

1-1-2018

Análisis integrativo del estatus taxonómico de los polinizadores de la palma de corozo (*Acrocomia aculeata*) en la Orinoquía colombiana

Viviana María Laverde Contreras

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>

Citación recomendada

Laverde Contreras, V. M. (2018). Análisis integrativo del estatus taxonómico de los polinizadores de la palma de corozo (*Acrocomia aculeata*) en la Orinoquía colombiana. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/26>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.



**ÁNALISIS INTEGRATIVO DEL ESTATUS TAXONÓMICO DE LOS
POLINIZADORES DE LA PALMA DE COROZO (*Acrocomia aculeata*) EN LA
ORINOQUÍA COLOMBIANA**

VIVIANA MARIA LAVERDE CONTRERAS

**Universidad de La Salle
Departamento de Ciencias Básicas
Programa de Biología
Bogotá, D.C., Colombia
2018**

**ÁNALISIS INTEGRATIVO DEL ESTATUS TAXONÓMICO DE LOS
POLINIZADORES DE LA PALMA DE COROZO (*Acrocomia aculeata*) EN LA
ORINOQUÍA COLOMBIANA**

VIVIANA MARIA LAVERDE CONTRERAS

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga

Tutor (a)

ASTRID MUÑOZ-ORTIZ

Bióloga, M.Sc, Ph.D.

Profesor asociado

Cotutor

LUIS ALBERTO NÚÑEZ-AVELLANEDA

Biólogo, M.Sc, Ph.D.

Profesor asociado

Universidad de La Salle

Departamento de Ciencias Básicas

Programa de Biología

Bogotá, D.C., Colombia

2018

Nota de Aceptación:

Jurado

Jurado

Tutor (a): Astrid Muñoz-Ortiz

Cotutor: Luis Núñez-Avellaneda

Programa de Biología, 2018

CONTENIDO

Lista de Figuras.....	V
Lista de Tablas.....	VI
Resumen.....	7
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Objetivos.....	10
Materiales y métodos.....	10
Resultados.....	13
Discusión.....	23
Conclusiones.....	25
Agradecimientos.....	26
Bibliografía.....	26
Información de soporte.....	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Metodología de estudio de polinizadores de *Acrocomia aculeata*. Fase de Campo: (A) Reconocimiento de las especies de *A. aculeata*, (B) inflorescencia, (C) método de colecta, (D) muestra de insectos. Fase de laboratorio: (E – G) separación de morfotipos, (H) PCR e (I) electroforesis en gel..... 11
- Figura 2:** Morfotipos de la subfamilia Curculioninae. A.) *Andrathobius* morfo 1, B.) *Andrathobius* morfo 2, C.) *Andrathobius* morfo 3 y D.) *Phyllotrox* morfo 1..... 19
- Figura 3:** Morfotipos de la subfamilia Nitidulinae. A.) *Mystrops debilis* y B.) *Mystrops dalmasi*..... 20
- Figura 4:** Gel de electroforesis donde el fragmento del gen mitocondrial COI fue amplificado satisfactoriamente con un peso mayor a los 600 pares de bases..... 21

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1:** Valores del índice de importancia relativa (IRP) como polinizador para los morfotipos de *A. aculeata*. Valores calculados a partir de abundancias relativas en fase femenina (AB) y promedio de la capacidad de transporte de polen (CTP). Eficiencia indicada como: polinizadores principales (POP), eventuales (PEV) y sin participación (NOP)..... **14**
- Tabla 2:** Caracterización morfológica de los morfotipos de la subfamilia Curculioninae. Promedio, desviación estándar de los caracteres: distancia Pronoto + élitros (P+E), rostrum (R), abdomen + Mesotoráx (Ab + MT)..... **16**
- Tabla 3:** Caracterización morfológica de los morfotipos de la subfamilia Nitidulinae. Promedio, desviación estándar de los caracteres: distancia Pronoto + élitros (P+E), Antenas (An), abdomen (Ab)..... **18**
- Tabla 4:** Comparación de secuencias de estudio con las bases de datos *Barcode of Life* y NCBI con la agrupación por el algoritmo *ABGD*. En la columna de *BoldSystems* y NCBI se muestra el porcentaje de identidad (% Iden.), en esta última base de datos se agregan los valores del *Query cover* (%) y probabilidad (*E – value*)..... **22**
- Tabla 5:** Valores del índice de importancia relativa (IRP) como polinizador para los morfotipos de *A. aculeata* resultado del análisis integrativo (caracteres morfológicos y molecular). Estos valores fueron calculados a partir de abundancias relativas en fase femenina (AB) y promedio de la capacidad de transporte de polen (CTP). Eficiencia indicada como: polinizadores principales (POP), eventuales (PEV) y sin participación (NOP)..... **24**

ANÁLISIS INTEGRATIVO DEL ESTATUS TAXONÓMICO DE LOS POLINIZADORES DE LA PALMA DE COROZO (*Acrocomia aculeata*) EN LA ORINOQUÍA COLOMBIANA

RESUMEN

En las plantas, la polinización es un requisito para la reproducción sexual y formación de frutos, para que esta sea exitosa, necesita de vectores que movilicen el polen como los insectos, los cuales son agrupados en diferentes categorías respecto a su rol en la polinización de las plantas que se encuentren asociados. Aunque, existen claves taxonómicas para identificar a muchos de estos polinizadores, estas no abarcan toda la diversidad de morfotipos que es observada, conduciendo a una alta incertidumbre en las estimaciones de su rol en la polinización. Por ello el objetivo de este trabajo fue realizar un análisis integrativo utilizando caracterización morfológica y molecular de los polinizadores de *Acrocomia aculeata*, la cual se caracteriza por tener frutos altamente productivos por sus aceites, los cuales se emplean como materias primas en industrias de alimentos y biocombustibles. Para esto, se visitaron dos localidades en Hato Corozal y Yopal, Casanare (Orinoquía colombiana), donde se realizaron colectas de los insectos en las inflorescencias. Se describieron por medio de caracteres morfológicos los polinizadores de *A. aculeata*, además se amplificó la región del gen mitocondrial COI para identificar las secuencias en las bases de datos *Boldsystems* y NCBI, por otro lado, se utilizó el algoritmo ABGD que agrupa las secuencias de acuerdo a su variación genética de los morfotipos. Se establecieron seis morfotipos polinizadores de *A. aculeata* por el índice IRP y por morfología: (3) *Andranthobius*, (1) *Phyllotrox*, *Mystrops debilis* y *Mystrops dalmasi* todos ellos del Orden Coleoptera. El método molecular arrojó porcentajes de identidad menores a 100% y ABGD encontró 4 *clusters* donde los 3 morfotipos de *Andranthobius* estaban en el mismo grupo a pesar de su alta variación intraespecífica a nivel morfológico. Para los morfotipos de *Phyllotrox* y *Mystrops* son diferentes morfológica y molecularmente por lo cual corrobora el estatus taxonómico de estos insectos. Los resultados obtenidos por los diferentes métodos implementados tanto morfológicos y moleculares, fueron congruentes para *Phyllotrox* y *Mystrops*, demostrando que el uso de la taxonomía integrativa conduce a una acertada aproximación taxonómica de estos insectos polinizadores.

Palabras Clave: *Barcoding*, coleópteros, cantarofilia, inflorescencias, polinización.

ABSTRACT

In plants, the pollination required for sexual reproduction and fruit formation, to make this successful, the plants need vector whom mobilize pollen as the insects, which are grouped in different categories with regard to its role in the pollination of plants that are associated. Although there are taxonomic keys to identify many of these pollinators, these keys do not cover all the diversity of morphotypes that is observed, leading to a high uncertainty in

estimates of its role in pollination. Therefore, the aim of this work was to perform an integrative analysis using morphological and molecular characterization of pollinators of *Acrocomia aculeata*, which is characterized by highly productive fruits for their oils, which are used as raw materials in food industries and biofuels. For this, we visited two locations in Hato Corozal and Yopal, Casanare (Colombian Orinoquia), where there were collections of insects in the inflorescences. They were described by pollinators morphological characters of *A. aculeata*, besides the region of *mtDNA* COI gene was amplified to identify sequences in different databases as *BOLD Systems* and NCBI, furthermore we used the ABGD algorithm comprising sequences according to their genetic variation of the morphotypes. Settled six morphotypes pollinators of *A. aculeata* by morphology and the index IRP: (3) *Andranthobius*, (1) *Phyllotrox*, *Mystrops debilis* and *Mystrops dalmasi*, all them for the order Coleoptera. The molecular method threw less than 100% percentage of identity and ABGD founded 4 clusters, where the 3 morphotypes of genus *Andranthobius* were in the same cluster despite its high intraspecific variation. For the morphotypes of genus *Phyllotrox* and *Mystrops* differ morphologically and molecularly which corroborates the taxonomic status of these insects. These results obtained by the different methods implemented both morphological and molecular, were consistent demonstrating that the use of integrative taxonomy leads to a taxonomic approach of these pollinating insects.

Keywords: *Barcoding*, Coleoptera, entomophily, inflorescences, pollination.

INTRODUCCIÓN

En las angiospermas, la polinización es un requisito para la reproducción sexual y formación de frutos (1, 2). Para que la polinización sea exitosa, algunas plantas deben proveer recursos como néctar, polen y tejido floral, esto con el fin de atraer organismos como aves, mamíferos e invertebrados, los cuales son polinizadores o vectores que movilizan el polen y promueven la fecundación de las flores (3). Dentro de estos vectores naturales se encuentran insectos como abejas, moscas y coleópteros, que contribuyen positivamente al éxito reproductivo de plantas con intereses productivos los cuales ya son cultivos a gran escala (4), como diferentes especies de legumbres (Fabaceae), frutas dulces (Rosaceae) (3, 5, 6) y cítricas (Rutaceae) (7) las cuales se encuentran principalmente asociadas a los dos primeros grupos de insectos, mientras que especies de las familias de la chirimoya (Annonaceae) y las palmas (Arecaceae) con especies del orden Coleoptera (8, 9).

