1999). Los estudios con especies con potencial de hibridación amplían el conocimiento sobre la evolución de la precedencia de esperma conespecífico y su interacción con otras formas de aislamiento reproductivo (Dixon et al., 2003; Peterson et al., 2011).

Las especies de los crisomélidos del género *Macrohaltica*, *M. jamaicensis*, y *M. crypta* ofrecen una oportunidad para identificar posibles mecanismos que mantienen a sus poblaciones aisladas reproductivamente. Las dos especies cohabitan en Costa Rica, y ocupan un ámbito altitudinal traslapado; en el caso de *M. crypta* va de los 2300 m. en el Cerro de la Muerte a cerca de 1000 m en San Rafael de Escazú y *M. jamaicensis* se ha observado en Cartago, San Isidro de Heredia y San Antonio de Escazú, cercanos a 1400m (Eberhard et al., 1993; Santisteban, 2006). La historia evolutiva de estas especies de *Macrohaltica* es difícil de precisar. Debido a que se desarrollan en plantas de crecimiento secundario, las cuales habitan áreas muy alteradas por la actividad humana, no es posible establecer con certeza si evolucionaron en aislamiento y han entrado en contacto recientemente por la modificación de sus hábitats (Eberhard et al., 1993). *M. crypta* se localiza en *Gunnera insignis* y, ocasionalmente, en *Ludwigia* sp. (Onagraceae) y *M. jamaicensis* en varias especies de *Ludwigia* sp., pero está ausente en *G. insignis* (Eberhard et al., 1993). En esta planta, las larvas de esta especie no se desarrollan adecuadamente (Eberhard et al., 1993). En contraste, las larvas y adultos híbridos, así como los adultos de ambas especies, sobreviven en cualquiera de estas plantas (Eberhard et al., 1993). En *Ludwigia octovalvis* son comunes poblaciones con individuos de las dos especies, y se observan apareamientos tanto intra como interespecíficos (Eberhard et al., 1993). No se ha documentado la presencia de híbridos en estas poblaciones, pero estudios de laboratorio han demostrado que hembras de ambas especies producen progenie viable si son apareadas con machos heteroespecíficos (Eberhard et al., 1993). Las poblaciones de estos insectos suelen ser muy numerosas, a veces alcanzando varios cientos de adultos en una misma planta. Las hembras ponen los huevos sobre las hojas y las larvas se alimentan de las hojas de la misma planta. Al

final de tres estadios larvales, la larva madura se entierra en el suelo y se transforma en pupa, de la que emerge el adulto. El ciclo huevo - adulto requiere aproximadamente seis semanas (Eberhard et al., 1993). Algunas características morfológicas de los adultos diferencian a estas especies entre sí (Eberhard et al., 1993; Santiesteban, 2006). Las hembras de *M. crypta* presentan un ligero levantamiento o carina en sus élitros (Eberhard et al., 1993). El color de los adultos de *M. jamaicensis* es azul metálico, y *M. crypta* es púrpura metálico. El color del adulto es un carácter hereditario, con dominancia del púrpura (Eberhard et al., 1993). Así, este rasgo es útil para determinar la paternidad de la progenie, en cautiverio, cuando la hembra *M. jamaicensis* ha copulado con machos de ambas especies, pues los hijos del *M. crypta* heredan el color púrpura. Pero, en el campo es difícil distinguir a los híbridos de los *M. crypta*, con base en su coloración. No obstante, los genitales masculinos son distinguibles entre las dos especies (Eberhard et al., 1993) y también es posible usarlos para identificar si un macho es híbrido (W.G. Eberhard, comunicación personal).

El comportamiento copulatorio de estas especies ha sido estudiado en detalle (Eberhard & Kariko, 1996). El comportamiento durante la cópula es estereotipado y complejo. Una vez que el macho introduce sus genitales en la hembra, se produce una serie de movimientos de empuje, cada uno seguida por un interludio. En el interludio después de la primera serie de estos movimientos, se transfiere el esperma y material del espermátforo. En la bursa, este material rodea gradualmente la masa de esperma y, al endurecerse, se estructura el espermátforo, lo cual ocurre en la segunda serie de movimientos. El proceso de maduración de la cola y cabeza del espermátforo continúa durante el resto de la copulación. La salida del ducto del reservorio del esperma se adhiere a la entrada al ducto espermatecal, lo que permite la transferencia de los espermatozoides a la espermateca. En todos los casos, la hembra expulsa el espermátforo, lo cual puede ocurrir unos pocos minutos o horas después de finalizada la cópula. (Eberhard et al., 1993). En el presente estudio se presentan los resultados de experimentos de laboratorio diseñados con el fin de determinar la existencia de mecanismos de aislamiento reproductivo entre las especies de *Macrohaltica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las poblaciones y su ubicación: Los insectos fueron criados en cautiverio a partir de adultos y de larvas provenientes de poblaciones naturales. *M. jamaicensis* fue colectada en *Ludwigia octovalvis* en las cercanías de San Isidro de Heredia, Costa Rica, en las siguientes localizaciones: 10°00'60.0"N - 84°02'31.6"W, 10°00'59.9"N - 84°02'31.7"W y 10°01'04.6"N - 84°02'26.1"W. *M. crypta* fue colectada en *Gunnera insignis*, al lado de la autopista 32, San José –Guápiles, antes del Túnel Zurquí, Costa Rica, entre los 10°03'36.0"N - 84°00'29.2"W y los 10°03'03.8"N - 84°00'19.0"W. Si bien, como se describió en líneas anteriores, los híbridos F1 son de color púrpura y podrían confundirse en el campo con *M. crypta*, el hecho de que *M. jamaicensis* está completamente ausente en *G. insignis* y de que, en cautiverio, tiene un desarrollo muy pobre en esta planta (Eberhard et al., 1993), permite asumir que esta hospedera mantiene una población pura de *M. crypta*.

