

Filogeografía, factores históricos y especificidad parásito-hospedador: estudio comparativo de las comunidades de insectos depredadores de bellotas (*Curculio* spp.) en la península ibérica y California

R. Bonal^{1,4,*}, A. Muñoz², J.M. Aparicio³, M. Santoro³, J. M. Espelta⁴

- (1) Grupo de Investigación Forestal, INDEHESA, Universidad de Extremadura. Avda. Virgen del Puerto 2, 10600 Plasencia (Cáceres). España
 (2) Departamento de Didáctica de la Ciencias Experimentales, Facultad de Educación, Universidad Complutense de Madrid, Rector Royo Villanova, s/n. 28040 Madrid, España
 (3) Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, IREC (CSIC-UCLM-JCCM). Ronda de Toledo s/n 13071, Ciudad Real, España.
 (4) CREA, Campus de Bellaterra (UAB), Edifici C, 08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona). España

* Autor de correspondencia: R. Bonal [raulbonal@unex.es]

> Recibido el 17 de enero de 2018 - Aceptado el 07 de octubre de 2018

Bonal, R., Muñoz, A., Aparicio, J.M., Santoro, M., Espelta, J.M. 2019. Filogeografía, factores históricos y especificidad parásito-hospedador: estudio comparativo de las comunidades de insectos depredadores de bellotas (*Curculio* spp.) en la península ibérica y California. *Ecosistemas* 28(1):15-25. Doi.: 10.7818/ECOS.1543

La especificidad parásito-hospedador constituye uno de los principales motores de especiación en los insectos fitófagos. El aislamiento poblacional y su persistencia en el tiempo pueden favorecer la aparición de adaptaciones locales intra-específicas, del mismo modo que extinciones locales y un intenso flujo genético entre poblaciones las eliminan. Estas adaptaciones pueden ser la fase previa a la especiación. En este trabajo comparamos los patrones de especificidad trófica de los coleópteros del género *Curculio* (parásitos especialistas de las semillas de los *Quercus*) entre California y la península ibérica. Estas dos zonas tienen hoy día un clima muy parecido, sin embargo, su historia climática pasada difiere. Utilizando técnicas de taxonomía de ADN hallamos una potencial especie críptica de *Curculio* en la península ibérica, aunque la especificidad trófica no está detrás de la posible especiación. A nivel intra-específico, los *Curculio* spp. californianos mostraron una estructura genética poblacional mucho más marcada que los ibéricos, en los que se aprecia una depauperación genética y un intenso flujo inter-poblacional posterior. Estas diferencias, muy similares a las encontradas al comparar los *Quercus* spp. de ambas zonas, apuntan a la existencia de un mayor número de refugios glaciares en California. A pesar de que un menor flujo genético entre poblaciones prolongado temporalmente podría haber favorecido la especialización en California, no hubo diferencias con la península ibérica en este sentido. La marcada variabilidad interanual del recurso trófico (fluctuaciones de cosechas de bellotas no siempre coincidentes entre especies de *Quercus*) puede haber favorecido la ausencia de una especificidad muy estricta.

Palabras clave: especificidad trófica; interacciones planta-animal; *Quercus*; refugios glaciares

Bonal, R., Muñoz, A., Aparicio, J.M., Santoro, M., Espelta, J.M. 2019. Phylogeography, historical factors and host-parasite specificity: comparative study of the communities of acorn feeding insects (*Curculio* spp.) in the Iberian Peninsula and California. *Ecosistemas* 28(1): 15-25. Doi.: 10.7818/ECOS.1543

Host-parasite specificity constitutes one of the main speciation engines in phytophagous insects. The isolation of populations and its temporal persistence may promote local adaptations at the intra-specific level, in the same way that local extinctions and intense gene-flow among populations eliminate them. These adaptations may be the stage previous to speciation. In this study we compare the trophic specificity patterns of the coleoptera of the genus *Curculio* (specialist parasites of *Quercus* seeds) between California and the Iberian Peninsula. These two zones have nowadays a very similar climate, however, their past climate histories differ. Using DNA taxonomy techniques we found a potential cryptic species of *Curculio* in the Iberian Peninsula, although trophic specialization does not underlay this possible speciation event. At the intra-specific level, californian *Curculio* showed a much more marked population genetic structure compared to Iberian ones, in which genetic depauperation and a posterior intense inter-population gene-flow can be appreciated. These differences, very similar to those found when the *Quercus* spp. of both zones were compared, point at the existence of a higher number of glacial refugia in California. Despite that a lower inter-population gene-flow prolonged in time could have promoted a higher specialization in California, there were not differences with the Iberian Peninsula in this sense. The marked inter-annual variability of the trophic source (fluctuations of acorn crops not always coincident among *Quercus* species) may have favoured the lack of a very strict specificity.

Key words: glacial refugia; *Quercus*; plant-animal interactions; trophic specificity

Introducción

Los insectos fitófagos son un ejemplo paradigmático de cómo la especialización trófica puede promover la diversificación intra-específica y la especiación (Cook et al. 2002; Nosil et al. 2002; Toju y Sota 2006; Drummond et al. 2010). Muchos insectos se alimentan

de pocas especies de plantas (a veces una sola) relacionadas filogenéticamente (Barrett y Heil 2012). Su eficacia biológica es mayor cuando se alimentan de las plantas hospedadoras en las que están especializados (Bopp y Gottsberger 2004; Sword et al. 2005; Cogni y Futuyama 2009; Barrett y Heil 2012), lo que favorece la partición del nicho trófico y la coexistencia entre especies.

Existen diferentes caminos para llegar a la especialización trófica. A veces se producen cambios morfológicos muy espectaculares, como ocurre con las modificaciones de los órganos utilizados para perforar las cubiertas de las semillas (ver p. ej. [Toju y Sota 2006](#)). En otras ocasiones la especialización no es tan evidente, y consiste en el desarrollo de mecanismos de detoxificación de compuestos defensivos, adaptaciones fenológicas, asociaciones con bacterias endosimbiontes etc. ([Bopp y Gottsberger 2004](#); [Pearse y Hipp 2009](#); [Toju y Fukatsu 2011](#)). En estos últimos casos la especiación puede ser críptica (ausencia de diferencias morfológicas) y sólo detectable mediante técnicas moleculares ([Murray et al. 2007](#); [Barrett y Heil 2012](#)).

La especialización trófica puede producirse en simpatria o en alopatria, aunque es más frecuente en este segundo escenario. Puede comenzar cuando poblaciones diferentes de la misma especie interactúan con hospedadores de distintas características, pudiendo desarrollar adaptaciones locales en lo que se conoce como mosaico geográfico coevolutivo ([Thompson 1999](#)). El mantenimiento de las adaptaciones locales y la diferenciación

fenotípica entre poblaciones dependerá de la intensidad del flujo genético inter-poblacional. Un flujo genético intenso entre poblaciones sometidas a diferentes presiones de selección puede hacer que las adaptaciones desaparezcan si no hay mecanismos que impidan la reproducción entre la población local y los individuos que llegan de fuera ([Hanski y Gaggiotti 2004](#); [Toju et al. 2011](#)). Asimismo, una mayor estabilidad ambiental y un prolongado tiempo efectivo (número de generaciones) de interacción entre insectos y plantas hospedadoras favorecerán las adaptaciones locales y la diversificación ([Rohde 1992](#)).

El objetivo de este estudio es comparar los patrones de especificidad trófica de los coleópteros del género *Curculio* (Curculionidae) de California y la península ibérica, dos regiones en las que los factores históricos podrían haber condicionado de manera diferente las interacciones de estos insectos con sus hospedadores. Los *Curculio* spp. son los principales depredadores pre-dispersivos de las bellotas de los *Quercus* spp. (robles, quejigos, encinas etc.) en toda su área de distribución mundial ([Bonal et al. 2011](#); [Toju y Fukatsu 2011](#); [Bonal et al. 2016](#); [Fig. 1](#)) y constituyen