Dentro de esta última familia se encuentra el Corozo (*Acrocomia aculeata*), es una palma endémica de Brasil y posee una distribución en Centroamérica y la mayoría de países sudamericanos exceptuando Ecuador y Perú (10). El Corozo es una palma silvestre que aún no ha sido domesticada en Colombia (11), sin embargo, en Brasil se ha iniciado su establecimiento como sistema productivo (12), debido a su alto potencial económico (13). Dado a que sus frutos contienen gran cantidad de aceites que son explotados en las industrias de alimentos, biocombustibles y cosméticas (10, 14, 15). En cuanto a biología reproductiva se conoce que *A. aculeata* es una palma con dicogamia marcada tipo protógina, dependiente

de insectos específicamente del orden Coleoptera para fertilizar sus flores y formar frutos, esto ha sido reportado en Brasilia (16) y Minas Gerais (10, 17). A pesar, de la importancia de estos polinizadores en el flujo de polen, su identificación taxonómica no ha sido sencilla, dado que, las claves taxonómicas no son suficientes o completas para distinguir la variación morfológica observada en estos insectos polinizadores de esta importante palmera.

Los estudios sobre polinizadores, específicamente en insectos, han ido en aumento durante los últimos años en diferentes familias de plantas (18–21). Estos estudios han propuesto que estos organismos pueden ser agrupados en diferentes categorías de acuerdo a su papel en la fertilización de las flores. Esto es estimado mediante el porcentaje de participación en la polinización, valor que es calculado a partir de datos de carga de polen y abundancia en la fase reproductiva femenina (22–24). Aunque para el Neotrópico existen claves taxonómicas para identificar a muchos de estos polinizadores (25–28), estas no abarcan toda la diversidad de morfotipos que es observada, conduciendo a altos índices de incertidumbre en las estimaciones de su rol en la polinización. Las dificultades en la identificación se deben principalmente a: i) la alta variación morfológica intraespecífica (por ejemplo en coloración, antenas y tamaños), que puede conducir a una sobreestimación de especies (29) y por otro lado, ii) a la baja variación morfológica entre especies, que conduce a una subestimación dada a la cripsis (30).

Estas dificultades, han llevado a proponer que para dilucidar de manera más concreta el estatus taxonómico de las especies, la determinación taxonómica debe ser abordada desde un punto de vista integrativo (31), es decir, acompañar la taxonomía tradicional (caracteres morfológicos), con otros caracteres como por ejemplo los moleculares el cual utiliza marcadores moleculares como el fragmento del gen Citocromo oxidasa sub unidad I (COI), que en las últimas décadas ha sido propuesto como un *Barcode* o código de barras en la identificación a nivel molecular en animales (32). Este fragmento del genoma mitocondrial posee una baja variación intraespecífica y alta interespecífica, que permite diferenciar entre especies con mayor certeza (32, 33), para así mejorar y precisar el estatus taxonómico de las especies ya que es fundamental para suplir esta incertidumbre a la hora de identificar a las especies (34). Casos en Colombia evidencian el uso de la implementación de caracteres moleculares para establecer categorías taxonómicas, desde un punto de vista integrativo han sido reportados para algunos taxa del orden Coleoptera, en el eje cafetero para individuos del género *Heilipus* (Curculionidae) asociados al aguacate (35) y para el género *Pleophylla* (Nitidulidae) en Sudáfrica (36).

La implementación de la taxonomía integrativa en especies de insectos polinizadores aun es escasa. Por otro lado, se ha utilizado en algunas especies que presentan riesgo para los cultivos de plantas de importancia económica como la palma de coco (*Cocos nucifera*). En este caso, los individuos del Orden Coleoptera, asociados al consumo del pseudotallo en el cual desarrollan gran parte de su ciclo de vida, presentan una alta variación en su patrón de coloración y se clasifican morfológicamente en especies diferentes (37). Sin embargo, estudios con las secuencias de códigos de barras de estos individuos, aportaron evidencia de

lo contrario, es decir que a pesar de la alta variación morfológica a nivel de patrón de coloración, las diferencias a nivel molecular pueden ser explicadas por variación intraespecífica evidenciando que todos los individuos son de la especie *Rhynchophorus ferrugineus* (38).

En Colombia el estudio de insectos polinizadores, especialmente para palmas, ha aumentado alrededor de hace tres décadas (8, 39). Estos estudios han evidenciado que especies de insectos de las sub familias Curculioninae (con géneros *Andranthobius* y *Phyllotrox*) y Nitidulinae (con el género *Mystrops*) predominan como polinizadores de las palmas en el Neotrópico (8). Dada la importancia de identificar los polinizadores en sistemas productivos como las palmas, este trabajo implementó el uso de caracteres morfológicos y moleculares para confirmar el estatus taxonómico de los polinizadores de la especie *A. aculeata*. Dado que esta palma tiene un alto potencial productivo que radica en su fruto (10, 14, 15) por lo que también se estimó a partir de esta identificación, la contribución de estas especies a la polinización del Corozo en la Orinoquía colombiana. Los resultados de este trabajo no darán pautas directas de cómo generar un aprovechamiento y manejo sostenible de *A. aculeata*, pero sí podrán ser tomados como base para que científicos y agricultores interesados en esta palma puedan elaborar planes de uso sostenible, conservación de esta palma y de sus polinizadores.

OBJETIVOS

General

Determinar de manera integrativa el estatus taxonómico de los polinizadores de la palma de Corozo (*Acrocomia aculeata*) en la Orinoquía colombiana.

Específicos

1. Determinar morfotipos polinizadores de la palma de Corozo (*Acrocomia aculeata*) en la Orinoquía colombiana
2. Caracterizar morfológicamente los morfotipos polinizadores de la palma de Corozo (*Acrocomia aculeata*) en la Orinoquía colombiana
3. Caracterizar molecularmente los morfotipos polinizadores de la palma de Corozo (*Acrocomia aculeata*) en la Orinoquía colombiana

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Las colectas se realizaron en dos poblaciones del departamento de Casanare Orinoquía colombiana. La primera población se localiza sobre el kilómetro 12 de la vía Yopal-Manantiales (Hacienda Matepantano, sede Utopía, Universidad de La Salle; 5°19'13.4" N - 72°17'47.4" W) y la segunda en la vereda Aricaporo en el municipio de Hato Corozal

(Hacienda La Macarena; 6°01'59.8" N - 71°50'38.3" W) el hábitat característico de estas zonas son los bosques de galería, sabanas inundables y sabanas modificadas para actividades agrícolas y ganaderas (40).

Diseño experimental

Para la obtención de los insectos polinizadores se visitaron 15 inflorescencias en fase femenina de *A. aculeata* florecidas con yemas florales recién abiertas, se buscaron y se seleccionaron de manera aleatoria en sabanas y bordes de parches de bosque (Figura 1A y 1B). Las colectas se realizaron durante dos periodos reproductivos en los meses de enero y febrero (2017 – 2018), durante la noche (19:00 – 22:00h), una vez ubicada la inflorescencia se accedió a ellas mediante escaleras o extensores metálicos de acuerdo a su altura las inflorescencias, se envolvieron en bolsas plásticas (80 x 100 cm) y con fuertes sacudidas los insectos cayeron en ellas (Figura 1C – 1D), sin necesidad de cortar alguna inflorescencia de la palma. Las muestras fueron preservadas en alcohol al 96%, y llevadas a los laboratorios del programa de Biología de la Universidad de La Salle donde se separaron los residuos florales de los insectos (Figura 1E – 1G).

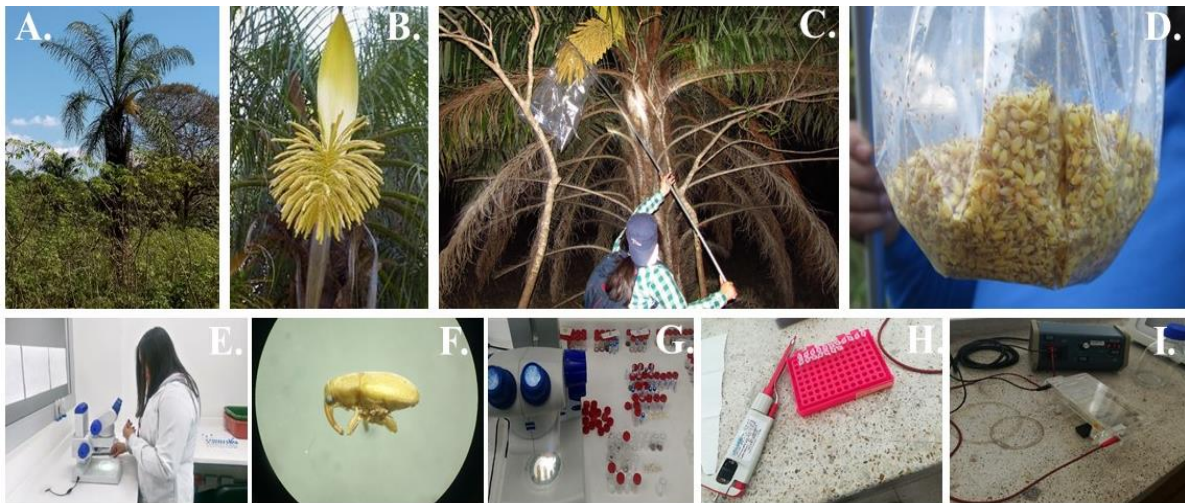


Figura 1: Metodología de estudio de polinizadores de *Acrocomia aculeata*. Fase de Campo: (A) Reconocimiento de las especies de *A. aculeata*, (B) inflorescencia, (C) método de colecta, (D) muestra de insectos. Fase de laboratorio: (E – G) separación de morfotipos, (H) PCR e (I) electroforesis en gel. Fotos: Viviana Laverde