Procedimiento general: Se realizaron los experimentos en San Isidro de Heredia, a temperatura ambiente. Todos los insectos, tanto larvas como adultos, fueron alimentados con *Ludwigia octovalvis*. Estudios anteriores demostraron que las dos especies de abejones se desarrollan adecuadamente en cautiverio en esta planta (Eberhard et al., 1993). Las larvas se mantuvieron en frascos de vidrio con ramitas y tallos de la planta, y cuando alcanzaron la madurez (aproximadamente a los 21 días de eclosionar del huevo) se trasladaron a recipientes de plástico con tierra húmeda donde se enterraron para pupar. Una vez que los adultos emergieron, se identificaron por camada y el cruce del que provenían, y se separaron por sexo y por el color de sus élitros. El color fue usado como criterio para determinar su origen paterno, pues la progenie conoespecífica porta el color azul y los híbridos, el púrpura (Eberhard et al., 1993). Los adultos así separados se mantuvieron en frascos con alimento durante al menos 10-12 días, con el fin de que alcanzaran un grado adecuado de madurez y de que algunas estructuras, como los genitales de los machos, se endurecieran para posteriores estudios. Cada pareja para los experimentos de cruces controlados, se mantuvo con hojas y tallos de *Ludwigia octovalvis* en una caja de petri plástica de 100x15 mm, hasta que completara

el tiempo o el número programado de cópulas. Posteriormente, la hembra fue aislada en un frasco de vidrio, donde se le colectó los huevos que puso el resto de su vida. Los huevos se contaron diariamente y se trasladaron en las hojas o pedazos de tallo en los que usualmente las hembras ovopositaron, a cajas de petri o frascos de vidrio con papel de filtro, donde se mantuvieron hasta su eclosión. Cada 1 o 2 días se observaron estos recipientes para mantenerlos libres de contaminación (con frecuencia las hembras depositan heces sobre las masas de huevos, lo que favorece la propagación de hongos) y se humedeció el papel de filtro con un gotero, si estaba seco. En algunos casos, las hembras pusieron los huevos en el fondo o en las paredes de recipiente, lo que impidió su traslado al recipiente para eclosión. Durante todas las fases de este estudio, los insectos se mantuvieron en recipientes ventilados. Finalizado el estudio, los insectos, así como los espermátóforos se conservaron en alcohol de 70 %, debidamente rotulados.

Cruces controlados: Se cruzaron hembras vírgenes *M. jamaicensis*, de 8 a 10 días de emergidas, con dos machos en una de las siguientes combinaciones: primero con un macho *M. jamaicensis*, y después uno *M. crypta*, o bien, primero con uno *M. crypta* y luego uno *M. jamaicensis*. Los dos tipos de cruces se realizaron en forma simultánea en grupos de 5 o 6 parejas por tipo de cruce, cada 5 -7 días. Después de cada cópula o de las cópulas programadas, según se explica más adelante, se retiró el macho. Para cada tipo de cruce se realizaron dos ensayos. En uno, la hembra copuló 4 veces con el primer macho y después una sola vez con el segundo. Si alguna hembra no copuló durante un periodo de observación de tres horas, fue separada del macho, para completar el número de cópulas al día siguiente con un macho de la misma especie. En el otro tipo de ensayo, cada hembra permaneció junto al primer macho hasta la primera eclosión de huevos. De esta forma, las parejas conespecíficas permanecieron juntas entre 7 y 18 días y las heteroespecíficas entre 9 y 22 días, con lo cual se procuró el llenado de la espermateca con el espermatozoos del primer macho, según correspondiera. Una vez retirado el primer macho, la hembra copuló una única vez si el segundo macho era de *M. jamaicensis*. Si el segundo macho era *M. crypta*, él permaneció con la hembra de 6 a 7 días. Se garantizó así un incremento de las cópulas heteroespecíficas

en este tipo de ensayo porque los primeros resultados mostraron que una sola cópula heteroespecífica podría no proveer de una cantidad suficiente de estos espermatozoides que permitiera evaluar alguna posible forma de competencia espermática. Dado que siempre, tarde o temprano después de la cópula, las hembras expulsan el espermátforo en el cual el esperma es transferido, es posible determinar las veces que una hembra ha sido inseminada en cautiverio, contando los espermátforos expulsados (Eberhard et al., 1993). También se ha observado que en estas especies algunas cópulas terminan antes de la eyaculación (Eberhard & Kariko, 1996). En el presente estudio se consideró que una cópula ocurrió únicamente cuando se comprobó la expulsión del espermátforo por observación directa o por la presencia del mismo en la caja de petri. De igual forma, el apareamiento con el segundo macho se produjo hasta que, retirado el primero, la hembra ovopositara, con lo cual se aseguró que la vagina estaba libre de espermátforos.