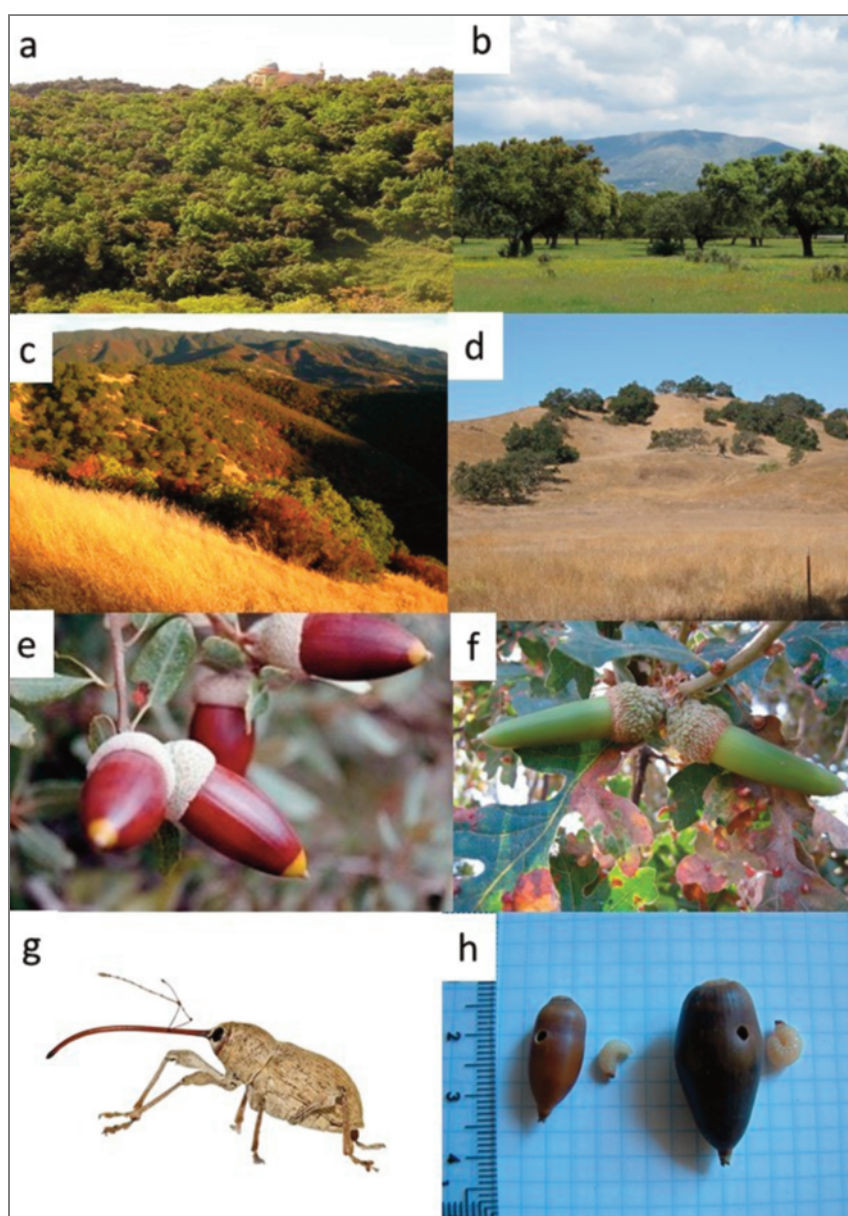


Figura 1. Fotografías de formaciones cerradas y abiertas de *Quercus* spp. en la península ibérica (a y b) y California (c y d). Bellotas de la especie ibérica *Quercus ilex* (e) y la californiana *Quercus lobata* (f). Hembra adulta de *Curculio elephas* (g) y larvas recién salidas de la bellota después de completar su desarrollo.

Figure 1. Pictures of open and closed formations of *Quercus* spp. in the iberian peninsula (a and b) and California (c and d). Acorns of the iberian species *Quercus ilex* (e) and the californian *Quercus lobata* (f). Adult female of *Curculio elephas* (g) and larvae just emerged from the acorn after completing their development.

un buen modelo para estudiar el efecto de las interacciones tróficas en la diversificación de especies (Hughes y Vogler 2004a; Bonal et al. 2011; Bonal et al. 2016). Las hembras perforan la cubierta de las semillas para hacer la puesta y las larvas se alimentarán de los cotiledones durante su desarrollo (Bonal et al. 2007). A nivel intra-específico, las interacciones con semillas de diferentes características han provocado diferencias inter-poblacionales en la morfología de los órganos especializados en realizar los agujeros de puesta (Toju y Sota 2006). A nivel interespecífico, las diferencias en el tamaño de las semillas han promovido la diversificación de tamaños corporales entre especies (Hughes y Vogler 2004a; Bonal et al. 2011). Asimismo, se ha comprobado que las comunidades de bacterias endosimbiontes difieren dependiendo del hospedador (Toju y Fukatsu 2011), aunque se desconoce hasta qué punto estos cambios pueden estar implicados en la especiación (que en este caso podría ser críptica).

Los mecanismos que promueven la diversificación de *Curculio* spp. son por tanto bien conocidos, al contrario que el efecto de los factores históricos y biogeográficos en los patrones de especificidad. La única comparación entre regiones biogeográficas se ha realizado en América entre California y el trópico (Nicaragua), donde la especialización es mayor (Peguero et al. 2017). No obstante, este tipo de comparaciones pueden estar afectadas por otros factores como las diferencias en la productividad asociada a la latitud, distancia filogenética entre hospedadores, divergencias ambientales etc. (Lewinsohn y Roslin 2008).

Nuestro objetivo al comparar California y la península ibérica es hacerlo entre dos zonas situadas a latitud similar, con clima actual parecido (Mediterráneo), pero con una historia climática diferente. Un ejemplo de estas diferencias es el efecto que tuvieron en ambas zonas las glaciaciones. En el último máximo glacial (hace 21 000 años) hubo en California un gran número de zonas refugio para muchas especies de animales y plantas (Davis et al. 2008; Roberts y Hamann 2015). Este número fue significativamente menor en la península ibérica, tal como se ha visto a partir de datos moleculares en diferentes organismos incluyendo los robles y encinas (*Quercus* spp.) (Grivet et al. 2006). Teniendo como base los registros polínicos y la modelización de los nichos climáticos se puede reconstruir la distribución de estos árboles durante el último máximo glacial. Así pues, durante ese periodo, en Iberia las quercíneas estarían restringidas a la mitad sur de la Península junto con

algunos enclaves costeros del Mediterráneo y el Atlántico (Blanco et al. 1997; Taberlet y Cheddadi 2002; Birks y Tinner 2016; Fig. 2a), ocupando una superficie menor que en el presente. En muchas zonas en las que hoy hay bosques de frondosas hubo en ese periodo coníferas o una vegetación tipo tundra (Blanco et al. 1997; Taberlet y Cheddadi 2002; Birks y Tinner 2016). Por el contrario, en California su distribución pasada coincidiría en gran medida con la actual, se habrían producido sólo movimientos a pequeña escala desde un número mayor de refugios (Grivet et al. 2006; Gugger et al. 2013; Ortego et al. 2015). Durante el último máximo glacial los *Quercus* se distribuirían en diferentes enclaves a lo largo de la costa del Pacífico y el piedemonte de la cordillera al este de California. La única diferencia significativa con respecto al presente es que durante aquel periodo las quercíneas estuvieron probablemente ausentes del Valle Central ateniéndonos a las predicciones de los modelos climáticos para diferentes *Quercus* spp. (Gugger et al. 2013; Ortego et al. 2015; Fig. 2b).

La presencia de las plantas hospedadoras condiciona la de los depredadores especialistas que se alimentan de ellas, por lo que se esperaría que los factores históricos que han condicionado la distribución de la quercíneas hayan afectado a la de sus principales depredadores de semillas, los coleópteros del género *Curculio*. Nuestra hipótesis es que una mayor estabilidad temporal y un mayor aislamiento (menor flujo genético intra-específico) entre poblaciones de estos insectos en diferentes refugios podría haber favorecido la aparición de adaptaciones locales que se tradujesen en especialización trófica e incluso especiación críptica (ver Roberts y Hamann 2015 para un análisis similar en plantas). Los patrones de especificidad trófica a amplia escala geográfica se han estudiado en California (Bonal et al. 2016), pero se desconocen en la península ibérica. Los objetivos concretos del estudio son: i) establecer relaciones inequívocas entre parásitos y plantas identificando las larvas de *Curculio* spp. mediante taxonomía de ADN ii) analizar el efecto de la especificidad trófica en la diversificación de los *Curculio* spp. ibéricos, teniendo en cuenta la especiación críptica potencial iii) estudiar si la tasa de recambio de especies en la Península se debe a diferencias en la composición local de especies de *Quercus* spp. iv) investigar la huella de los factores históricos en *Curculio* spp. comparando entre California y la península ibérica los parámetros relacionados con la diversidad genética, la estructura poblacional y su demografía.

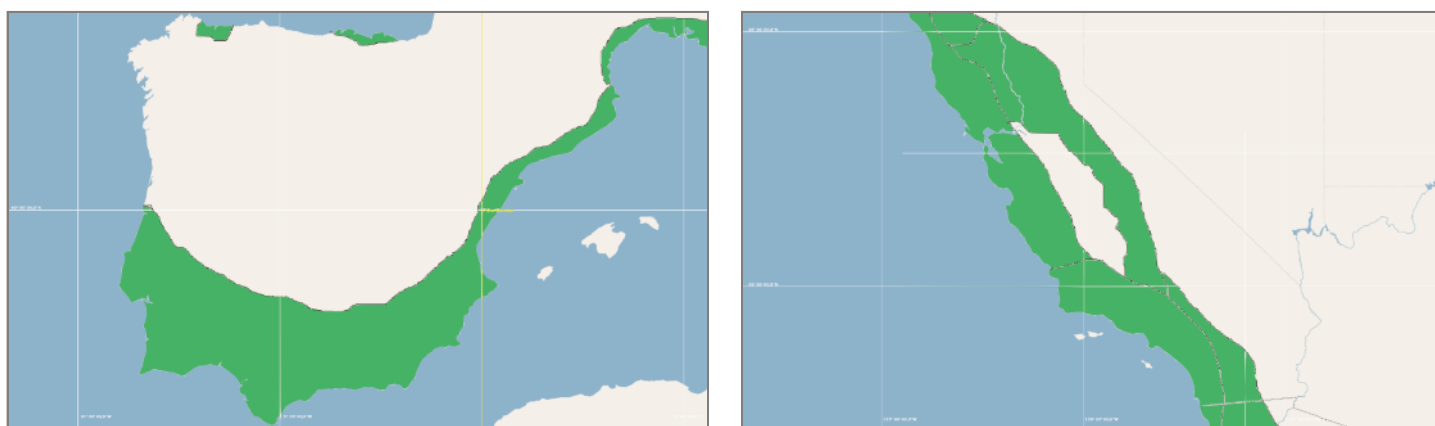


Figura 2. Distribución de los *Quercus* spp. (en verde) en la península ibérica (a, panel superior) y California (b, panel inferior) durante el Último Máximo Glacial (hace 21 000 años) de acuerdo a registros paleopolínicos y modelos de distribución basados nichos ambientales. a) península ibérica: mapa reconstruido a partir de Blanco et al. 1997, Taberlet y Cheddadi 2002 y Birks y Tinner 2016. b) California: mapa reconstruido a partir de Gugger et al. 2013 y Ortego et al. 2015.