Determinación del rol en la polinizadores de *A. aculeata*

Esto se realizó para establecer los morfotipos polinizadores y aplicar los dos métodos de caracterización taxonómica, para ello se estimó el porcentaje de participación de estos insectos en la polinización de *A. aculeata*, por medio del cálculo del índice de importancia relativa como polinizador (IRP) (23). La estimación de este índice requirió del conteo del número de individuos por morfotipo en la fase femenina (abundancia – AB) y de la cantidad

de granos de polen que cargan (CTP). Esta última fue estimada con ayuda de un microscopio, después de la centrifugación de 14 individuos por morfotipo en alcohol 96% (24). Para el cálculo del índice se siguió la ecuación $IRP = ((AB*CTP) / \sum(AB*CTP) * 100\%)$, los valores obtenidos permiten agrupar a los polinizadores en 4 categorías: principales ($IRP \geq 10\%$), copolinizadores ($5\% \leq IRP < 10\%$), eventuales ($1\% \leq IRP < 5\%$) y sin participación ($IRP < 1\%$) (41), por lo cual se generó una tabla con cada variables de los diferentes morfotipos polinizadores para las dos caracterizaciones empleadas.

Caracterización morfológica de los polinizadores

Con ayuda del índice IRP, los polinizadores se clasificaron por medio del índice IRP, se clasificaron taxonómicamente de acuerdo a los caracteres diagnósticos de cada una de las subfamilias Curculioninae y Nitidulinae ya reportadas en estudios previos de polinizadores de *A. aculeata* en Brasil (16, 17, 42), los cuales se visualizaron con ayuda de un estereoscopio ZEISS Stemi 305. Los caracteres para Curculioninae incluyeron la presencia de la proyección de su rostro (Rostrum) (27, 43) y para Nitidulinae fueron observados la forma del cuerpo y antenas (28). Posteriormente, ya separados los morfotipos de las dos subfamilias, se determinaron las variantes morfológicas que presentaban variación en longitud de antenas, patrón de coloración, longitud de la proyección del rostrum y tamaño del cuerpo. Las medidas de tamaño se tomaron mediante el software ImageJ 2.38 y se utilizó estadística descriptiva para (44) con un total de 10 individuos por morfotipo. Cabe resaltar que para esta caracterización no se tuvo en cuenta la genitalia de los morfotipos. De acuerdo a los resultados se generó una descripción y una tabla para cada morfotipo de las dos subfamilias con la variación de las medidas de los caracteres estudiados.

Caracterización molecular de los polinizadores

Para esta caracterización se utilizaron dos individuos por morfotipo establecidos en la caracterización morfológica y se realizó en tres fases:

(I) Extracción, amplificación y limpieza

El ADN genómico fue aislado mediante el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue, siguiendo el protocolo del fabricante (Quiagen, Valencia, EE. UU.). Posteriormente el segmento *BarCode* COI, fue amplificado para cada uno de los individuos, con la técnica reacción en cadena de polimerasa (PCR) **ver condiciones de la reacción en el Anexo 1**. Dos combinaciones de *primers* fueron empleadas para estas reacciones, la primera fue LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (45) y la segunda: dgLCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGAYATYGG-3') y dgHCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAARAAYCA-3') (46). Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de electroforesis (Figura II) y posteriormente los tubos con los todos los reactivos PCR fueron enviados para secuenciación por el método de Sanger, a los

laboratorios de Macrogen, Korea (www.macrogen.com/ko/main/index.php), donde además fueron limpiados y purificados. Los electroferogramas resultado de la secuenciación fueron editados en el software Geneious 11.1.3 (47). Las secuencias consenso fueron alineadas inicialmente con el algoritmo de alineamiento múltiple MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>) y verificado al ojo, realizando la traducción de ADN a proteína en el software *Bioedit* (48).

(II) Identificación molecular

La identificación se realizó comparando las secuencias obtenidas, con las disponibles en la base de datos *Barcode of Life Data Systems* (http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine) y en contraste con lo encontrado por la base anterior, se utilizó la base de datos *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), donde ambas emplean el algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool*-BLAST (49, 50) que establece el porcentaje de los *Query covers* y el *E – value* para tener un mayor soporte en las comparaciones dado que esto sólo se encuentra disponible en la base de datos de NCBI. En caso de no encontrar porcentajes de identidad del 100% con individuos de la base, para llegar a una clasificación certera aproximada, por eso se seleccionó el taxa más asociado de acuerdo con el porcentaje de identidad más alto que el algoritmo arrojó para los morfotipos y así encontrar una aproximación taxonómica de estos polinizadores.

(III) Taxonomía integrativa

Se utilizó el algoritmo *Automated Barcode Gap Discovery* o *ABGD* (<http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>). Este análisis no permite la identificación taxonómica directa, pero si agrupa las secuencias dentro de *clusters* de acuerdo a la evaluación de la variación genética intra o interespecífica. Para este análisis se utilizaron los siguientes parámetros *a priori*: el modelo de sustitución Kimura dos parámetros (K2P) propuesto para COI (51), valor máximo de divergencia intraespecífica entre 0.001 y 0.1 y un ancho de gap de 1.0 obtenido en un estudio previo en especies de la Familia Nitidulidae (36) y así poder encontrar una aproximación taxonómica con lo encontrado por el método tradicional (caracteres morfológicos). Los resultados permiten hacer asociaciones y comparaciones entre los resultados obtenidos a partir de datos morfológicos y las agrupaciones a nivel genético de ABGD.

RESULTADOS

Caracterización morfológica de los polinizadores

El índice IRP permitió establecer seis morfotipos del orden Coleoptera (Tabla 1). Cuatro morfotipos pertenecen a la sub familia Curculioninae, donde tres de ellos pertenecen al género *Andranthobius*, un morfotipo del género *Phyllotrox*, ninguno de ellos se logró llegar

a un epíteto específico dada su alta variación morfológica en el patrón de coloración (Figura 2A – 2D), Rostrum y abdomen (Tabla 1). Para la segunda subfamilia, Nitdulinae, se establecieron dos morfotipos (Figura 3A – 3B) correspondientes a dos morfotipos del género *Mystrops* (Tabla 2). A continuación se muestra la descripción de los caracteres que más variación morfológica presentaban los morfotipos polinizadores de cada una de las dos subfamilias.

Tabla 1: Valores del índice de importancia relativa (IRP) como polinizador para los morfotipos de *A. aculeata*. Valores calculados a partir de abundancias relativas en fase femenina (AB) y promedio de la capacidad de transporte de polen (CTP). Eficiencia indicada como: polinizadores principales (POP), eventuales (PEV) y sin participación (NOP).

Morfotipo	AB	CTP	IVIP	(%) IRP	Eficiencia
<i>Adranthobius</i> morfo 1	18685	3292	61511020	47.5	POP
<i>Mystrops</i> morfo 1	14208	2696	38304768	29.5	POP
<i>Adranthobius</i> morfo 2	5551	2442	13555542	10.4	POP
<i>Phyllotrox</i> morfo 1	7081	1415	10019615	7.7	COP
<i>Adranthobius</i> morfo 3	2047	1213	2483011	1.9	PEV
<i>Mystrops</i> morfo 2	3237	448	1450176	1.1	PEV

Subfamilia Curculioninae

Dado que estos morfotipos no fue posible llegar hasta el nivel de especie, se muestra a continuación la descripción de aquellos caracteres que diferenciaban (descripción de caracteres) y cuantitativa (Tabla 2) a cada uno de los morfotipos de esta subfamilia.

***Adranthobius* morfo 1**

Rostrum: Inicia en medio de sus ojos en la base de su cabeza, vista lateral dorsalmente arqueado en dirección a la parte ventral de cuerpo, en la base de este se encuentra rodeado de pequeñas vellosidades y su coloración es más oscura que el resto del Rostrum.

Pronoto: Esta sección es más ancha que la cabeza. Se observan suturas de separación de la cabeza y el mesotoràx (parte ventral). La base del pronoto es una línea recta, sus bordes laterales son cóncavos hasta la región media, posee pequeñas vellosidades en el pronoto que poseen una dirección dentro de la misma que van desde el centro a la base superior del pronoto.

Élitros: Presenta estrías formadas por pequeñas punciones de coloración marrón oscura a lo largo de los mismos, además la sutura que separa los dos élitros presenta la misma coloración.

Abdomen: En los ventrículos I y II son anchos, en comparación con los finales, que terminan en línea recta y delgada terminando al final o la mitad de los élitros, los márgenes laterales terminan de forma convexa.

Andranthobius morfo 2

Rostrum: Inicia en medio de sus ojos en el ápice de su cabeza, en vista lateral parcialmente arqueado y grueso. En su ápice se encuentra rodeado de pequeñas vellosidades, la base inferior del rostrum presenta una coloración más oscura que el resto de la sección.

Pronoto: Similar con el morfotipo anterior, es más ancha que la cabeza con márgenes laterales convexos desde la base a la región media allí se encuentra una inflexión hasta el ápice de este. Presenta vellosidades en sus bordes como en el centro del pronoto, donde estas vellosidades tienen dirección y convergen desde los bordes hasta la región media del pronoto. En la parte posterior (parte ventral) del pronoto encontramos en protórax posee dos procoxas que tienen los trocánteres que dan paso al fémur de los apéndices del insecto, no se observan suturas en sus costados.