Comportamiento reproductivo: Se realizaron observaciones del comportamiento de parejas conespecíficas y heteroespecíficas. Cada pareja se mantuvo en una caja de petri. Una vez copularon, se retiró el macho. Si al cabo de tres horas no habían iniciado la cópula fueron separados. Se anotaron los siguientes aspectos: el tiempo que tardó el macho en subirse sobre la hembra, la demora hasta que se produjo la cópula, la duración de esta y el tiempo de expulsión del espermátforo. Para esto último se revisó la caja de petri a los 5, 20 y 120 minutos, después de finalizada la cópula. Si a los 120 minutos no se había expulsado el espermátforo, se revisó al día siguiente y se registró el dato, como más de 120 minutos,

Las proporciones de engendrados por los dos machos se determinaron de dos formas: la proporción simple, con base en el total de individuos producidos por el grupo de las hembras que produjeron crías en cada día o período, y la proporción promedio, que es el promedio de las proporciones por cada hembra que produjo crías en cada día o período. La primera, al basarse en la producción de todas las hembras, no es representativa de aquellas con muchos o muy pocos hijos. En la proporción promedio, se calcula con base en la producción de cada hembra, el efecto de unas pocas hembras con alta producción de hijos tiende a amortiguarse o reducirse. Sin embargo, es nece-

sario considerar que el promedio de las proporciones, en el segundo método, no refleja información sobre el número de hijos. Así, por ejemplo, una proporción es =1, tanto si la hembra produjo solo 1 hijo o 200, lo que también podría provocar una distorsión. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Statistica 6.

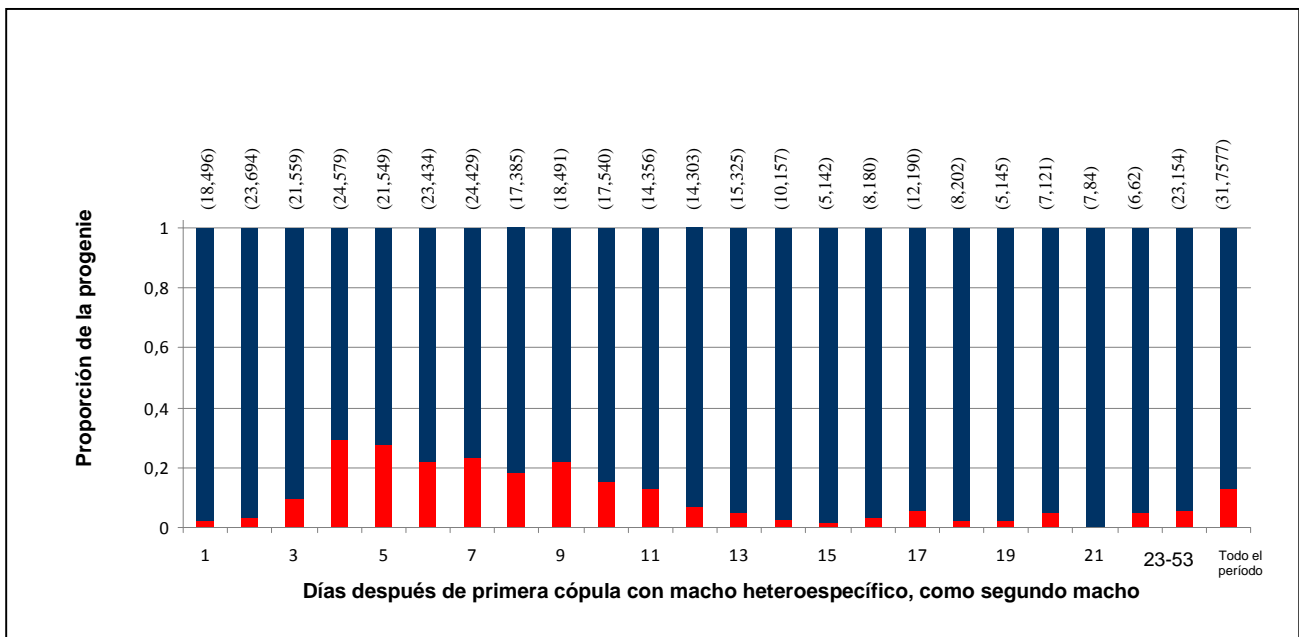
RESULTADOS

La paternidad de la progenie producida por las hembras *M. jamaicensis* inseminadas por machos de las dos especies, *M. jamaicensis* y *M. crypta*, fue atribuible en su mayor parte al macho conespecífico, independientemente de que este fuera el primero o el segundo en copular.