Figure 2. Distribution of the *Quercus* spp. (in green) in the iberian peninsula (a, upper panel) and California (b, lower panel) during the Last Glacial Maximum (21 000 years bp) according to the paleopolinic records and distribution models based on environmental niches. a) Iberian peninsula: map reconstructed from Blanco et al. 1997, Taberlet y Cheddadi 2002 and Birks y Tinner 2016. b) California: map reconstructed from Gugger et al. 2013 and Ortego et al. 2015.

Material y métodos

Especies de estudio y muestreo de campo

En la península ibérica el muestreo se llevó a cabo en 24 localidades ampliamente distribuidas geográficamente (rangos norte-sur y este-oeste 778 y 768 kms respectivamente; Fig 3). En cada localidad se muestrearon bellotas infestadas de las que las larvas no habían salido aún (fácilmente distinguibles por el agujero de puesta de la hembra en el pericarpio) (Bonal et al. 2010). Se colectaron bellotas de 7 especies distintas de *Quercus*, tanto de la sección *Leucobalanus*: *Q. humilis*, *Q. faginea*, *Q. pyrenaica*, *Q. robur*, como de la sección *Cerris*: *Q. coccifera*, *Q. ilex*, *Q. suber*. En Europa, estas secciones separan a los *Quercus* de hoja caduca o marcescente de los de hoja perenne, respectivamente; en cada localidad se recogieron bellotas de todas las especies de *Quercus* presentes, aunque, debido al carácter vecero de los *Quercus* (Espelta et al. 2008), no todas las especies en cada localidad tuvieron bellotas en el año de muestreo. El número de especies de *Quercus* muestreadas por localidad varió entre uno y cuatro. Las bellotas infestadas se identificaron individualmente con un código único indicando el árbol del que procedían, la fecha de colecta y su localidad. Todas ellas se llevaron a cubiteras de plástico en los que cada bellota se colocó en un apartado diferente. A medida que iban emergiendo las larvas se guardaban individualmente en tubos eppendorff con alcohol al 96% para el posterior análisis de ADN. En California, tanto el rango geográfico como el número de especies de *Quercus* muestreadas fue similar al de la península ibérica (ver Bonal et al. 2016; Fig. 4).

Extracción y secuenciación de ADN

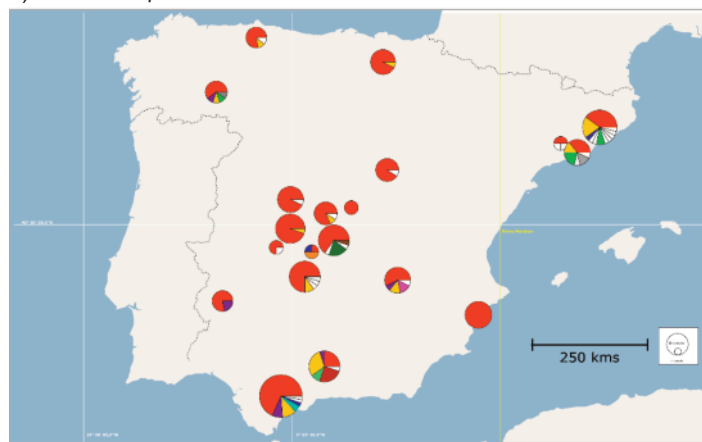
El ADN de las larvas se extrajo mediante el método salino a partir de una muestra de tejido según el protocolo detallado en Aljanabi y Martínez (1997). Una vez extraído el ADN, se amplificó en cada individuo una región parcial (824 pares de bases) del gen mitocondrial que codifica para la proteína mitocondrial Citocromo Oxidasa I (*cox1*) en larvas de todas las localidades de estudio. Esta proteína es un marcador molecular que en el caso de nuestro sistema de estudio tiene una doble utilidad. Por un lado, es muy útil para poder determinar hasta el nivel de especies insectos que se encuentran en fases del ciclo vital para las que no existen claves morfológicas (como es el caso de *Curculio* spp.). Esto se puede hacer mediante la comparación de las secuencias de los individuos desconocidos con las secuencias de referencia de adultos correctamente identificados (Bonal et al. 2011). Por otro lado, es un marcador utilizado para describir la estructura genética a nivel intra-específico. En el caso de los *Curculio* spp., estudios con *C. camelliae* han demostrado que, como marcador neutro, *cox1* tiene resolución para detectar estructura molecular a escala de pocos kilómetros (Toju et al. 2011).

Para la amplificación del fragmento de Citocromo Oxidasa I se utilizaron los cebadores (primers) C1-J-2183 (Jerry) y L2- N-3014 (Pat). El protocolo para la preparación de la Master Mix y las condiciones de la PCR fueron las especificadas en Hughes y Vogler (2004b). Para la secuenciación se utilizó la tecnología BigDye (Perkin-Elmer) y un secuenciador ABI3700. Los cromatogramas de las secuencias se alinearon y se editaron utilizando el software SEQUENCHER 4.6 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA).

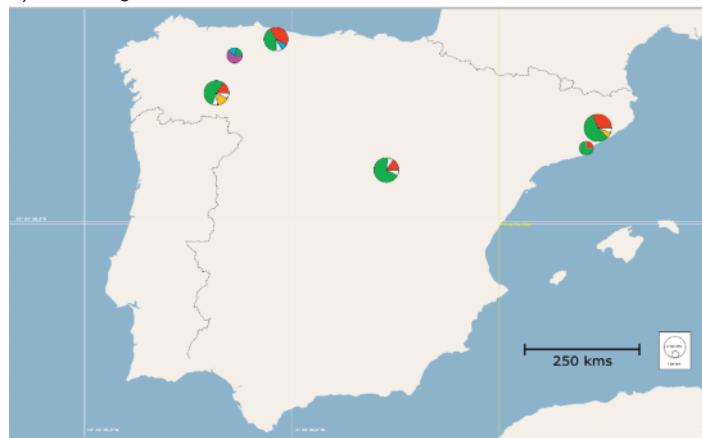
Delimitación de especies y análisis filogenéticos

La delimitación de especies de las muestras ibéricas se realizó de acuerdo al Modelo Generalizado Yules-Coalescent (GMYC) implementado en el paquete de R 'splits', usando la opción de 'single threshold' (Pons et al. 2006), igual que hicimos anteriormente para las larvas de *Curculio* spp. de California (Bonal et al. 2016). En primer lugar, construimos un árbol con los diferentes haplotipos ibéricos de *cox1* según el método Maximum Likelihood (ML) aplicando el modelo de sustitución GTR+I+Gamma según el resultado de jMODELTEST 0.1.1 (Posada 2008). Utilizamos RAxML 7.0.4 (Stamatakis 2006) para construir el árbol ML de *cox1*, que posteriormente se hizo ultramétrico con PAUP*4.0b10 (Swofford 2002). El método

a) *Curculio elephas*



b) *Curculio glandium A*



c) *Curculio glandium B*

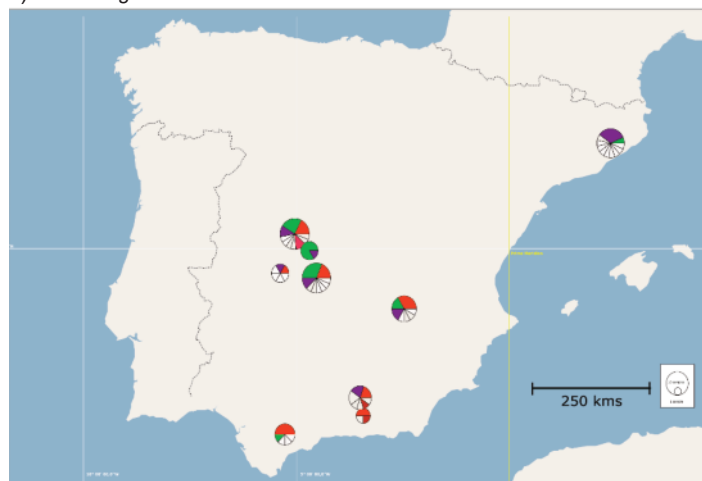


Figura 3. Proporción de los haplotipos de *C. elephas*, *C. glandium A* y *C. glandium B* en la península ibérica. Haplotipos distintos están representados con diferentes colores, excepto los haplotipos únicos (presentes en un solo individuo) que están en blanco. El tamaño muestral en cada localidad está relacionado con el diámetro del círculo según la muestra de referencia de la esquina inferior derecha.

Figure 3. Proportion of haplotypes of *C. elephas*, *C. glandium A* and *C. glandium B* in the iberian peninsula. Distinct haplotypes are represented by different colours, except unique haplotypes (present in only one individual) which are shown in white. Sample size in each locality is related to the circle diameter according to the reference in the lower right corner.