Élitros: Presenta estrías formadas por pequeñas punciones que van a lo largo de los élitros se encuentra rodeado por pequeñas vellosidades. En medio de la sutura de los élitros se observa el estriolo muy marcado.

Abdomen: presenta características similares al anterior morfotipo de este género. El abdomen en los ventrículos I y II son anchos, en comparación con los finales, que terminan en línea recta y delgada terminando al final o la mitad de los élitros.

Andranthobius morfo 3

Rostrum: Inicia en medio de sus ojos en el ápice de su cabeza, en vista lateral dorsalmente arqueado, grueso en su ápice se encuentra rodeado de pequeñas vellosidades.

Pronoto: Sección más ancha que la cabeza. Se observa la sutura de separación de la cabeza con el mesotórax (parte ventral). Los márgenes laterales se encuentran rodeados por pequeñas vellosidades, en el pronoto las vellosidades convergen desde los bordes laterales hacia la región media del mismo. En la parte ventral del pronoto se encuentran dos procoxas en la región media de la base inferior de esta sección del cuerpo, en el centro de estas procoxas se encuentran los trocánteres que sostienen el fémur de los apéndices del insecto.

Élitros: anchos presentan vellosidades en los márgenes laterales, presenta estrías formadas por punciones desde la base hasta el ápice de estos

Abdomen: presenta características similares a los anteriores dos morfotipos de este género. El abdomen en los ventrículos I y II son anchos, en comparación con los finales, que terminan en línea recta unos morfotipos bordean el abdomen con los élitros y en otros el abdomen no llega a cubrir los élitros.

***Phyllotrox* morfo 1.**

Rostrum: Inicia en medio de sus ojos en el ápice de su cabeza, en vista lateral dorsalmente arqueado, grueso en su ápice se encuentra rodeado de pequeñas vellosidades. Presenta una curvatura con dirección a la parte ventral de cuerpo.

Pronoto: con márgenes convexos, con vellosidades en dirección a la región media de este. En la parte posterior (parte ventral) del pronoto encontramos la sección del protórax está compuesto por dos procoxas que sostiene los apéndices, estas procoxas las rodean unas suturas de coloración oscura.

Élitros: presenta estrías a lo largo de los élitros, compuestas por pequeñas punciones de coloración más oscura que el resto de su cuerpo, en sus bordes laterales presentan vellosidades, el estriolo está muy bien marcado en medio de la sutura de los dos élitros.

Abdomen: está compuesto por 5 segmentos, siendo el segmento I el de mayor longitud, los últimos tres segmentos son delgados y con la misma longitud; siendo el último segmento (V) que termina en forma convexa delimitando el borde de los élitros. Los segmentos finales del abdomen varían entre morfotipos ya que, en algunos morfotipos terminan en línea recta y delgada y otros terminan en punta bordeando los élitros.

Tabla 2: Caracterización morfológica de los morfotipos de la subfamilia Curculioninae. Promedio, desviación estándar de los caracteres: distancia Pronoto + élitros (P+E), rostrum (R), abdomen + Mesotoráx (Ab + MT).

Morfotipo	Cuantitativo			Cualitativo
	Longitud (mm) - (\pm)SD			Coloración
	P + E	R	Ab + MT	
<i>Andranthobius</i> morfo 1	2.682 (\pm 0.289)	1.14 (\pm 0.124)	1.72 (\pm 0.044)	Marrón claro
<i>Andranthobius</i> morfo 2	2.396 (\pm 0.188)	1.169 (\pm 0.093)	1.673 (\pm 0.088)	
<i>Andranthobius</i> morfo 3	2.299 (\pm 0.129)	0.981 (\pm 0.105)	1.561 (\pm 0.076)	
<i>Phyllotrox</i> morfo 1	1.382 (\pm 0.088)	0.386 (\pm 0.05)	0.875 (\pm 0.078)	Café oscuro

Subfamilia Nitidulinae

Dado que para estos morfotipos polinizadores se logró llegar hasta el nivel de especie con la ayuda de clave taxonómica, se muestra la caracterización cualitativa (descripción de caracteres) y cuantitativa (Tabla 3) de aquellos caracteres que variaron entre individuos del mismo morfotipo.

Mystrops debilis

Pronoto: Esta sección es un poco más ancha que la cabeza. Se observan las suturas de separación de la cabeza y el mesotórax (parte ventral). Los márgenes laterales son arqueados, con vellosidades que no poseen dirección dentro del pronoto. Los márgenes laterales poseen una coloración más oscura que el resto del pronoto. Posee pequeñas vellosidades de coloración oscura que no convergen ni poseen dirección dentro del pronoto. En la parte posterior del pronoto conocida como el protórax posee dos procoxas (sostienen los apéndices del insecto) en medio de la base inferior próximas a la sutura mesotorácica, no se observan suturas en sus costados laterales, en el centro del protórax.

Élitros: No poseen estrías. Sus bordes tanto en la base como en los costados presentan coloraciones más oscuras que el resto de su cuerpo. El escudete se encuentra muy bien marcado de forma triangular en la base superior de los élitros en medio de la sutura que separa estos élitros.

Antenas: El escapo es la primera sección que conforman las antenas, es uno de los segmentos más largos y robustos de la antena. El funículo segunda sección de la antena está compuesta por VII segmentos los cuales tienen la misma longitud, la clava última sección de la antena presenta tres segmentos y robusta en forma de gota. Se extienden hasta la base inferior de los élitros.

Abdomen: Se encuentra un espacio entre el pronoto y el comienzo de los élitros, presenta el ventrículo I más ancho que los siguientes, el segmento final termina en punta o en línea convexa y sobrepasa los élitros

Apéndices: El fémur, es la parte más robusta de los apéndices sus bordes son convexos y la de mayor longitud, está rodeado por vellosidades. La tibia es delgada a comparación del fémur, en la base inferior se encuentra en peine con gran cantidad de vellosidades y dos espolones (puntas) que sobresalen de la misma.

Mystrops dalmasi

Pronoto: Esta sección es un poco más ancha que la cabeza. Se observan las suturas de separación de la cabeza y el mesotórax (parte ventral). En sus costados se observan bordes convexos estos presentan una coloración más oscura que el resto del pronoto y los élitros, posee vellosidades de coloración negra alrededor del pronoto ninguna de estas vellosidades posee una dirección o convergen dentro del pronoto. En la parte posterior del pronoto

conocida como el protórax posee dos procoxas en medio de la base inferior próximas a la sutura mesotorácica, no se observan suturas en sus costados laterales, en el centro del protórax se observan parches de coloración blanca.

Élitros: no poseen estrías, cubre gran parte del abdomen, posee vellosidades en los bordes laterales de estos. Al final de los élitros, se observa el perigidio de forma triangular posee vellosidades en su punta.

Antenas: El escapo es la primera sección que conforman las antenas, es uno de los segmentos más largos y robustos de la antena. El funículo segunda sección de la antena está compuesta por VII segmentos los cuales tienen la misma longitud, la clava última sección de la antena presenta tres segmentos y robusta en forma de gota. Toda la antena se encuentra cubierta por pequeñas vellosidades de coloración oscura. Se extienden hasta la base del pronoto e inicio de los élitros

Abdomen: Presenta el ventrículo I más ancho que los siguientes, el segmento final termina en punta, o cóncavo varía entre morfotipos.

Apéndices: El fémur, es la parte más robusta de los apéndices sus bordes son convexos, está rodeado por vellosidades. La tibia es delgada a comparación del fémur, en la base inferior se encuentra en peine con gran cantidad de vellosidades y dos espolones (puntas) que sobresalen de la misma. El tarso está compuesto por 5 tarsómeros siendo el I a IV poseen la misma longitud, el tarsómero V es el de mayor longitud que posee al final de este las uñas.

Tabla 3: Caracterización morfológica de los morfotipos de la subfamilia Nitidulinae. Promedio, desviación estándar de los caracteres: distancia Pronoto + élitros (P+E), Antenas (An), abdomen (Ab).

Morfotipo	Cuantitativo			Cualitativo
	Longitud (mm) - (\pm)SD			Coloración
	P + E	An	Ab	
<i>Mystrops debilis</i>	1.911 (\pm 0.079)	1.926 (\pm 0.342)	1.409 (\pm 0.142)	Marrón claro
<i>Mystrops dalmasi</i>	1.84 (\pm 0.111)	1.01 (\pm 0.217)	1.18 (\pm 0.155)	