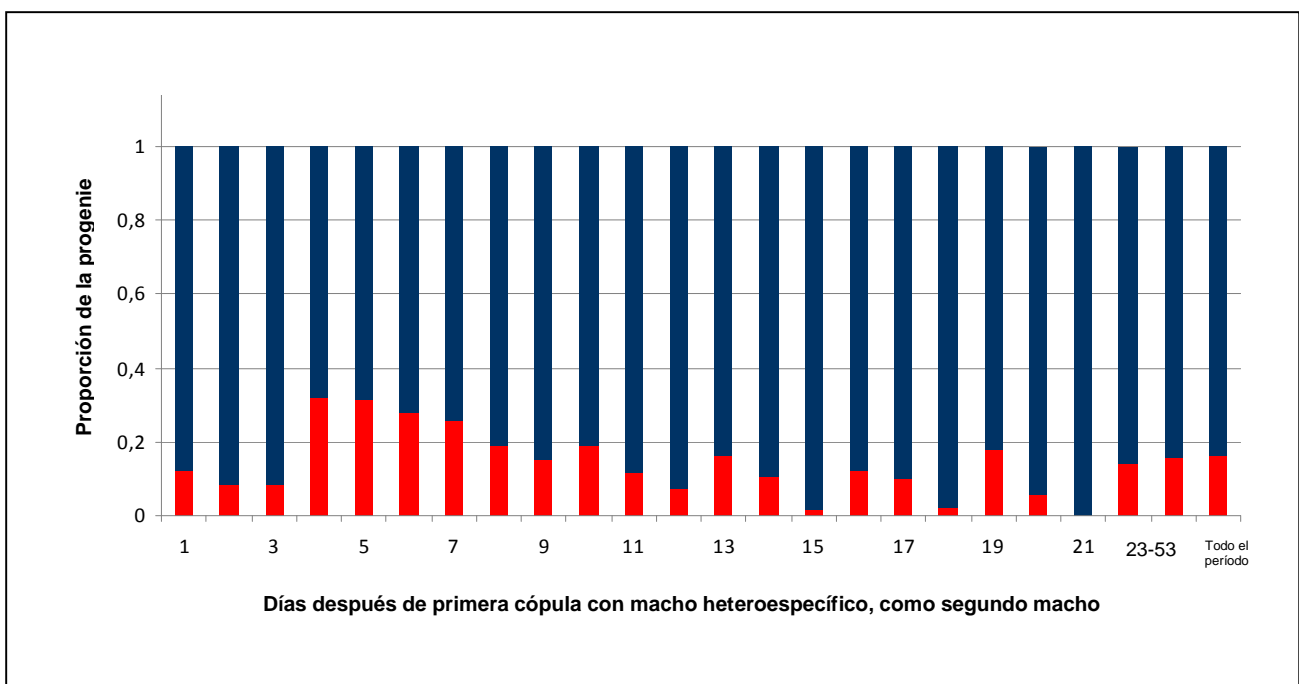
Cruces cuando el macho conespecífico es el primero en copular: La producción de híbridos estuvo relacionada con el número de cópulas heteroespecíficas. Cuando las hembras *M. jamaicensis* (N=15) copularon 4 veces con un macho conespecífico y después 1 sola vez con uno *M. crypta*, toda la progenie (865 adultos) obtenida durante los 10 días posteriores a esta cópula fue conespecífica. Sin embargo, en los experimentos en que cada hembra *M. jamaicensis* (N=31) se mantuvo con un macho conespecífico hasta la primera eclosión de huevos y luego permaneció junto a uno *M. crypta*, la progenie híbrida fue de 0.13 de la totalidad obtenida (N=7577 adultos) contabilizada desde el primer día del periodo de cópulas heteroespecíficas. (fig.1). Durante los primeros 5 días de ese periodo con el macho heteroespecífico, la proporción simple de híbridos aumentó significativamente (Kruskal-Wallis, $H(4, N=107)=13,5109$, $p=0.009$; $r=0.3395$, $p=0,0003$, con proporciones simples de híbridos fuertemente significativas más altas en los días 4 y 5 con respecto a los tres primeros (U Mann-Whitney =872.500, $p = 0.0009$, en la proporción simple; pero la diferencia en proporciones promedios era apenas significativa (U Mann-Whitney =284.000, $p = 0.05$); en esos dos días las proporciones híbridas fueron las más altas de todo el periodo, cercanas a 0.30 (fig.1). A partir de los días 6 y 7, la progenie híbrida empezó a disminuir, lo cual coincidió con el periodo en que la mayor parte de los machos heteroespecíficos (70 % de los 31) fueron retirados de las hembras. Durante todo el periodo posterior al retiro de los machos heteroespecíficos (Fig 2), la variación en la proporción simple de híbridos fue

ligeramente significativa (Kruskal-Wallis $H(29, N=213)=43,01, p=0,045; r=-0,1505, p=0,028$). La proporción simple de híbridos no varió en el periodo en que las hembras permanecieron con el macho *M. crypta* con respecto a después de su retiro (U Mann-Whitney $=13446,00, p = 0.60$).

Cruces cuando el macho conespecífico es el segundo en copular: Cuando las hembras (N= 24) primero copularon 4 veces con un macho *M. crypta* y luego una sola vez con uno de su especie, la progenie híbrida fue 0.12 de la totalidad producida (851 adultos) durante los 8 días siguientes a la cópula conespecífica. Durante ese periodo no hubo variación significativa en la proporción de los híbridos (Kruskal-Wallis $H(7, N=67)=10.863, p=0,14$). En los experimentos en los que las hembras (N=25) se mantuvieron primero con un macho *M. crypta* hasta la primera eclosión de huevos y luego copularon 1 sola vez con su conespecífico, solo 15 de las hembras produjeron hijos después de esta cópula. Las restantes pusieron huevos normalmente pero no eclosionaron. A todas se les dio seguimiento durante 20-30 días después de la última eclosión de huevos, o de la cópula conespecífica, en el caso de aquellas que no tuvieron descendencia después de esa cópula. Durante ese periodo la proporción simple híbrida fue 0.20 de la progenie total (489 adultos); las hembras produjeron hijos solo durante los 7 primeros días posteriores a la cópula conespecífica, y esporádicamente en tres días posteriores. No hubo variaciones temporales importantes en la proporción simple de híbridos (Kruskal Wallis $H(6, N=73) ,2.5655, p=0,86$ en 7 primeros días; $H(9, N=76)=76, p=0,73$, todo el periodo).