GMYC analiza los patrones de ramificación del árbol de *cox1* y detecta la transición entre la ramificación “dentro de especie” y “entre especies”, delimitando ‘grupos (clusters) de ADN mitocondrial que evolucionan independientemente (Pons et al. 2006). Estos grupos reciben el nombre de ‘especies GMYC’ y, cuando

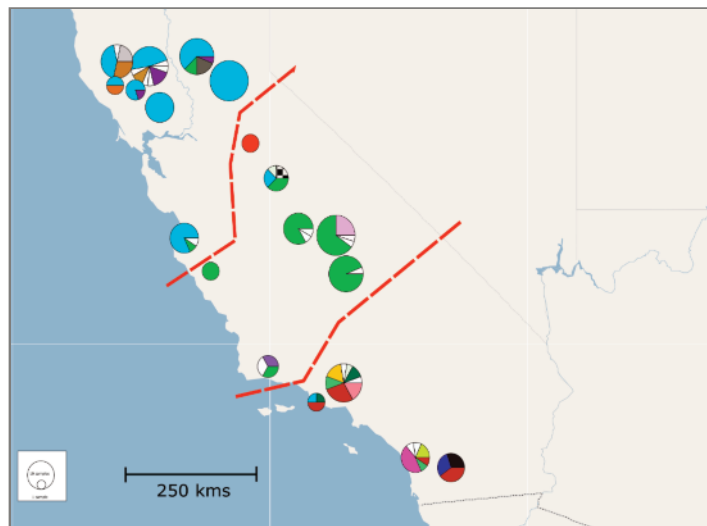
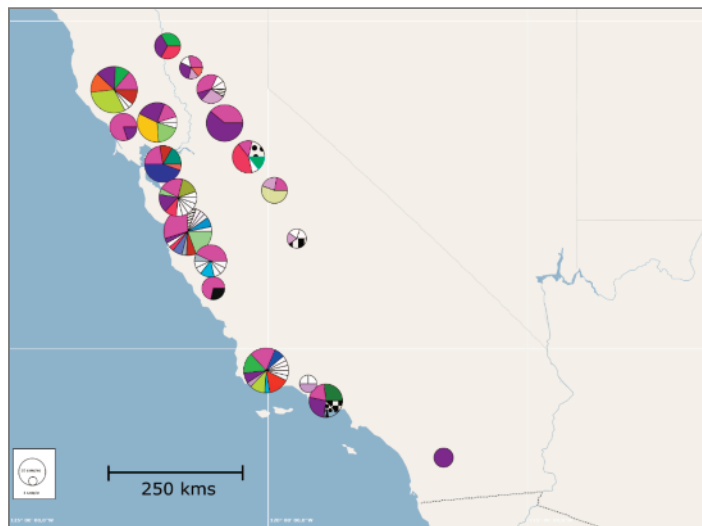
a) *Curculio pardus*b) *Curculio occidentis*

Figura 4. Proporción de los haplotipos de *C. pardus* y *C. occidentis* en California. Haplotipos distintos están representados con diferentes colores, excepto los haplotipos únicos (presentes en un solo individuo) que están en blanco. El tamaño muestral en cada localidad está relacionado con el diámetro del círculo según la muestra de referencia de la esquina inferior derecha. Las líneas discontinuas rojas en *C. pardus* indican las tres zonas con prevalencia de distintos haplotipos dominantes.

Figura 4. Proportion of haplotypes of *C. pardus* and *C. occidentis* in California. Distinct haplotypes are represented by different colours, except unique haplotypes (present in only one individual) which are shown in white. Sample size in each locality is related with the circle diameter according to the reference in the lower right corner. Red discontinuous lines in *C. pardus* indicate the three zones with prevalence of the three dominant haplotypes.

incluyen secuencias de especímenes identificados morfológicamente hasta el nivel de especie, pueden servir para determinar especímenes no identificables morfológicamente, como son las larvas de coleópteros (Pinzon-Navarro et al. 2010; Peguero et al. 2017).

Una vez concluida la delimitación de especies, se eligió un individuo por cada grupo GMYC (o especie putativa) y se secuenciaron otros dos genes, el mitocondrial Citocromo b (citb) y el nuclear Factor de Elongación Alfa (EF1- α). Los cebadores utilizados fueron CB1/CB2 para citb y EF1-R/EF1-F para EF1- α (ver Hughes y Vogler 2004b para la descripción detallada de secuencias de cebadores y condiciones de PCR). El objetivo de hacer esta filogenia era conocer si la diferenciación de especies en los *Curculio* spp. europeos estaba relacionada con algún cambio en el hospedador (especie de *Quercus* spp.). La filogenia incluyó a todas las especies europeas y americanas para las que existen secuencias de los tres genes en Gen-Bank (Bonal et al. 2016). Las secuencias de cada uno de los tres genes (cox1, citb y EF- α) se alinearon por separado con CLUSTALW (Thompson et al. 1994) y se cortaron hasta dejarlas en 711, 413 y 581 pares de bases, respectivamente, para reducir el número de posiciones sin datos. En el caso del gen nuclear Ef1- α , que contiene intrones, se utilizaron las penalizaciones por apertura y extensión de gaps proporcionada en CLUSTALW por defecto (15 y 6.66, respectivamente); la inspección visual del alineamiento mostró que esos valores eran adecuados. Una vez alineados, los tres genes fueron concatenados, realineados e inspeccionados para comprobar que no había errores. La especie *C. pyrrhoceras* (que se alimenta de agallas en lugar de semillas) se utilizó como outgroup en la filogenia, tal y como se ha hecho en otras ocasiones (Hughes y Vogler 2004a).

Utilizamos MRBAYES 3.2 (Ronquist et al. 2012) para construir la filogenia de acuerdo al modelo de inferencia bayesiana, después de calcular los modelos de sustitución que mejor se ajustaban a cada uno de los tres genes según el valor de Akaike obtenido en jMODELTEST 0.1.1 (Posada 2008). Se llevaron a cabo dos análisis de dos millones de generaciones cada uno usando una cadena de Markov fría y dos calientes ($\lambda = 0.2$), muestreando cada 1000 generaciones. Al acabar, vimos si los análisis habían convergido según los parámetros de diagnóstico de MRBAYES e inspeccionamos visualmente si las cadenas de Markov se habían estabilizado. Después de 500 000 generaciones vimos que la desviación de las cadenas

se estabilizaba en valores cercanos a cero. Así pues, tras descartar el 25% de los árboles filogenéticos, el resto se juntaron para generar una filogenia compatible de todos los demás.

Estructura genética intra-específica y dinámica poblacional

Los análisis de estructura genética intra-específica se realizaron sólo para cada una de las especies putativas (GMYC) delimitadas en este estudio (*Curculio* spp. ibéricos) o en el estudio previo de los *Curculio* spp. de California (Bonal et al. 2016) que tuviesen al menos 4 individuos con secuencias de cox1 de calidad por localidad (ver Papadopoulou et al. 2011 para un procedimiento similar). Esto dejó fuera a *C. aurivestis* en California y a *C. venosus* y *C. pellitus* en la península ibérica. El software POPART (Leigh y Bryant 2015) se utilizó para ilustrar la distribución de los diferentes haplotipos de cada especie en la península ibérica y California. Se realizaron análisis de la varianza molecular (AMOVA) utilizando el software ARLEQUIN (Excoffier et al. 2005) para ver qué porcentaje de la misma se explicaba por las diferencias entre poblaciones.

Diversidad genética y dinámica poblacional

La diversidad nucleotídica y la diversidad genética haplotípica del gen cox1 se calculó utilizando el software ARLEQUIN (Excoffier et al. 2005) para todas las especies que tuvieran al menos 4 co-nespecíficos por población. Con el mismo software se calculó la D de Tajima (Tajima 1989). Este parámetro aporta información acerca de la dinámica poblacional en el caso de marcadores neutros como el cox1. Asimismo, se analizó a nivel intraespecífico si la diversidad genética y nucleotídica de las poblaciones de *Curculio* estaban relacionadas con el número de especies de plantas hospedadoras (*Quercus* spp.) en cada localidad.

Composición local de la comunidad de *Quercus* spp. y tasa de recambio de especies de *Curculio* entre zonas de estudio

Debido a que a priori es imposible balancear el tamaño muestral entre localidades y especies de *Quercus*, ya que se muestrean semillas infestadas en lugar de capturar directamente insectos, en el análisis de la tasa de recambio de especies ibéricas incluimos sólo aquellas localidades en las que se hubiesen colectado 9 o más especímenes (un total de 20 zonas). Analizamos el efecto de

la comunidad de *Quercus* en las diferencias entre localidades en la composición de especies de *Curculio*. La tasa de recambio de especies se calculó con el índice de Bray-Curtis, que tiene en cuenta no sólo la presencia/ausencia de cada especie, sino su abundancia relativa, haciéndolo por tanto menos sensible a las especies poco abundantes. La correlación de la similitud en la composición de *Curculio* spp. y *Quercus* spp. entre localidades se midió con un Tests de Mantel parcial (10 000 permutaciones) en el que se también se incluyó la distancia Euclídea entre localidades para controlar por el efecto potencial de la autocorrelación espacial (Koenig 1999). Para el Test de Mantel se utilizó el paquete de R 'ECODIST' (Goslee y Urban 2007).