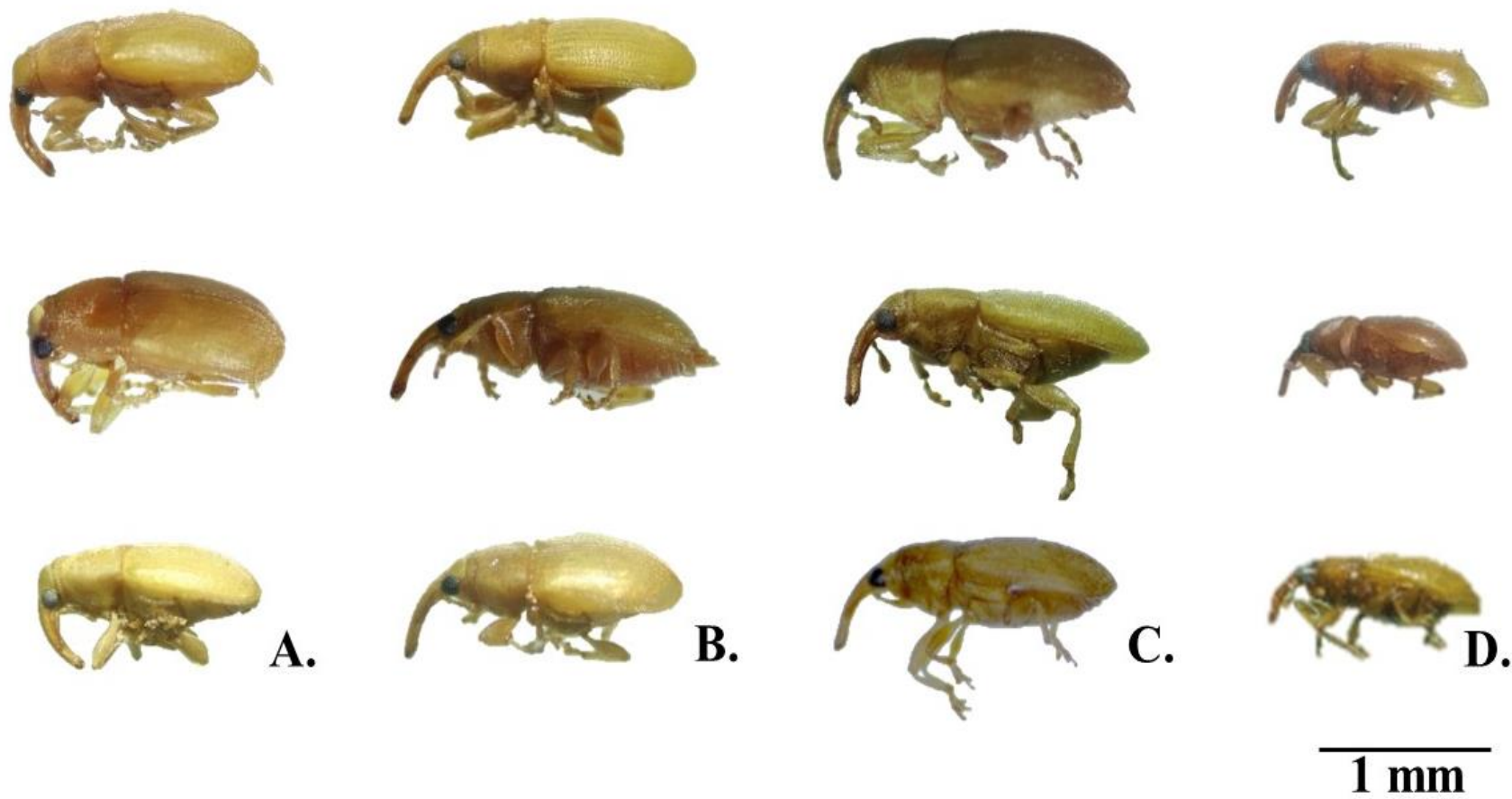


Figura 2: Morfotipos de la subfamilia Curculioninae. A.) *Andrathobius* morfo 1, B.) *Andranthobius* morfo 2, C.) *Andranthobius* morfo 3 y D.) *Phyllotrox* morfo 1. Fotos: Viviana Laverde.

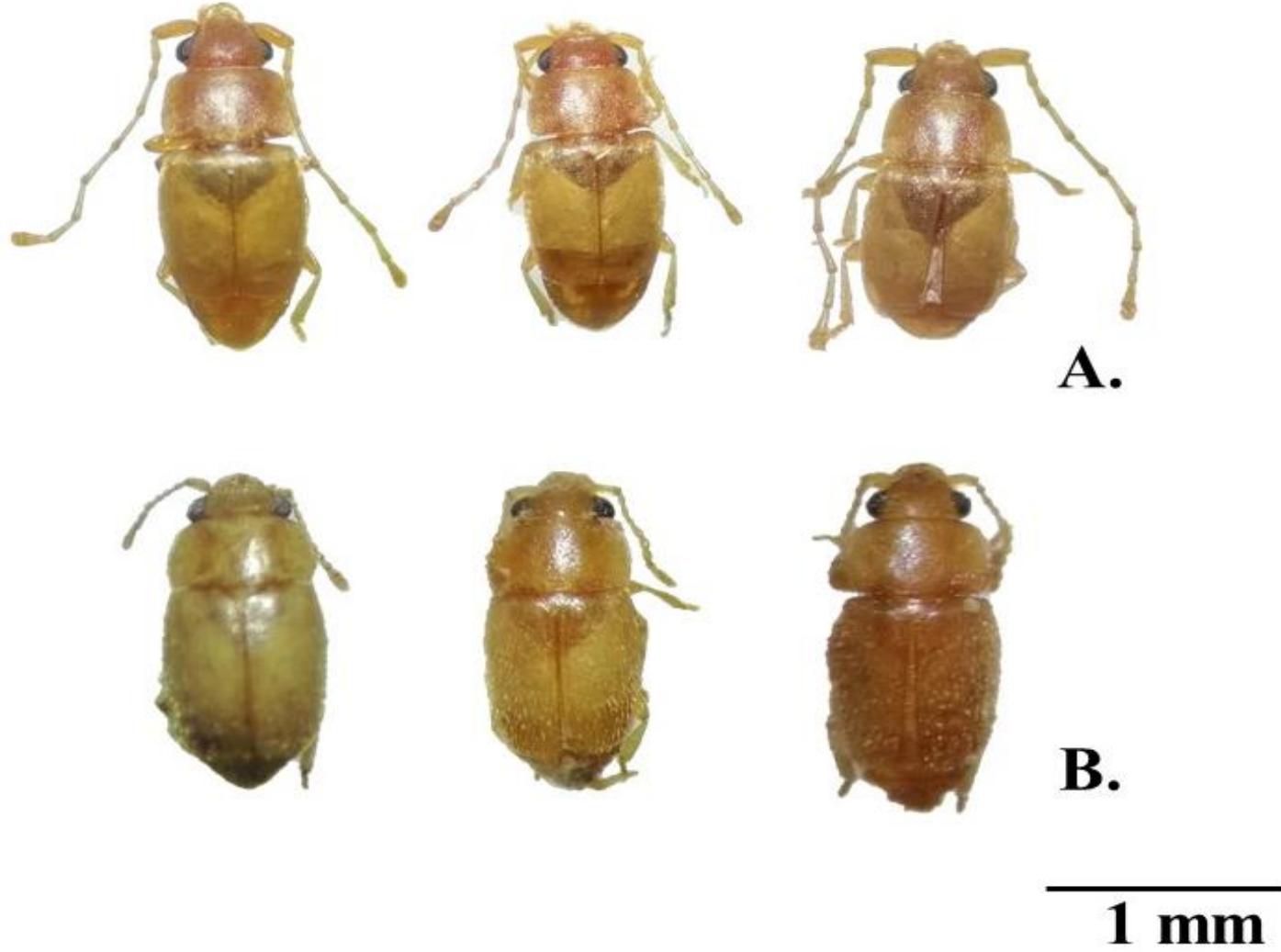


Figura 3: Morfotipos de la subfamilia Nitidulinae. A.) *Mystrops debilis* y B.) *Mystrops dalmasi*. Fotos: Viviana Laverde.

Caracterización molecular de los polinizadores

El análisis molecular incluyó dos individuos de los seis morfotipos polinizadores de *A. aculeata*, los cuales se logró obtener secuencias de una longitud de 658pb (Figura 4) de una región parcial del fragmento del gen Citocromo oxidasa sub unidad I (COI): *Andranthobius* sp.1 y sp. 2, *Phyllorox* sp y *Mystrops dalmasi*. Por otro lado, para los morfotipos *Andrnathobius* sp. 3 y *Mystrops debilis* sólo fue posible emplear un individuo (Tabla 4). Al comparar las secuencias con las bases de datos *Barcode of life* y NCBI, ninguna de ellas obtuvo un 100% de identidad (Tabla 3), dejando claro que estas secuencias no se encuentran reportadas para estas especies en esta base. Sin embargo, la comparación con los taxa más cercanos corroboró que los individuos asociados a los morfotipos del género *Andranthobius* y *Phyllotrox* están asociados a la Familia Curculionidae, mientras que los morfotipos del género *Mystrops* fueron asociados a la Familia Nitidulidae, como se esperaba en la comparación con cada una de las dos bases de datos utilizadas.

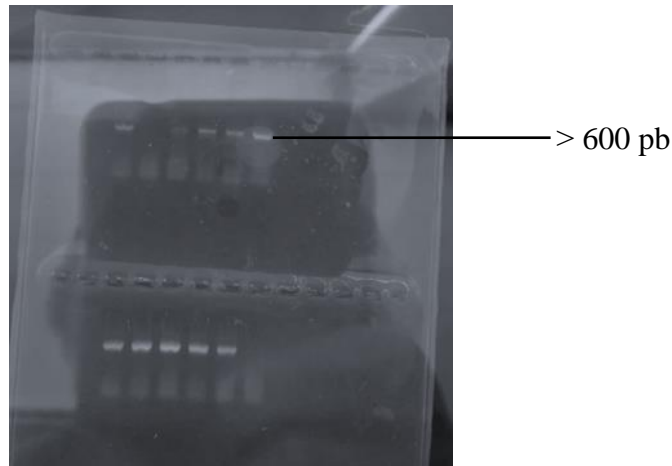


Figura 4: Gel de electroforesis donde el fragmento del gen mitocondrial COI fue amplificado satisfactoriamente con un peso mayor a los 600 pares de bases. Foto: Viviana Laverde.