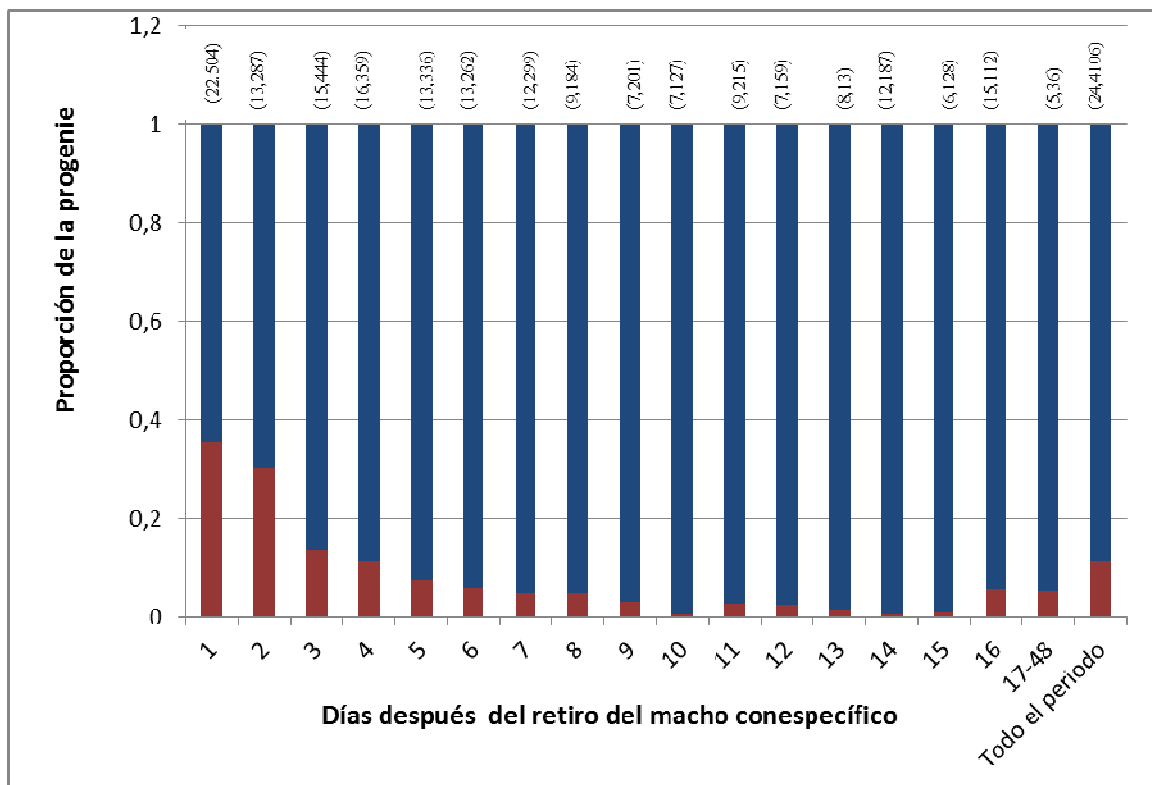


A.

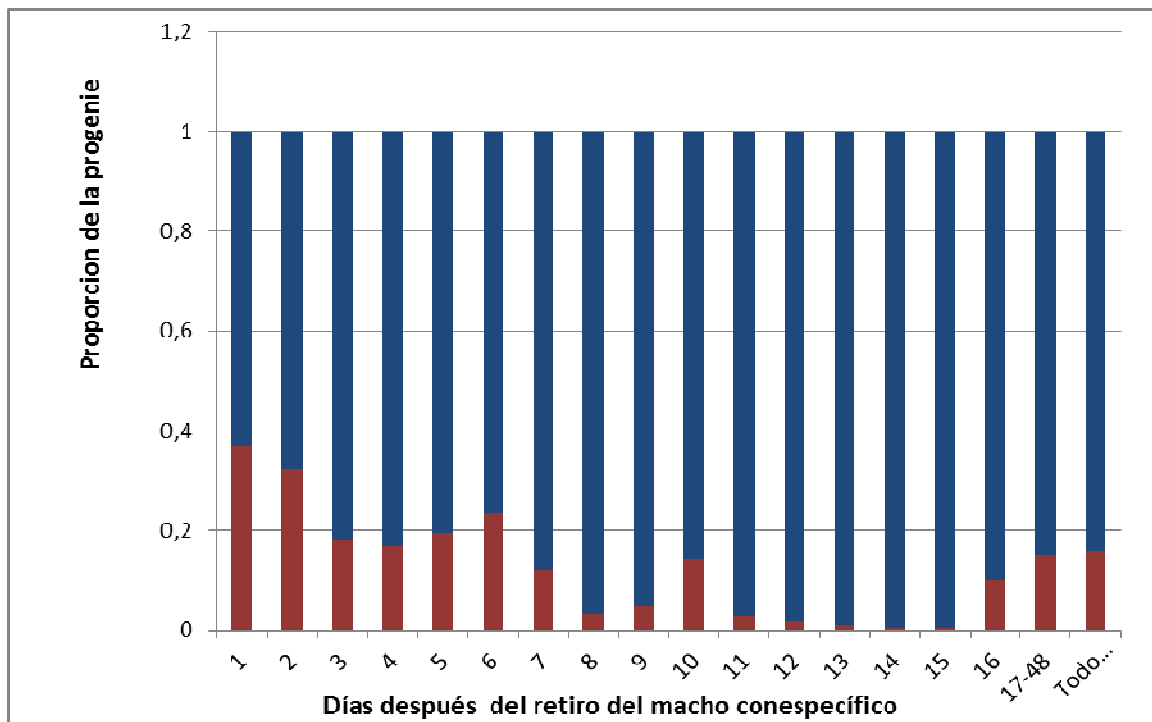


B.