Resultados

Delimitación de especies y análisis filogenéticos

Se consiguieron un total de 514 secuencias del gen *cox1* de *Curculio* spp. ibéricos con la calidad necesaria para ser incluidas en el análisis. De todas estas secuencias se obtuvieron un total de 103 haplotipos únicos que fueron utilizados para construir el árbol filogenético a partir del cual se llevó a cabo la delimitación de especies siguiendo el método GMYC. Este método diferenció 5 especies putativas (especies GMYC), de las que 4 se correspondieron con las especies europeas conocidas que se alimentan de bellotas: *C. elephas*, *C. glandium*, *C. venosus* y *C. pellitus*. Para todas estas espe-

cies existen secuencias de referencia de *cox1* (códigos de barras de ADN) procedentes de individuos adultos correctamente identificados morfológicamente que dejan fuera de duda la determinación. Sin embargo, existe una quinta especie putativa para la que en la actualidad no existe ninguna secuencia de referencia.

De un individuo de esta nueva especie críptica potencial se secuenciaron otro gen mitocondrial (*cytb*) y el nuclear EF1- α para poder incluirla en el árbol filogenético global de *Curculio* spp. europeos y americanos (Fig. 5). Este árbol mostró la nítida separación entre *Curculio* spp. de Europa y Norteamérica en diferentes clados con alto soporte en los nodos. La potencial nueva especie europea estaba muy cercana a *C. glandium*, por lo que de ahora en adelante esta quinta especie será denominada *C. glandium* B para diferenciarla del *C. glandium* A (que sería la especie conocida hasta ahora) (Fig. 5).

Especificidad trófica y tasa de recambio de especies

La filogenia muestra que no hay grandes diferencias entre las especies de *Quercus* de las que se alimenta cada una de las especies (Fig. 5). Las larvas de las tres especies mayoritarias (*C. elephas*, *C. glandium* A y *C. glandium* B) se colectaron en bellotas de todas las especies de *Quercus* muestreadas. La ausencia de diferencias entre estas dos últimas quiere decir que el cambio a una nueva especie hospedadora no ha sido el factor que ha promovido su divergencia. Las dos especies minoritarias (*C. venosus*

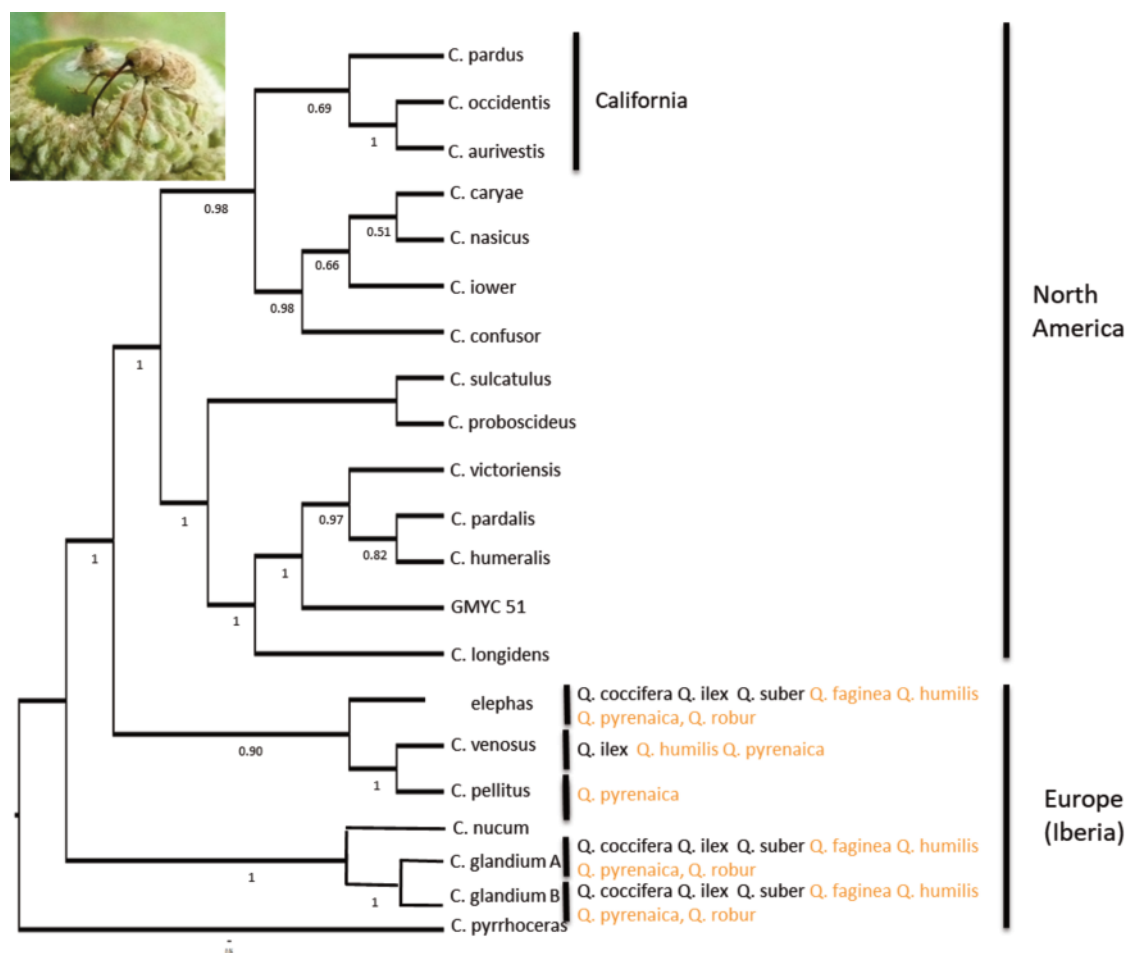


Figura 5. Filogenia de ADN de dos genes mitocondriales (*cox1* and *cytb*) y uno nuclear (*EF-1a*). La topología se infirió utilizando métodos bayesianos. El soporte de cada uno de los nodos (probabilidad posterior bayesiana) está indicado debajo de cada rama. Se indica en qué especie de *Quercus* se encontraron larvas de cada una de las especies de *Curculio* europeas (ibéricas). Las especies de *Quercus* en color negro corresponden a la sección *Cerris* dentro del género, las que están en amarillo a la sección *Leucobalanus*. Autor de la fotografía: Josep. M. Espelta.

Figure 5. DNA phylogeny based on two mitochondrial genes (*cox1* and *cytb*) and one nuclear (*EF-1a*) gene. Topology was inferred using bayesian methods. Node support (bayesian posterior probability) is indicated under each branch. It is shown the *Quercus* species in which each european (iberian) *Curculio* species was found. The *Quercus* species in black correspond to the section *Cerris* within the genus, those in yellow to the section *Leucobalanus*. Picture author: Josep M. Espelta.

y *C. pellitus*) faltaron en algunas especies de *Quercus*, pero muy probablemente se debe a su bajo tamaño muestral (25 y 3 individuos respectivamente entre todas las localidades) que hizo que se colectasen en muy pocos sitios restringiéndose el número de hospedadores potenciales.

La distribución de las especies mostró un sesgo geográfico en el caso de *C. glandium* A y *C. glandium* B, siendo el primero mucho más frecuente en la mitad norte de la península ibérica y el segundo en la sur, aunque hay zonas de simpatria (Fig. 6). No obstante, la tasa de recambio de especies no estuvo relacionada con la distancia entre localidades (Mantel test $R=0.08$; $P=0.22$). Las diferencias en la composición de especies de *Curculio* entre localidades tampoco estuvo relacionada con las diferencias entre sitios en la presencia de unos *Quercus* spp. u otros, ni a nivel de especie (Test Parcial de Mantel $R=0.04$; $P=0.34$) ni a nivel de sección dentro del género *Quercus* (*Lepidobalanus* vs *Cerris*) (Test Parcial de Mantel $R=0.06$; $P=0.24$).

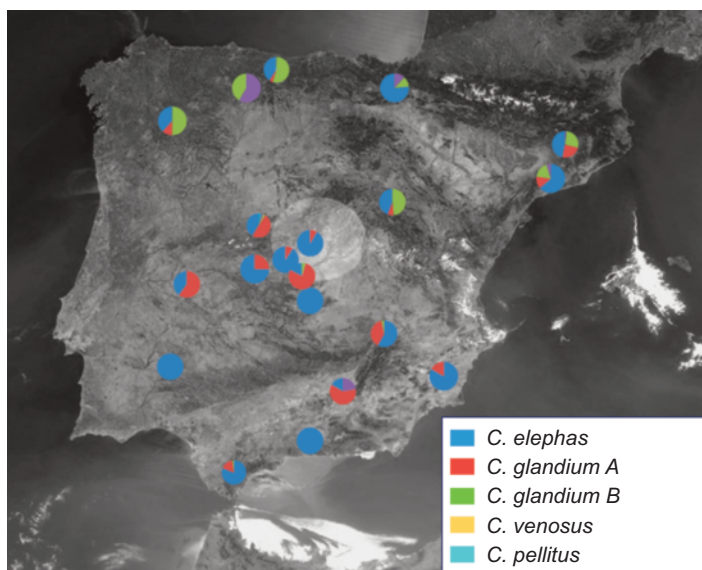


Figura 6. Mapa de la península ibérica con la localización de las 20 zonas de estudio donde se secuenciaron con éxito al menos 9 larvas de *Curculio* spp. que se identificaron mediante taxonomía de ADN. Se muestra la proporción de cada una de las especies delimitadas según la taxonomía de ADN (*C. elephas*, *C. glandium* A, *C. glandium* B, *C. venosus* y *C. pellitus*) en cada localidad.