Taxonomía integrativa

El algoritmo *ABGD* agrupó las secuencias del gen COI de este estudio en cuatro *clusters* (Tabla 3). Donde los individuos de los tres morfotipos del género *Andranthobius*, clasificados por el método tradicional fueron asignados a un mismo *cluster*, A (Tabla 4). Este resultado establece que estos individuos son del mismo grupo taxonómico o especie, a pesar de su variación intraespecífica a nivel morfológico y baja a nivel molecular. Los individuos de género *Phyllotrox* fueron agrupados dentro del *cluster* B. Adicionalmente, los dos morfotipos asignados al género *Mystrops* fueron asignados a diferentes *clusters* C y D respectivamente, estos resultados corroboran el estatus taxonómico de estos insectos, siendo estos últimos tres morfotipos congruentes con la caracterización morfológica.

Tabla 4: Comparación de secuencias de estudio con las bases de datos *Barcode of Life* y NCBI con la agrupación por el algoritmo *ABGD*. En la columna de *BoldSystems* y NCBI se muestra el porcentaje de identidad (% Iden.), en esta última base de datos se agregan los valores del *Query cover* (%) y probabilidad (*E – value*).

Clasificación taxonómica tradicional	<i>BoldSystems</i>				NCBI						Cluster <i>ABGD</i>
	Orden	Suborden	Familia	(%) Iden.	Orden	Suborden	Familia	(%) Iden .	(%) <i>Query cover</i>	<i>E – value</i>	
<i>Andranthobius</i> morfo 1	Coleoptera	Polyphaga	Curculionidae	96.18	Coleoptera	Polyphaga	Curculionidae	84	100	0.0	A
<i>Andranthobius</i> morfo 1				96.33				85	100	0.0	
<i>Andranthobius</i> morfo 2				96.33				85	100	0.0	
<i>Andranthobius</i> morfo 2				96.33				85	100	0.0	
<i>Andranthobius</i> morfo 3				96.33				85	100	0.0	
<i>Phyllotrox</i> morfo 1				87.52				87	99	0.0	
<i>Phyllotrox</i> morfo 1			87.52	87			99	0.0			
<i>Mystrops debilis</i>			Nitidulidae	87.32			86	100	0.0	C	
<i>Mystrops dalmasi</i>				86.39			85	99	0.0	D	
<i>Mystrops dalmasi</i>				86.83			85	99	0.0		

DISCUSIÓN

Debido a que *Acrocomia aculeata* es un palma protógina, donde abren primero las flores femeninas y luego las masculinas y se ha demostrado que no existe la posibilidad de autogamia (16, 52), por lo cual la xenogamia obligada se convierte en la principal estrategia de reproducción de esta especie de palma (17). Debido a esto, diferentes autores han reportado que las especies *Andrathobius* sp., *Mystraps debilis* y *Phyllotrox* sp. son polinizadores efectivos de *A. aculeata* (16, 17, 42), lo cual concuerda con nuestros resultados de la caracterización morfológica (Tabla 1, 2 y 3), además la abundancia en los dos periodos reproductivos que se utilizó para este estudio fue constante. Para palmas protóginas como *A. aculeata* se ha reportado que sus polinizadores comúnmente son coleópteros de las Familias Curculionidae y Nitidulidae (53, 54) y en diferentes casos como: *Manicaria saccifera* (55), *Socratea exorrhiza* (56) seguido de los géneros *Astrocaryum* (57, 58) y *Bactris* (59–61). Más aún, se ha demostrado que estos insectos realizan su ciclo de vida dentro de las inflorescencias, lo que sugiere una asociación de mutua dependencia de estos insectos con la palma donde ambos se benefician, ya que los polinizadores tienen un lugar para llevar su ciclo de vida y la palma asegura su reproducción gracias al polen que lleva el polinizador (62–65).

Dada la importancia de estos insectos y su rol en la polinización en diferentes especies de palmas, se implementó el método integrativo de caracterización taxonómica a los seis morfotipos polinizadores de *A. aculeata*. Al implementar el método de caracterización morfológica para los seis morfotipos se logró llegar hasta el nivel de género en la subfamilia Curculioninae y a especie en Nitidulinae (Tabla 2 y 3), sin embargo no se pudo llegar a un epíteto específico en la primera subfamilia debido a la alta variación morfológica presentada en el género *Andranthobius* (Figura 1A – 1C), donde el patrón de coloración y Rostrum “picos” van cambiando gradualmente en estado adulto (27, 35, 64, 66). Esta variación puede ser atribuida a la competencia en el nicho y las presiones que están en el mismo (67–72), por ejemplo tener más curvo el pico para perforar los botones florales y ovopositar de manera más eficiente (64, 73). Otra explicación a la variación morfológica, es la posibilidad de dimorfismo sexual como diferencias en el tamaño corporal y longitud de antenas (Figura 2A – 2B) para favorecer la selección sexual y el cortejo, la cual ha sido reportado para otros insectos filogenéticamente cercanos (29, 31, 74). Casos como el de la tribu *Mystropini* (Nitidulidae) asociados a inflorescencias de palmas (28) y *Acalyptini* (Curculionidae) en *Cyclanthaceae* (26), donde presentan diferencias en las variables anteriormente mencionadas, ya que estos son factores que dificultan la identificación taxonómica tradicional de estos insectos y entender su rol en la polinización. Estos últimos resultados dejan claro que el establecimiento del estatus taxonómico de las especies es fundamental para entender en este caso su participación en la polinización, lo cual se requiere realizar de manera más detallada la caracterización morfológica para tener en cuenta la

diferenciación de sexos en los individuos del orden Coleoptera ya que es muy variable y así conservarlos para optimizar la fertilización de las flores y la formación de frutos en cultivos a gran escala de plantas con intereses productivos.

El análisis molecular mostró valores de identidad menores al 100% (Tabla 4) (49), dejando en manifiesto que aún no se cuentan con secuencias de estos morfotipos en las bases de datos y que los resultados de este trabajo son los primeros reportes en *BoldSystems* y en NCBI. Estos resultados no son sorprendentes dado que las bases de datos moleculares se encuentran en continua retroalimentación y los resultados están sujetos a la información que previamente ha sido registrada en ellas (75, 76). Aunque, este marcador molecular para estos grupos taxonómicos han sido implementados previamente, estos han sido enfocados dentro de contextos filogeográficos (71, 77–79), y no han sido usados desde un punto de vista taxonómico. Esta observación hace muy valiosos los resultados obtenidos en este estudio, dado que resalta la importancia de aumentar los esfuerzos para el estudio a nivel molecular, no solo de estos organismos que son fundamentales en la polinización de *A. aculeata*, sino también en otros insectos asociados a otras plantas de importancia económica.

Por otra parte, los resultados asociados al algoritmo *ABGD*, establecieron que los morfotipos de los polinizadores de *A. aculeata* pueden ser agrupados en cuatro *clusters*. Este resultado esclarece la incertidumbre asociada a que varias especies del género *Andranthobius* estuvieran involucradas en la polinización de *A. aculeata* (16, 80), ya que este análisis permite agrupar los tres morfotipos en un mismo *cluster*, evidenciando que esta especie posee una alta variación intraespecífica a nivel morfológico (Figura 1) y una baja a nivel molecular (Tabla 4) esto ha sido demostrado en gorgojos del género *Rhynchophorus* en el sudeste asiático y Oceanía (37, 38, 79). Por otro lado, los morfotipos asignados por *ABGD* a *Phyllotrox* sp., *Mystrops debilis* y *Mystrops dalmasi* fueron agrupados en *clusters* diferentes, y corrobora lo encontrado con la determinación taxonómica morfológica y molecular, algo ya demostrado en la implementación de este algoritmo para anuros (77), polillas (81) y especies de la familia Nitidulidae (36), los cuales fueron agrupados en grupos específicos de acuerdo a su variación genética de sus secuencias a pesar de su variación intraespecífica a nivel morfológico.

Tabla 5: Valores del índice de importancia relativa (IRP) como polinizador para los morfotipos de *A. aculeata* resultado del análisis integrativo (caracteres morfológicos y molecular). Estos valores fueron calculados a partir de abundancias relativas en fase femenina (AB) y promedio de la carga de polen (CTP). Eficiencia indicada como: polinizadores principales (POP), eventuales (PEV) y sin participación (NOP).

Morfotipo	AB	CTP	(AB*CTP)	(%) IRP	Eficiencia
<i>Adranthobius</i> sp.	26283	6947	182588001	78.5789247	POP

<i>Mystrops debilis</i>	14208	2696	38304768	16.4849139	POP
<i>Phyllotrox</i> sp.	7081	1415	10019615	4.31206086	PEV
<i>Mystrops dalmasi</i>	3237	448	1450176	0.62410054	NOP

El análisis integrativo (caracteres morfológicos y moleculares) permitió establecer que los polinizadores de *Acrocomia aculeata* se reducen a 4 morfotipos. El nuevo índice IRP muestra que de los 4, tan sólo tres participan en la polinización de *A. aculeata* (Tabla 5). Los morfotipos de *Andranthobius* sp. y *Mystrops debilis* aportan 95% de polen a las inflorescencias del Corozo y son los polinizadores principales, además sus abundancias fueron de más de 14.000 individuos por morfotipo (Tabla S1), esto es un factor a tener en cuenta para la definición de un polinizador (23). La especie *Phyllotrox* sp. aporta un 4.3% y es polinizador eventual mientras que *Mystrops dalmasi* su participación es menor al 1% y por el índice no se considera polinizador de esta palma. Este resultado aporta evidencia que contradice lo propuesto previamente por Brito (2013) donde *Mystrops dalmasi* era un polinizador efectivo de *A. aculeata*, ya que en el estudio este insecto no se encontraba en todas las inflorescencias y su carga de polen no era suficiente para ser considerada polinizador de *A. aculeata*, dejando claro que todos los miembros de Curculioninae tienen realmente un rol en la polinización de esta palma. Esto explica que *A. aculeata* es una palma cantarófila que prefiere que los coleópteros sean sus polinizadores y concuerda con lo encontrado para *A. aculeata* en la región de la Orinoquía y el cerrado de Brasil (17, 82). Sin embargo, mencionados estudios no tuvieron en cuenta la variación morfológica de los insectos por lo que se tuvieron más de tres especies de insectos del mismo género como polinizadores principales y copolinizadores (82). Por tal motivo, es importante recolectar toda la información posible sobre sus insectos polinizadores para su conservación y asegurar una óptima producción de frutos en cultivos a gran escala del Corozo y así aprovechar al máximo sus propiedades oleaginosas (83–85).