Fig. 1. Progenie de hembras de *M. jamaicensis* después de copular con *M. jamaicensis* (primer macho) y luego con *M. crypta* (segundo macho). A. Proporción simple, con base en el total de individuos producidos por el grupo de las hembras que produjeron crías en cada día B. Proporción promedio que es el promedio de las proporciones por cada hembra que produjo crías en cada día. Los números sobre las barras en A. son los mismos que en B., e indican el tamaño de la muestra (Nº de hembras, total de la progenie) Híbrido ■ Conespecífico ■



A.



B.

Fig.2 Progenie de hembras *M. jamaicensis* después del retiro del macho *M. crypta*, como segundo macho. A. Proporción simple B. Proporción promedio. Los números sobre las barras indican el tamaño de la muestra (No. Hembras, total de la progenie) Híbrido ■ Conespecífico ■

Comportamiento reproductivo: Las parejas heteroespecíficas mostraron menos interacción entre sí que las conespecíficas. Un alto porcentaje de machos heteroespecíficos no montaron a las hembras. De 121 parejas heteroespecíficas observadas únicamente 52 machos *M. crypta* (43 %) montaron a las hembras, de las cuales copularon únicamente 17 (33 %). Los machos *M. jamaicensis* montaron a las hembras más rápidamente ($\bar{x}=13,47$ min \pm 14.52 DE; 0-69, N=64) que los *M. crypta* ($\bar{x}= 24,95$ min \pm 24,95 DE; 0 – 108, N= 41; U Mann –Whitney = 848,500; p=0,0023). Una vez el macho montó a la hembra, las parejas conespecíficas iniciaron la cópula más rápidamente ($\bar{x}= 7.57\pm 16,1$ min, N=40) que las heteroespecíficas ($\bar{x}= 21, 57\pm 29,2$, n =6), pero esta diferencia no fue significativa (U Mann-Whitney = 91, p= 0,34). La duración promedio de la cópula conespecífica ($\bar{x}=18,09\pm 3,1$ min, N=55) es semejante a la observada en otros estudios ($\bar{x}=18,3 \pm 3$ min; Eberhard & Kariko, 1996). La cópula con los machos *M. crypta* fue más prolongada ($\bar{x}= 23,0 \pm 3,12$ min, N=10; U Mann-Whitney =70,50000, p= 0,000208). Sin embargo, es semejante a la duración de la cópula con hembras de su propia especie (W.G.Eberhard, comunicación personal). La mayoría de las hembras de parejas heteroespecíficas expulsaron el espermatozoido durante los primeros 5 minutos después de finalizada la cópula, en tanto que en la mayor parte de las cópulas conespecíficas, las hembras expulsaron el espermatozoido transcurridos más de 120 minutos después de finalizada la cópula. (Fig. 3; $X^2=25,9$, g.l.=1, p=0.0000).

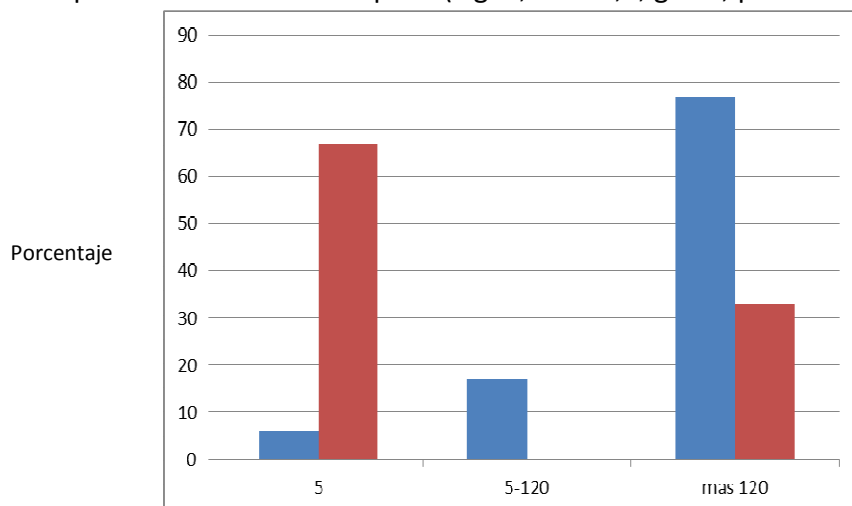


Fig.3 Tiempo de expulsión del espermatozoido, en minutos, al finalizar la cópula, con macho *M. jamaicensis* (N=53) y con macho *M. crypta* (N=12)

Tasa de ovoposición: Las tasas de ovoposición de las hembras *M. jamaicensis*, después de la primera cópula con el primer macho, o bien conespecífico ($\bar{x}=34,1\pm 12,1$ huevos/día, N= 34) o bien heteroespecífico ($\bar{x}=33,0\pm 10,8$ huevos-día, N= 26), no variaron significativamente (Mann-Whitney U Test U, Mann-Whitney U Test U= 423, p=0,78). El tamaño promedio de la camada de huevos después de la primera cópula con el segundo macho, fue un poquito mayor con el macho heteroespecífico ($\bar{x}= 36,3 \pm 11$ huevos, N=31) que con el conespecífico ($\bar{x}=30,2$ huevos $\pm 9,1$ N=26; Mann-Whitney U Test =268, p=0,031), pero esta significancia se pierde si la comparación se hace para todos los huevos a partir del retiro de los machos ($\bar{x}=28,8\pm 9,6$ N=26 conespecífico, $\bar{x}=33,3\pm 12,1$ heteroespecífico, Mann-Whitney U Test =291, p =0,07).