Figure 6. Map of the Iberian peninsula with the location of the 20 study sites in which at least 9 larvae of *Curculio* spp. were successfully sequenced and further identified by means of DNA taxonomy. The proportion of each species delimited according to DNA taxonomy (*C. elephas*, *C. glandium* A, *C. glandium* B, *C. venosus* and *C. pellitus*) is shown for each locality.

Tabla 1. Resultado los análisis AMOVA que muestra el porcentaje del total de la varianza molecular explicado por las diferencias inter-poblacionales entre dos especies de *Curculio* de California y tres de la península ibérica.

Table 1. Results of the AMOVA analyses showing the percentage of the total molecular variance explained by the inter-population differences in two species of *Curculio* from California and three from the Iberian peninsula.

Zona	Especie	Varianza entre poblaciones	df	P
California	<i>C. pardus</i>	58.41	18	<0.001
	<i>C. occidentis</i>	19.02	19	<0.001
Pen. ibérica	<i>C. elephas</i>	10.02	19	<0.001
	<i>C. glandium</i> A	4.70	5	0.07
	<i>C. glandium</i> B	4.53	8	0.06

Estructura genética intra-específica

La estructura genética intra-específica fue mucho menos marcada en el caso de los *Curculio* spp. ibéricos. En California el porcentaje de varianza molecular explicado por las diferencias entre poblaciones fue mucho más alto y significativo, destacando *Curculio pardus* (59%) (Tabla 1). En el caso de las especies ibéricas, tan sólo en *Curculio elephas* el porcentaje de varianza molecular explicado por la diferenciación entre poblaciones fue significativo, y su valor fue mucho menor (10%). En todas las especies ibéricas hubo un haplotipo mayoritario presente en todas las localidades, con la única excepción de dos poblaciones en el caso de *C. glandium* B (Fig. 3c). Esto no fue así en California, especialmente en el caso de *C. pardus*, en el que se distinguen tres zonas claramente distintas con diferentes haplotipos mayoritarios (Fig. 4a).

Los resultados del Test de Tajima mostraron diferencias entre especies respecto a sus dinámicas poblacionales (Tablas 2 y 3). En este sentido, destacan los valores negativos y significativos del

Tabla 2. Número de individuos, diversidad genética haplotípica y parámetro D de Tajima para las poblaciones de dos especies de *Curculio* de California. Los valores en negrita de la D de Tajima son significativos ($P<0.05$).

Table 2. Number of individuals, haplotype genetic diversity and the parameter D of Tajima for the populations of two species of *Curculio* from California. Bold values of the D of Tajima are significant ($P<0.05$).

Localidad	<i>Curculio pardus</i>			<i>Curculio occidentis</i>		
	N	Diver. Hap.	D Tajima	N	Diver. Hap.	D Tajima
2	16	0.12	-1.16			
5	20	0.53	-0.79			
8	12	0.31	-1.45	5	0.90	0.082
10	8	0.82	-0.01	9	0.66	0.97
11	4	0.00	0	14	0.78	0.98
14	20	0.00	0	11	0.83	-0.8
15	16	0.59	-0.74			
27	19	0.76	-1.54			
28	5	0.4	-0.81	10	0.35	0.21
31				18	0.75	-0.011
46	18	0.88	-1.23			
47	4	0.83	-0.79	15	0.83	0.83
68	21	0.83	0.02	6	1	-0.25
71	11	0.00	0	23	0.83	0.6
81				31	0.88	-1.26
84	4	0.00	0	7	0.47	0.79
86	11	0.34	-0.62	14	0.82	-1.63
91	7	0.85	0.23	29	0.91	-1.3
97				19	0.92	-0.59
112				4	0.83	-0.78
204	4	0.66	1.63	29	0.85	0.043
206				7	0.90	0.59
207				18	0.50	2.02
210				9	0.75	1.45
211	10	0.75	-0.36			
212				5	0	0
213	10	0.73	1.32			

Tabla 3. Número de individuos, diversidad genética haplotípica y parámetro D de Tajima para las poblaciones de tres especies de *Curculio* de la península ibérica. Los valores en negrita de la D de Tajima son significativos ($P < 0.05$).

Table 3. Number of individuals, haplotype genetic diversity and the parameter D of Tajima for the populations of three species of *Curculio* from the Iberian peninsula. Bold values of the D of Tajima are significant ($P < 0.05$).

Localidad	<i>Curculio elephas</i>			<i>Curculio glandium A</i>			<i>Curculio glandium B</i>		
	N	Div. Hap.	D Tajima	N	Div. Hap.	D Tajima	N	Div. Hap.	D Tajima
Arenal	14	0.14	-1.48				17	0.91	-1.96
Alicante	15	0	0						
Aranjuez	4	0	0						
Badajoz	9	0.38	0.15						
Bonillo	13	0.61	-0.81				12	0.87	-0.5
Cabaneros	20	0.44	-1.63						
Castelltallat	4	0.83	-0.75						
Collserola	14	0.83	-0.87	4	0.50	0.17			
Galicia	10	0.66	-1.66	13	0.70	-2.11			
Granada							4	0.83	1.34
Grazalema	38	0.52	-1.55				8	0.78	0.74
Huecas	19	0.74	-1.4						
Huetor							10	0.93	-1.3
La Puebla	20	0.55	-1.46						
Malaga Norte	20	0.81	0.21						
Montejo	11	0.18	-1.48	13	0.52	-1.15			
Montseny	21	0.81	-1.75	16	0.61	-0.66	15	0.90	-3
Navas Estena							15	0.87	-1.93
Oviedo	9	0.41	-1.36	12	0.75	-1.54			
Pais Vasco	13	0.15	-1.14						
Velada	18	0.11	-1.16				6	0.33	0
Villuercas	4	0.50	-0.61				6	1	-1.87

parámetro D en varias poblaciones de *C. elephas*. Esto se debe a que en esta especie un haplotipo domina toda el área de distribución, con algunas localidades en las que existen muchos haplotipos con un solo individuo portador (Fig. 3a). La presencia de estos últimos sugiere que las poblaciones se encuentran en un proceso de crecimiento demográfico después de haber pasado por un marcado cuello de botella. En el otro extremo estaría *C. occidentis* en California, donde no existen esas diferencias en la frecuencia de los diferentes haplotipos y algunos de los haplotipos localmente mayoritarios están restringidos a una sola localidad (Fig. 4b). Las diversidades haplotípicas y nucleotídicas difirieron significativamente entre especies ($F_{1.67}=4.83$; $P=0.001$ y $F_{1.67}=14.97$; $P<0.001$) respectivamente. En la especie ibérica *C. elephas* ambas fueron muy bajas, debido a la dominancia clara de un haplotipo en todas localidades (Tabla 3; Fig. 3a). No obstante, las diferencias Iberia-California no fueron tan marcadas como en el caso de la estructura genética. En *C. glandium B* la diversidad fue muy alta, y en el caso de *C. pardus*, a pesar de su marcada estructuración en tres bloques en California, los haplotipos mayoritarios fueron distintos en cada uno, pero en general muy dominantes (Tablas 2 y 3; Fig. 4a), con lo que la diversidad nucleotídica no fue tan elevada (Fig. 7). Ni la diversidad genética ni la nucleotídica estuvieron correlacionadas con el número de especies de *Quercus* por localidad en ninguna especie de *Curculio* (correlación de Spearman $P > 0.05$ en todos los casos).

Discusión

Los resultados muestran una gran diferencia entre los patrones filogeográficos de los *Curculio* spp. de California y la península ibérica, acorde con la diferente historia climática pasada de ambas regiones. Sin embargo, estas diferencias no afectaron a la especificidad trófica de estos insectos ya que, al igual que en California, los *Curculio* spp. ibéricos no muestran una especificidad sig-

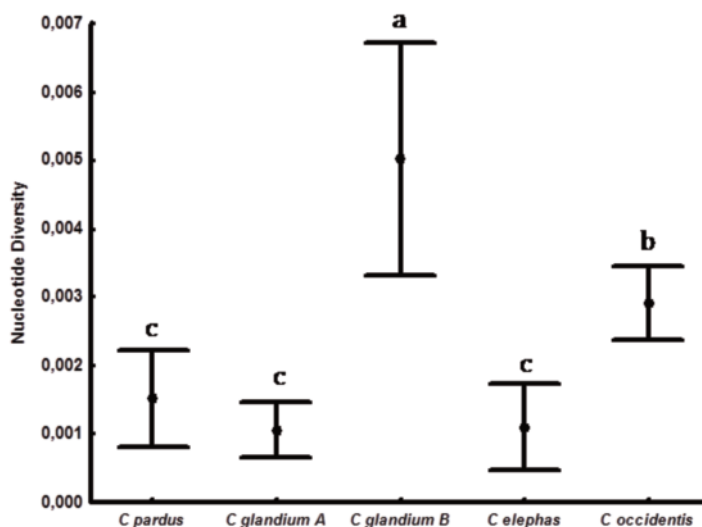


Figura 7. Diversidad nucleotídica (Media ± EE) de cada una de las especies de *Curculio* de la península ibérica (*C. elephas*, *C. glandium A* y *C. glandium B*) y California (*C. pardus* y *C. occidentis*). Las letras diferentes sobre cada una de las especies indican diferencias significativas en las comparaciones a posteriori entre pares de especies (Test LSD < 0.05).