CONCLUSIONES

En general, podemos concluir que los objetivos de este trabajo se cumplieron satisfactoriamente, debido a que los resultados morfológicos y moleculares mostraron una alta congruencia, es decir evidencian que el uso de la taxonomía integrativa fue de gran ayuda para una adecuada aproximación del estatus taxonómico de estos insectos y disminuir la incertidumbre de acuerdo a su rol en la polinización de *A. aculeata* siendo este uno de los primeros trabajos en el país en usar esta herramienta en insectos polinizadores en palmas de importancia económica. Se recomienda que para estos estudios de caracterización taxonómica podría usarse la extracción de genitalia para descartar casos de dimorfismo sexual y a nivel molecular estudiar si se encuentran actuando eventos de divergencia y

fuerzas evolutivas que hace que las especies sean tan variables (86). Estos dos métodos son fundamentales en estudios futuros sobre biodiversidad, además que contribuyen a conocer información taxonómica y molecular de organismos poco estudiados con una importancia ecológica como lo es la polinización, además que pueden ser tenidos en cuenta para la conservación de estos organismos y así optimizar la producción de frutos en sistemas productivos como las palmas o en otro grupo de plantas.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a la Vicerrectoría de Investigación y Transferencia (VRIT) y al programa de Biología de la Universidad de La Salle por la financiación de este proyecto, al departamento de Ciencias Básicas por el préstamo de equipos e infraestructura. También al grupo de investigación en Bioprospección y Conservación biológica del departamento de ciencias Básicas de la Universidad de La Salle por el proyecto que desarrollan titulado: “*Evaluación de los aspectos biológicos, ecológicos y funcionales de polinizadores implicados en la producción de frutos de poblaciones silvestres de Acrocomia aculeata (Arecaceae) en la Orinoquia Colombiana*” en el cual se encuentra enmarcado este trabajo. A la Doctora Astrid Muñoz por su guía, orientación y confianza en el desarrollo de este proyecto tanto en la parte experimental como de escritura, también al doctor Luis Núñez por su apoyo en campo y análisis de datos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Henderson A (1986) A review of pollination studies in the Palmae. *Bot Rev* 52(3):221–259.
2. Kevan PG, Baker HG (1983) Insects as Flower Visitors and Pollinators. *Annu Rev Entomol* 28(1):407–453.
3. Navarro L, Rosas C, Ayensa G (2000) Recompensas Florales Y Exito Reproductivo. *Port Acta Biol* 19:121–126.
4. Nantes Parra G (2016) *Iniciativa Colombiana de Polinizadores: abejas ICPA* ed Nantes Parra G (Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Bogota, D.C.). Primera Ed.
5. Pantoja A, Smith-Pardo A, García A, Sáenz A, Rojas F (2014) *Sobre polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y el Caribe. Principios y avances*.
6. Bonilla M. (2012) La polinización como servicio ecosistémico. *Iniciat Colomb polinizadores*:103.
7. El Ottra JHL, Pirani JR, Pansarin ER (2015) Floral biology and pollination of two sympatric species of Galipeinae (Galipeae, Rutaceae) endemic to the Brazilian Atlantic Forest. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 221:107–116.

8. Barfod AS, Hagen M, Borchsenius F (2011) Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). *Ann Bot* 108(8):1503–1516.
9. Gottsberger G (1999) Pollination and evolution in neotropical Annonaceae. *Plant Species Biol* 14(2):143–152.
10. Lorenzi GMAC, Negrelle RRB (2006) *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood. Ex Mart: Aspectos Ecológicos, Usos e Potencialidades. *Visão Acadêmica* 7(1):1–15.
11. Galeano G, Bernal R (2010) *Palmas de Colombia. Guía de Campo* (Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales). 1st Ed. doi:10.1016/S0025-7753(08)76425-X.
12. Hernández Zardón AF (2016) Palma Corojo, un recurso natural para la producción sostenible de aceite. *Cultiv Trop* 37(4):13–33.
13. Hernández C, Mieres Pitre A (2005) Extracción y purificación del aceite de la almendra del fruto de la palma de corozo (*Acrocomia aculeata*). *Rev Ing Uc* 12:68–75.
14. César A da S, Almeida F de A, de Souza RP, Silva GC, Atabani AE (2015) The prospects of using *Acrocomia aculeata* (macaúba) a non-edible biodiesel feedstock in Brazil. *Renew Sustain Energy Rev* 49:1213–1220.
15. Souza LTA, et al. (2015) Macaúba (*Acrocomia aculeata*) cake from biodiesel processing: a low-cost substrate to produce lipases from *Moniliella spathulata* R25L270 with potential application in the oleochemical industry. *Microb Cell Fact* 14(1):87.
16. Scariot AO, Lleras E, Hay JD (1991) Reproductive Biology of the Palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. *Biotropica* 23(1):12–22.
17. Brito AC (2013) BIOLOGIA REPRODUTIVA DE MACAÚBA: FLORAÇÃO, POLINIZADORES, FRUTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE PÓLEN. Dissertation (Universidade Federal de Viçosa).
18. Herrera CM (2005) Plant generalization on pollinators: species property or local phenomenon? *Am J Bot* 92(1):13–20.
19. Maldonado MB, Lomascolo SB, Vazquez DP (2013) The Importance of Pollinator Generalization and Abundance for the Reproductive Success of a Generalist Plant. *PLoS One* 8(10):e75482.
20. Johnson SD, Steiner KE (2000) Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends Ecol Evol* 15(4):140–143.
21. Mitchell RJ, Irwin RE, Flanagan RJ, Karron JD (2009) Ecology and evolution of plant-pollinator interactions. *Ann Bot* 103(9):1355–63.

22. Teichert H (2008) Pollination biology of cantharophilous and melittophilous Annonaceae and Cyclanthaceae in French Guiana. Dissertation (Fakultät der Naturwissenschaften der Universität Ulm). doi:<http://dx.doi.org/10.18725/OPARU-1131>.
23. Núñez-Avellaneda LA, Rojas-Robles R (2008) Biología reproductiva y ecología de *Oenocarpus bataua* en los Andes colombianos. *Caldasia* 30(1):101–125.
24. Núñez LA, Bernal R, Knudsen JT (2005) Diurnal palm pollination by mystropine beetles: is it weather-related? *Plant Syst Evol* 254(3–4):149–171.
25. Parra GN, Fernandez F (2011) Abejas de Colombia II claves preliminares para las familias, subfamilias y tribus (Hymenoptera: apoidea). *Acta Biológica Colomb* 2(7, 8):55–89.
26. Cardona-Duque J, Franz NM (2012) Description and phylogeny of a new Neotropical genus of Acalyptini (Coleoptera: Curculionidae: Curculioninae) associated with the staminodes of Cyclanthaceae. *Zool J Linn Soc* 166(3):559–623.
27. Franz NM, Valente RM (2005) Evolutionary trends in derelomine flower weevils (Coleoptera : Curculionidae): from associations to homology. *Invertebr Syst* 19(6):499.
28. Kirejtshuk a. G, Couturier G (2010) Sap beetles of the tribe Mystropini (Coleoptera: Nitidulidae) associated with South American palm inflorescences. *Ann la Société Entomol Fr* 46(3–4):367–421.
29. Lefébure T, Douady CJ, Gouy M, Gibert J (2006) Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Mol Phylogenet Evol* 40(2):435–447.
30. Jörger K, Schrödl M (2013) How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy. *Front Zool* 10(1):59.
31. Padial JM, De I, Riva L (2007) Integrative taxonomists should use and produce DNA barcodes. *Zootaxa* 1586:67–68.
32. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 270(1512):313–21.
33. Paz A, González M, Crawford AJ (2011) Códigos de barras de la vida: Introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colomb* 16(3):161–175.
34. Dayrat B (2005) Towards integrative taxonomy. *Biol J Linn Soc* 85(3):407–415.
35. Vinasco Mondragón AM (2016) Identificación molecular del complejo de picudos (Coleoptera Curculionidae) de importancia cuarentenaria en el cultivo de aguacate en Colombia. Dissertation (Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira). Available at: <http://www.bdigital.unal.edu.co/54283/>.

36. Eberle J, Warnock RCM, Ahrens D (2016) Bayesian species delimitation in *Pleophylla* chafers (Coleoptera) - The importance of prior choice and morphology. *BMC Evol Biol* 16(1):1–16.
37. El-Mergawy R, et al. (2011) Mitochondrial genetic variation and invasion history of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), in middle-east and Mediterranean basin. *Int J Agric Biol* 13(5):631–637.
38. Abad RG, et al. (2014) Molecular profiling of different morphotypes under the genus *Rhynchophorus* (Coleoptera: Curculionidae) in Central and Southern Philippines. *J Entomol Nematol* 6(9):122–133.
39. Henderson A (1986) A Review of Pollination Studies in the Palmae. *Bot Rev* 52(3):221–259.
40. Espitia Pinto NE (2010) Propuesta de gestión ambiental para la empresa SIPROCAS EU del sector ganadero en Hato Corozal - Casanare. Dissertation (Pontificia Universidad Javeriana).
41. Nuñez Avellaneda LA, Carreño JI (2017) Polinización por abejas en *Syagrus orinocensis* (Arecaceae) en la Orinoquia colombiana. *Acta Biológica Colomb* 22(2):221–233.
42. Lorenzi GMAC (2006) *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. - Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. Dissertation (Universidade Federal do Paraná).
43. Morrone JJ (2014) Biodiversidad de Curculionoidea (Coleoptera) en México. *Rev Mex Biodivers* 85:312–324.
44. Eliceiri K, Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis HISTORICAL commentary NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7):671–675.
45. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3(5):294–299.
46. Meyer CP, Geller JB, Paulay G (2005) Fine scale endemism on coral reefs: Archipelagic differentiation in turbinid gastropods. *Evolution (N Y)* 59(1):113–125.
47. Kearse M, et al. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12):1647–1649.
48. Hall T (2013) BioEdit Sequence Alignment Editor. *Ibis Biosci*. Available at: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
49. Altschul SF, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17):3389–3402.

50. Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes* 7(3):355–364.
51. Kekkonen M, Hebert PDN (2014) DNA barcode-based delineation of putative species: Efficient start for taxonomic workflows. *Mol Ecol Resour* 14(4):706–715.
52. Scariot AO, Lleras E, Hay JD (1995) Flowering and Fruiting Phenologies of the Palm *Acrocomia aculeata*: Patterns and Consequences. *Biotropica* 27(2):168–173.
53. Davis CC, Endress PK, Baum DA (2008) The evolution of floral gigantism. *Curr Opin Plant Biol* 11:49–57.
54. Henderson A (1986) A review of pollination studies in the Palmae. *Bot Rev* 52(3):221–259.
55. Copete Maturana JP, Mosquera Flórez D, Núñez-Avellaneda LA (2011) Ecología de la polinización de la Palma *Manicaria saccifera*: Un caso de mutualismo obligado Palma-Polinizador. *Libro de Resúmenes : Simposio Internacional “Impacto de La Cosecha de Las Palmas En Los Bosques Tropicales” 6 y 7 de Octubre de 2011. Leticia, Amazonas, Colombia, eds Bernal R, García N, Yisela F, Galeano G, p 33.*
56. Henderson A (1985) Pollination of *Socratea exorrhiza* and *Iriartea ventricosa*. *Principes* 29:64–71.
57. Consiglio TK, Bourne GR (2001) Pollination and breeding system of a neotropical palm *Astrocaryum vulgare* in Guyana: a test of the predictability of syndromes. *J Trop Ecol* 17(4):577–592.
58. Oliveira MDSP De, Couturier G, Beserra P (2003) Biología da polinização da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) em Belém, Pará, Brasil. *Acta Bot Brasilica* 17(3):343–353.
59. Henderson A, Pardini R, Rebello JFS, Vanin S, Almeida D (2000) Pollination of *Bactris* (Palmae) in an Amazon forest. *Brittonia* 52(2):160–171.
60. Brieva Oviedo E, Núñez-Avellaneda LA, Galeano G (2015) Perfecta sincronización en la polinización de *Bactris guineensis* (Aracaceae), una palma dicogámica, protógina y productora de frutos de importancia económica en el Caribe colombiano. *USAID pueblos los Estados Unidos Am*:42.
61. Moraes R. M, Sarmiento J (1992) Contribución al estudio de biología reproductiva de una especie de *Bactris* (Palmae) en el bosque de galería (Depto. Beni, Bolivia). *Bull l’Institut Français d’Etudes Andin* 21(2):685–698.
62. Pellmyr O (2002) Pollination by animals. *Plant-Animal Interactions: An Evolutionary Approach*, pp 157–184.
63. Núñez Avellaneda LA (2014) Patrones de asociación entre insectos polinizadores y palmas silvestres en Colombia con énfasis en palmas de importancia económica. Dissertation (Universidad Nacional de Colombia).

64. Núñez-Avellaneda LA, Carreño J, Galeano G (2014) Asociación de gorgojos (Curculionidae: Coleoptera) con las palmas (Arecaceae) silvestres de la Orinoquia colombiana, y su papel en la polinización. *Patrones de Asociación Entre Insectos Polinizadores y Palmas Silvestres En Colombia Con Énfasis En Palmas de Importancia Económica* (Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá, D. C., Colombia.), p 342.
65. Ervik F, Bernal R (1996) Floral Biology and Insect Visitation of the Monoecious Palm *Prestoea decurrens* on the Pacific Coast of Colombia. *Principes* 40 (2):86–92.
66. de Medeiros B a. S (2011) Análise filogenética e revisão sistemática do gênero *Anchylorhynchus Schoenherr*, 1836 (Curculionidae : Derelomini), com o uso de caracteres morfológicos contínuos e discretos. Dissertation (Universidade de São Paulo). Available at: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41133/tde-28092011-100100/>.
67. Junker RR, et al. (2013) Specialization on traits as basis for the niche-breadth of flower visitors and as structuring mechanism of ecological networks. *Funct Ecol* 27(2):329–341.
68. Blüthgen N, Klein AM (2011) Functional complementarity and specialisation: The role of biodiversity in plant-pollinator interactions. *Basic Appl Ecol* 12(4):282–291.
69. Van Der Niet T, Pirie MD, Shuttleworth A, Johnson SD, Midgley JJ (2014) Do pollinator distributions underlie the evolution of pollination ecotypes in the Cape shrub *Erica plukenetii*? *Ann Bot* 113(2):301–315.
70. Zhang H, Langor DW, Ye H, Li Z, Laffin RD (2007) Genetic divergence among populations of *Pissodes yunnanensis* (Coleoptera: Curculionidae) in southwestern China. *Can Entomol* 139(3):308–318.
71. Toussaint EFA, Tänzler R, Rahmadi C, Balke M, Riedel A (2015) Biogeography of Australasian flightless weevils (Curculionidae, Celeuthetini) suggests permeability of Lydekker’s and Wallace’s Lines. *Zool Scr* 44(6):1–13.
72. de Medeiros BAS, Bená D de C, Vanin SA (2014) *Curculio Curculis lupus*: biology, behavior and morphology of immatures of the cannibal weevil *Anchylorhynchus eriospathae* G. G. Bondar, 1943. *PeerJ* 2:e502.
73. Henderson A, Pardini R, Rebello JFS, Vanin S, Almeida D (2000) Pollination of *Bactris* (Palmae) in an Amazon forest. *Brittonia* 52(2):160–171.
74. Sourakov A, Zakharov E V. (2011) “Darwin’s butterflies”? DNA barcoding and the radiation of the endemic Caribbean butterfly genus *Calisto* (Lepidoptera, Nymphalidae, Satyrinae). *Comp Cytogenet* 5(3):191–210.
75. Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol* 3(12):1–10.
76. Ratnasingham S, Hebert PDN (2013) A DNA-Based Registry for All Animal

Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS One* 8(7).
doi:10.1371/journal.pone.0066213.

77. Guarnizo CE, et al. (2015) DNA Barcoding Survey of Anurans across the Eastern Cordillera of Colombia and the Impact of the Andes on Cryptic Diversity. *PLoS One* 10(5):20.
78. Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(41):14812–7.
79. Rugman-Jones PF, Hoddle CD, Hoddle MS, Stouthamer R, Halloran A (2013) The Lesser of Two Weevils: Molecular-Genetics of Pest Palm Weevil Populations Confirm *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer 1798) as a Valid Species Distinct from *R. ferrugineus* (Olivier 1790), and Reveal the Global Extent of Both. *PLoS One* 8(10):e78379.
80. Cordero Rodriguez MM (2017) Asociación mutualista o antagonista de especies de *Cyclocephala* (Coleoptera: Dynastinae) sobre la producción de frutos de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) en Casanare, Colombia. Dissertation (Universidad de La Salle).
81. Liu XF, Yang CH, Han HL, Ward RD, Zhang AB (2014) Identifying species of moths (Lepidoptera) from Baihua Mountain, Beijing, China, using DNA barcodes. *Ecol Evol* 4(12):2472–2487.
82. Núñez-Avellaneda LA, Carreño J (2008) Efecto de la fragmentación sobre la polinización de *Acrocomia aculeata* (Palmae) en las sabanas intervenidos en la orinoquía colombiana. *III Congreso Internacional de Ecosistemas Secos. “Experiencias y Estrategias Para Su Conservación y Manejo,”* eds Rodríguez M, Guerra G, Reyes B, Banda R (Fundación Ecosistemas Secos, Bogotá, D.C., Colombia), p 105. Primera ed.
83. Aguiéiras ECG, Cavalcanti-Oliveira ED, de Castro AM, Langone MAP, Freire DMG (2014) Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. *Fuel* 135:315–321.
84. Pires TP, dos Santos Souza E, Kuki KN, Motoike SY (2013) Ecophysiological traits of the macaw palm: A contribution towards the domestication of a novel oil crop. *Ind Crops Prod* 44:200–210.
85. Plath M, et al. (2016) A novel bioenergy feedstock in Latin America? Cultivation potential of *Acrocomia aculeata* under current and future climate conditions. *Biomass and Bioenergy* 91:186–195.
86. Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet* 23(4):167–172.

INFORMACIÓN DE SOPORTE

Anexo 1

Condiciones Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) se realizó en un volumen total de 30µL para cada una de las muestras, que incluía 15µL Master mix (este master mix contenía dNTP's [2.5mM], cloruro de magnesio (MgCl₂), Buffer 5X, Taq polimerasa (1 unidad)), 2.4µL de cada uno de los *primers* y 2µL de ADN genómico. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por dos minutos, 34 ciclos de anillamiento a 94°C por 40s (segundos), 48°C por 30s, 72°C por un minuto y finalmente un período de extensión final a 72°C por 10 minutos.