Discusión

Entre las dos especies de *Macrohaltica* estudiadas se identifican posibles mecanismos, tanto antes como después de la cópula, que podrían contribuir a mantener su aislamiento reproductivo y a perpetuarse como unidades naturales genéticamente diferenciadas (Coyne & Orr, 1998). Estos mecanismos, probablemente en forma aislada e independiente, no producen un aislamiento completo. Por ello, la selección puede haber favorecido el desarrollo de varios mecanismos diferentes que reducen el flujo genético.

La planta huésped es un factor insuficiente para producir un aislamiento completo entre estas especies. La ausencia de *M. jamaicensis* en *Gunnera insignis* y su incapacidad para desarrollarse en esta planta, en la cual *M. crypta* es muy exitosa (Eberhard et al., 1993), reduce las probabilidades de contacto interespecífico. Sin embargo, las dos especies de *Macrohaltica* comparten varias plantas hospederas, al menos en *Cuphea* y *Ludwigia*, (Eberhard et al., 1993). En poblaciones mixtas en estas plantas, el apareamiento en el campo fue sesgado a parejas homoespecíficas (Eberhard et al., 1993). Colectas en el campo sugirieron que los híbridos son raros (W.G. Eberhard, comunicación personal). No obstante, como se demuestra en este y en estudios anteriores, los cruces interespecíficos producen híbridos viables y fértiles en cautiverio. En otras especies del grupo, *Altica fragariae* y *A. viridicyanea*, la preferencia de la planta

hospedera se ha identificado como el factor principal en el establecimiento de una barrera del flujo genético, y cada una se ha especializado en una planta huésped distinta (Xue et al., 2009).

En el presente estudio se observaron varios otros mecanismos que pueden contribuir al aislamiento: menos disposición para montar la hembra en parejas heteroespecíficas, botada más pronta de los espermatozoides heteroespecíficos, y precedencia de espermatozoides conespecíficos.

La rápida expulsión del espermatozoides heteroespecífico por la hembra *M. jamaicensis* una vez terminada la cópula es un mecanismo que podría tener como consecuencia que menos espermatozoides sean transferidos al tracto reproductivo femenino. En otros estudios, se observó que, en esta especie, la mayoría de los espermatozoides, aún contenían esperma cuando fueron expulsados y solo menos del 10 % estaba completamente vacío en cruces conespecíficos (Eberhard & Kariko, 1996). También, fue observado en ese estudio que, con frecuencia, los espermatozoides que fueron expulsados rápidamente al concluir la cópula, presentaban malformaciones (Eberhard & Kariko, 1996). En el presente estudio, este aspecto no fue específicamente cuantificado. Estos hallazgos evidencian la necesidad de estudiar con detalle los factores que median en la expulsión temprana de los espermatozoides en estas especies. La habilidad de las hembras para discriminar entre los diferentes machos puede explicarse, en parte, en términos de las variaciones en la morfología de los genitales de los machos, ya sea por ajustarse más adecuadamente a los de la hembra o por estimularla para un proceso reproductivo más eficiente con sus espermatozoides (Eberhard, 1985).

Los resultados de los experimentos fueron consistentes en dos aspectos: al incrementarse el número de cópulas con *M. crypta*, la hembra *M. jamaicensis* usa más sus espermatozoides, y una vez que ha copulado con ambos machos, la mayor parte de la progenie es conespecífica. Este patrón en la producción de híbridos podría ajustarse a un mecanismo dependiente de la cantidad de esperma, observado en diversos estudios de hibridación en laboratorio (Gregory & Howard, 1994), o de diferencias cualitativas de los espermatozoides. En el primer caso, a mayor concentración de espermatozoides heteroespecíficos hay mayor producción híbrida. Estas son barreras en la ferti-

lización que pueden ser superadas con cópulas múltiples (Gregory & Howard, 1994). Este mecanismo podría explicar el patrón observado, en el cual al aumentar el número de cópulas heteroespecíficas se produjo un incremento de híbridos. Por otra parte, cabe la posibilidad de que diferencias cualitativas entre los espermatozoides de cada especie disminuyan el éxito de los heteroespecíficos. Una menor capacidad de adaptación al medio en el tracto femenino, podría afectar su motilidad, sobrevivencia y viabilidad. Aunque este estudio no abarcó el análisis de la acumulación de espermatozoides por la hembra, la producción de híbridos después de varios días del retiro del macho heteroespecífico sugiere que la hembra conserva algunos de sus espermatozoides. El patrón observado indica que utiliza espermatozoides de ambos machos, sin esperar a que se agoten los conoespecíficos para usar los otros. Es importante reconocer que el diseño de este estudio no permite eliminar la posibilidad de que la predominancia de la progenie conoespecífica se deba a que las larvas y pupas híbridas murieron más que los estadios inmaduros homoespecíficos. Por otra parte, dado que se carece de conocimiento sobre el rango de ambas especies antes de la modificación del ambiente por el ser humano (Eberhard et al., 1993), no es posible discriminar si las diferencias documentadas son productos incidentales de divergencias entre las dos especies que evolucionaron en aislamiento, o si una o varias son producto de la selección natural a favor del aislamiento y que evolucionaron cuando las poblaciones estaban en contacto.