Figure 7. Nucleotide diversity (Mean ± SE) of each *Curculio* species of the Iberian peninsula (*C. elephas*, *C. glandium A* and *C. glandium B*) and California (*C. pardus* and *C. occidentis*). Different letters above each species indicate significant differences in the pairwise a posteriori comparisons between species (Test LSD < 0.05).

nificativa por ninguna especie de *Quercus* o por las especies de una determinada sección dentro del género (*Leucobalanus* o *Cerris* en el caso de Europa).

Al contrario que en California (Bonal et al. 2016), en la península ibérica sí se halló una especie críptica potencial cercana a *C. glandium*, aunque no relacionada con un cambio de hospedador, ya que las especies hermanas explotan exactamente los mismos *Quercus* spp. Esto contrasta con otros trabajos que, usando igualmente marcadores neutros, han encontrado aislamiento y diferencias genéticas intra-específicas entre poblaciones que explotan diferentes hospedadores (Drummond et al. 2010) e incluso especiación críptica consecuencia de esta especialización (Barrett y Heil 2012). En nuestro estudio las dos especies están bastante segregadas geográficamente, pudiendo ser *C. glandium* B (la nueva especie potencial) una especie ibérica que haya surgido al quedar aislada en el sur peninsular (Fig. 6). Esta segregación geográfica hace que haya que ser cauteloso en las conclusiones, ya que la delimitación con el modelo GMYC puede sobrestimar el número especies considerando como tal, linajes que han divergido por aislamiento geográfico dentro de la misma especie, por lo que en primera instancia se las suele denominar Unidades Evolutivas Independientes (Dincă et al. 2015). Futuros análisis morfológicos y uso de marcadores genéticos más finos (microsatélites y SNPs) permitirán confirmar si existe flujo genético entre las dos potenciales especies de *C. glandium* en zonas de simpatria o, si como se ha visto en otros casos, existe ya aislamiento reproductivo y se trataría de especies distintas (Nosil et al. 2002). En cualquier caso, para el objetivo de nuestro estudio la robustez de la determinación como especie no es tan relevante, ya que la especificidad trófica podría asimismo haber surgido a nivel intra-específico entre linajes favorecida por el aislamiento espacial (Drummond et al. 2010), y esto no ocurrió.

Debido a la ausencia de especificidad trófica, la presencia de unas especies de *Quercus* u otras no afectó a la composición específica de las comunidades de *Curculio* spp. pero, a diferencia de California (Bonal et al. 2016), la tasa de recambio de especies en la península ibérica no estuvo relacionada con la distancia entre localidades. La diferencia puede deberse a que la especie más escasa de California (*C. aurivestis*) estuvo presente en muy pocas localidades pero en general cercanas (Bonal et al. 2016), mientras que en la Península las especies raras están más ampliamente distribuidas. Esta distribución geográfica reducida podría estar relacionada con una reducida expansión desde refugios glaciares, tal como se ha sugerido para los *Quercus* californianos (Grivet et al. 2006).

La estructura genética poblacional fue mucho más marcada en el caso de los *Curculio* spp. californianos que en los ibéricos, lo cual concuerda con las estructuras genéticas de sus plantas hospedadoras en las dos regiones. Los primeros estudios que documentaron la existencia de un mayor número de haplotipos de ADN cloroplástico en los *Quercus* spp. californianos y la menor amplitud de su distribución geográfica en comparación con los ibéricos aludieron a la existencia de un mayor número de refugios glaciares en California (Grivet et al. 2006). Más recientemente, diferentes estudios incluyendo modelos de nicho climático y de acuerdo a ellos proyecciones de distribución geográfica durante el Último Máximo Glaciar (Late Glacial Maximum en inglés, siglas LGM) han permitido confirmar esta hipótesis. Los modelos muestran que muchas de las zonas donde actualmente se encuentran los *Quercus* en California eran zonas climáticamente favorables para estas especies ya durante el último máximo glacial. Esta presencia de una mayor cantidad de refugios glaciares se ha predicho a partir de modelos climáticos para distintas especies arbóreas del oeste de Norteamérica (Roberts y Hamann 2015). En la costa Este de Norte América o de Europa, sin embargo, los mismos modelos para los *Quercus* spp. predicen la existencia de muchas menos zonas con clima favorable y una gran expansión de su área potencial de distribución desde entonces a la actualidad (Svenning et al. 2008; Gugger et al. 2013).

En California, diferentes estudios han analizado la relación entre la estabilidad climática y variables relacionadas con la genética de las poblaciones de *Quercus* spp. En algunas especies se ha comprobado que aquellas zonas más estables climáticamente (donde las condiciones climáticas han permitido la presencia de *Quercus* tanto en el LGM como en la actualidad) la diversidad genética local es mayor (Gugger et al. 2013), aunque en otras esta

relación no ha sido significativa (Ortego et al. 2015). Lo que sí se ha observado en todos los casos es que la estabilidad favorece la diferenciación genética entre poblaciones, debido probablemente a fenómenos de deriva genética o adaptación local (Gugger et al. 2013; Ortego et al. 2015). Esto explicaría la baja diversidad genética y la débil estructura poblacional detectada en los *Quercus* spp. europeos (Petit et al. 2002; Grivet et al. 2006), donde la estabilidad climática ha sido mucho menor (Svenning et al. 2008; Gugger et al. 2013).

La dependencia de los coleópteros especialistas del género *Curculio* de sus plantas hospedadoras harían que su distribución histórica y la genética de sus poblaciones mostrasen patrones parecidos a los de los *Quercus*, y así lo muestran nuestros resultados. La estructura poblacional fue mucho más marcada en los *Curculio* de California. El caso de *C. pardus* es el que mejor ejemplifica este patrón, con tres haplotipos que dominan en tres zonas que, por otro lado, apenas comparten ningún haplotipo (Fig. 4a). En el caso de los *Curculio* spp. ibéricos, por el contrario, existe siempre un haplotipo presente en prácticamente todas las poblaciones de cada especie que, además, suele ser el dominante. *C. elephas* destaca en este sentido, una especie en la que la diversidad genética es especialmente baja y en donde en algunas poblaciones se ha producido una expansión a partir de un cuello de botella reciente. La concordancia filogeográfica entre *Quercus* spp. y *Curculio* spp. es lógica teniendo en cuenta que, salvo alguna especie de otro género (Desouhant et al. 2000), los *Quercus* son los principales hospedadores de estos insectos. No obstante, en el caso de los insectos sorprende que la distribución espacial de muchos haplotipos sea tan reducida en California. En los *Quercus* spp. se ha argumentado que podría ser el resultado de limitaciones a la dispersión de las bellotas desde las diferentes zonas refugio (Grivet et al. 2006). En estos insectos podría deberse igualmente a limitaciones en la movilidad, que se sabe que no es muy grande (Bonal et al. 2012; Pélisson et al. 2013), o a algún tipo de incompatibilidad con las poblaciones en las zonas de contacto.

La diversidad genética, sin embargo, no fue siempre mayor en el caso de los *Curculio* spp. californianos. En el caso de la nueva especie potencial del centro y sur de la península ibérica (*C. glandium* B) la diversidad haplotípica y nucleotídica fue muy alta. La estabilidad ambiental del sur Peninsular durante las glaciaciones puede haber favorecido esta mayor riqueza (revisión en Schmitt 2007). Su especie hermana (*C. glandium* A) presente en el tercio norte peninsular presenta una menor diversidad genética, que podría deberse a un cuello de botella o a una reciente colonización de la zona septentrional ibérica. De hecho, algunas especies de *Quercus* llegaron cruzando los Pirineos desde otros refugios después de la última glaciación (Petit et al. 2002), y lo mismo hicieron diferentes especies animales (Schmitt 2007).

Conclusiones

La ausencia de diferencias en especificidad trófica entre los *Curculio* spp. ibéricos y californianos sorprenden cuando los datos moleculares confirman que, al igual que sus plantas hospedadoras, el menor flujo genético entre las poblaciones en California podría haber favorecido la especialización (Thompson 1999; Toju et al. 2011). No obstante, hay que tener en cuenta que, aunque el número de refugios aislados fuese mayor en California, las comunidades de *Quercus* spp. tendrían que haber sido diferentes entre ellos para que potencialmente pudiese haber adaptación local (Thompson 1999), y se desconoce si los refugios fueron monoespecíficos en lo que a hospedadores se refiere. También hay que considerar que estos insectos dependen de un recurso (las bellotas) cuya disponibilidad puede variar enormemente y de manera impredecible entre años (Koenig et al. 1994; Espelta et al. 2008). Al ser los bosques de quercíneas mixtos en muchas ocasiones (ver p. ej. Espelta et al. 2008; Peguero et al. 2017) mantener la versatilidad trófica puede ser ventajoso para disponer de alternativas si la producción de bellotas de una especie de *Quercus* falla una temporada.

Agradecimientos

Este trabajo se ha financiado con los proyectos: CONSOLIDER-MONTES CSD2008-00040 MICINN, PII1C09-0256-9052 JCCM and ESF, AGL2014-54739-R (MINECO), PPII-201401-PJCCM ESF and CGL2008-00095/BOS (MICINN). Marisa Hernández colaboró en el trabajo de laboratorio. Agradecemos a Luís Navarro Josabel Belliure el envío de muestras de bellotas de dos localidades de estudio. A.M. tuvo un contrato Juan de la Cierva y R.B. un contrato del Programa de Atracción de Talento Investigador (Gobierno de Extremadura TA13032).