Referencias

- Barton, N.H. (2010). What role does natural selection play in speciation? *Phil. Trans. R.Soc. B.*, 365, 1825-1840.
- Coyne, J.A. (1992). Genetics and speciation. *Nature*, 355, 511-515.
- Coyne, J.A. & Orr, H.A. (1998). The evolutionary genetics of speciation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 353, 287-305.
- Dixon, S.M., Coyne, J.A., & Noor, M.A.F. (2003). The evolution of conspecific sperm precedence in *Drosophila*. *Molecular Biology*, 12, 1179-1184.
- Eberhard, W.G. (1985). *Sexual selection and animal genitalia*. Harvard University Press, Cambridge. Mass.
- Eberhard, W.G., Achoy, R., Marín, M.C., & Ugalde, J. (1993). Natural history and behaviour of two species of *Macrohaltica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Psyche* 100, 93-119.
- Eberhard, W.G., & Kariko, S.J. (1996). Copulation behaviour inside and outside the beetle *Macrohaltica jamaicensis* (Coleoptera, Chrysomelidae). *J. Ethol.* 14, 59-72.
- Faria, R., Renaut, S., Galindo, J., Pinho, C., Emelo-Ferreira, J., Melo, M., Jones, F., Salzburger, W., Schluter, D., & Butlin, R. (2014). Advances in Ecological Speciation: an integrative approach. *Molecular Ecology*, 23, 513-521.
- Fricke, C. & Arnqvist, G. (2004). Divergence in replicated phylogenies: the evolution of partial post-mating prezygotic isolation in bean weevils. *J. Evol. Biol.*, 17, 1345-1354.
- Geyer, L.B. & Palumbi, S.R. (2005). Conspecific sperm precedence in two species of tropical sea urchins. *Evolution*, 59, 97-105.
- Gregory, P.G. & Howard, D.J. (1994). A postinsemination barrier to fertilization isolates two closely related ground crickets. *Evolution*, 48, 705-710.
- Harrison, R.G. (2014). Species and speciation. En: J.B. Losos, D.A. Baum, D.J. Futuyma, H.E. Hoekstra, R.E. Lenski, A.J. Moore, C.L. Peichel, D. Schluter, M.J. Withlock (Eds), *The Princeton guide to evolution*, (pp. 489-495). Princeton University Press.
- Howard, D.J. (1999). Conspecific sperm and pollen precedence and speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30, 109-32.

- Howard, D.J., Gregory, P.G., Chu, J., & Cain, M.L. (1998). Conspecific sperm precedence is an effective barrier to hybridization between closely related species. *Evolution*, *52*,511-516.
- Howard, D.J., Marshall, J.L., Hampton, D.D., Britch, S.C., Draney, M.L., Chu, J., & Cantrell, R. G. (2002). The genetics of reproductive isolation: a retrospective and prospective look with comments on ground crickets. *Am. Nat. (Suppl)*, *159*, S8-S21.
- Peterson, M.A., Honchak, B.M., Locke, S.E., Beeman, T.E., Mendoza, J., Green, J., Buckingham, K.J, White, M.A., & Monsen, K.J. (2005). Relative abundance and the species-specific reinforcement of male mating preference in the *Chrysochus* (Coleoptera: Chrysomelidae) hybrid zone. *Evolution*, *59*,2639-2655.
- Peterson, M.A., Larson, E.L., Brassil, M., Buckingham, K.J., Juárez, D., Deas, J., Mangloña, D., White, M.A., Maslan, J., Schweitzer, A., & Monsen, K.J. (2011). Cryptic gametic interactions confer both conspecific and heterospecific advantages in the *Chrysochus* (Coleoptera:Chrysomelidae) hybrid zone. *Genetica*, *139*, 663-676.
- Price, C.S.C. (1997). Conspecific sperm precedence in *Drosophila*. *Nature*, *388*,663-666.
- Price, C.S.C.,Dyer K.A. & Coyne J.A. (1999). Sperm competition between *Drosophila*-males involves both displacement and incapacitation. *Nature*, *400*, 449-452.
- Price, C.S.C., Kim, C.H., Posluszny, J. & Coyne, J. A. (2000). Mechanisms of conspecific sperm precedence in *Drosophila*. *Evolution*, *54* (6), 2028-2037.
- Price, C.S.C., Kim, C. H., Gronlund, C.J., & Coyne, J.A. (2001). Cryptic reproductive isolation in the *Drosophila simulans* species complex. *Evolution*, *55*, 81-92.
- Rundle, H.D. & Schluter, D. (2004). Natural Selection and Ecological Speciation in Sticklebacks. En U. Dieckmann, M. Doebeli, J.A.J Metz & D. Tautz (Eds), *Adaptive Speciation* (pp. 192–209). Cambridge University Press.
- Santisteban, J. (2006).Taxonomic revision of the genus *Macrohaltica* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae, Alticinae). *Rev. peru. Entomol.*, *45*,27-64
- Schluter, D. (2001). Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution*. *16*(7), 372-380.

- Schluter, D.(2009). Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science*, 323, 737-740.
- Schluter, D. (2014). Speciation and macroevolution. En: J.B. Losos, D.A. Baum, D.J. Futuyma, H.E. Hoekstra, R.E. Lenski, A.J. Moore, C.L. Peichel, D. Schluter, M.J. Withlock (Eds), *The Princeton guide to evolution*, (pp. 483-487) Princeton University Press.
- Via, S. (2002). The ecological genetics of speciation. *Am. Nat. (Suppl)*. 159, S1-S7.
- Via, S. (2009). Natural selection in action during speciation. *PNAS*, 106, 9939-9946.
- Xue, H.J., Magalhaest, S., Li, W.Z., & Yang, X.K. (2009). Reproductive barriers between two sympatric beetle species specialized on different host plants. *J. Evol. Biol.*, 22, 2258-2266.