Referencias

- Aljanabi, S.M., Martínez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- Barrett, L.G., Heil, M. 2012. Unifying concepts and mechanisms in the specificity of plant-enemy interactions. *Trends in Plant Science* 17: 282-292.
- Blanco, E., Casado, M.A., Costa, M., Escribano, R., García, M., Génova, M., Gómez, A., Gómez, F., Moreno, J. C., Morla, C., Regato, P., Sainz, H. 1997. *Los Bosques Ibéricos. Una Interpretación Geobotánica*. Planeta, Madrid, España.
- Birks, H.J.B., Tinner, W. 2016. Past forests of Europe. En: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (eds.), *European Atlas of Forest Tree Species*, pp. 36-39. Publ. Off. EU, Luxemburgo.
- Bonal, R., Muñoz, A., Díaz, M. 2007. Satiation of predispersal seed predators: the importance of considering both plant and seed levels. *Evolutionary Ecology* 21: 367-380.
- Bonal, R., Muñoz A., Espelta, J. M. 2010. Mismatch between the timing of oviposition and the seasonal optimum. The stochastic phenology of Mediterranean acorn weevils. *Ecological Entomology* 35: 270-278.
- Bonal, R., Espelta, J.M., Vogler, A.P. 2011. Complex selection on life-history traits and the maintenance of variation in exaggerated rostrum length in acorn weevils. *Oecologia*, 167: 1053-1061.
- Bonal, R., Hernández, M., Ortego, J., Muñoz, A., Espelta, J.M. 2012. Positive cascade effects of forest fragmentation on acorn weevils mediated by seed size enlargement. *Insect Conservation and Diversity* 5: 381-388.
- Bonal, R., Espelta, J.M., Muñoz, A., Ortego, J., Aparicio, J.M., Gaddis, K., Sork, V.L. 2016. Diversity in insect seed parasite guilds at large geographical scale: the role of host-specificity and spatial distance. *Journal of Biogeography* 43: 1620-1630.
- Bopp, S., Gottsberger, G. 2004. Importance of *Silene latifolia* ssp. *alba* and *S. dioica* (Caryophyllaceae) as host plants of the parasitic pollinator *Hadena bicruris* (Lepidoptera, Noctuidae). *Oikos* 105(2): 221-228.
- Cogni, R., Futuyma, D.J. 2009. Local adaptation in a plant herbivore interaction depends on the spatial scale. *Biological Journal of the Linnean Society* 97: 494-502.
- Cook, J.M., Rokas, A., Pagel, M., Stone, G.N. 2002. Evolutionary shifts between host oak sections and host-plant organs in *Andricus* gallwasps. *Evolution* 56: 1821-1830.
- Davis, E.B., Koo, M.S., Conroy, C., Patton, J.L., Moritz, C. 2008. The California Hotspots Project: identifying regions of rapid diversification of mammals. *Molecular Ecology* 17: 120-138.
- Desouhant, E., Debouzie, D., Ploye, H., Menu, F. 2000. Clutch size manipulations in the chestnut weevil, *Curculio elephas*: fitness of oviposition strategies. *Oecologia* 122: 493-499.
- Dincă, V., Montagud, S., Talavera, G., Hernández-Roldán, J., Munguira, M.L., García-Barros, E., Hebert D. N., Vila, R. 2015. DNA barcode reference library for Iberian butterflies enables a continental-scale preview of potential cryptic diversity. *Scientific Reports* 5(1): 12395.
- Drummond, C.S., Xue, H.J., Yoder, J.B., Pellmyr, O. 2010. Host-associated divergence and incipient speciation in the yucca moth *Prodoxus coloradensis* (Lepidoptera: Prodoxidae) on three species of host plants. *Heredity* 105: 183-196.
- Espelta, J.M., Cortes, P., Mollowny-Horas, R., Sanchez-Humanes, B., Retana, J. 2008. Masting mediated by summer drought reduces acorn predation in Mediterranean oak forests. *Ecology* 89: 805-817.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47- 50.
- Goslee, S.C., Urban, D.L. 2007. The "ecodist" package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software* 22: 1-19.
- Grivet, D., Deguilloux, M.-F., Petit, R.J., Sork, V.L. 2006. Contrasting patterns of historical colonization in white oaks (*Quercus* spp.) in California and Europe. *Molecular Ecology*, 15(13): 4085-4093.
- Gugger, P.F., Ikegami, M., Sork, V.L. 2013. Influence of late Quaternary climate change on present patterns of genetic variation in valley oak, *Quercus lobata* Née. *Molecular Ecology* 22: 3598-3612.
- Hanski, I, Gaggiotti. 2004. *Ecology, Genetics and Evolution of Metapopulations*, 1st Edition. Academic press.
- Hughes, J., Vogler, A.P. 2004a. Ecomorphological adaptation of acorn weevils to their oviposition site. *Evolution* 58: 1971-1983.
- Hughes, J., Vogler, A.P. 2004b. The phylogeny of acorn weevils (genus *Curculio*) from mitochondrial and nuclear DNA sequences: the problem of incomplete data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*: 32: 601-615.
- Koenig, W. 1999. Spatial autocorrelation of ecological phenomena. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 22-26
- Koenig, W.H., Mumme, R.L., Carmen, W.J., Stanback, M.T. 1994. Acorn production by oaks in central coastal California: variation within and among years. *Ecology* 75: 99-109.
- Lewinsohn, T.M., Roslin, T. 2008. Four ways towards tropical herbivore megadiversity. *Ecology Letters* 11(4): 398-416.
- Leigh, J.W., Bryant, D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecology and Evolution* 6(9): 110-1116.
- Murray, T.E., Fitzpatrick, Ú., Brown, M.J., Paxton, R.J. 2007. Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. *Conservation Genetics* 9, 653-666.
- Nosil, P., Crespi, B.J., Sandoval, C.P. 2002. Host-plant adaptation drives the parallel evolution of reproductive isolation. *Nature* 417: 440-443.
- Ortego, J., Gugger, P.F., Sork, V.L. 2015. Climatically stable landscapes predict patterns of genetic structure and admixture in the Californian canyon live oak. *Journal of Biogeography* 42: 328-338.
- Papadopoulou, A., Anastasiou, I., Spagopoulou, F., Stalimerou, M., Terzopoulou, S., Legakis, A., Vogler, A.P. 2011. Testing the species-genetic diversity correlation in the Aegean archipelago: toward a haplotype-based macroecology? *The American Naturalist* 178: 241-255.
- Pearse, I.S., Hipp, A.L. 2009. Phylogenetic and trait similarity to a native species predict herbivory on non-native oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106: 18097-18102.
- Pélissou, P.F., Bernstein, C., François, D., Menu, F., Venner, S. 2013. Dispersal and dormancy strategies among insect species competing for a pulsed resource. *Ecological Entomology* 38: 470-477.
- Peguero, G., Bonal, R., Sol, D., Muñoz, A., Sork, V.L. Espelta, J.M. 2017. Tropical insect diversity: evidence of greater host specialization in seed-feeding weevils. *Ecology* 92: 2180 - 2190.
- Petit, R.J., Brewer, S., Bordács, S., Burg, K., Cjeddado. R., Coart, E., et al. 2002. Identification of refugia and post-glacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156: 49-74.
- Pinzon-Navarro, S., Barrios, H., Murria, C., Lyal, C.H.C., Vogler, A.P. 2010. DNA-based taxonomy of larval stages reveals huge unknown species diversity in Neotropical seed weevils (genus *Conotrachelus*): relevance to evolutionary ecology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 281-293.
- Pons, J., Barraclough, T., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlim, W.D., Vogler, A.P. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55: 595-609.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Rhode, K. 1992. Latitudinal Gradients in Species Diversity: The Search for the Primary Cause. *Oikos* 65(3): 514-527.
- Roberts, D.R., Hamann, A. 2015. Glacial refugia and modern genetic diversity of 22 western North American tree species. *Proceedings. Biological Sciences of The Royal Society*, 282(1804), 20142903.

- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Schmitt, T. 2007. Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* 4: 1–13.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Svenning, J.C., Normand, S., Kageyama, M. 2008. Glacial refugia of temperate trees in Europe: Insights from species distribution modelling. *Journal of Ecology* 96: 1117–1127.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP: phylogenetic analysis using parsimony. Version 4.0b. Sinauer Associates, Sunderland, MA, Estados Unidos.
- Sword, G.A., Joern, A., Senior, L.B. 2005. Host plant-associated genetic differentiation in the snakeweed grasshopper, *Hesperotettix viridis* (Orthoptera: Acrididae). *Molecular Ecology*, 14: 2197–2205.
- Taberlet, P., Cheddadi, R. 2002. Quaternary refugia and persistence of biodiversity. *Science* 297: 2009–2010.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123 (3): 585–95
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- Thompson, J.N. 1999. Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. *American Naturalist* 153: S1–S14.
- Toju, H., Sota, T. 2006. Phylogeography and the geographic cline in the armament of a seed-predatory weevil: effects of historical events vs. natural selection from the host plant. *Molecular Ecology* 15: 4161–4173.
- Toju H., Fukatsu, T. 2011. Diversity and infection prevalence of endosymbionts in natural populations of the chestnut weevil: relevance of local climate and host plants. *Molecular Ecology* 20: 853–868.
- Toju, H., Ueno, S., Taniguchi, F., Sota, T. 2011. Metapopulation structure of a seed-predator weevil and its host plant in arms race coevolution. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 65(6): 1707–22.