

## Tesis de Posgrado

# Las poblaciones argentinas de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: tephritidae) conforman una única especie biológica?

Alberti, Andrea Claudia

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Alberti, Andrea Claudia. (2004). Las poblaciones argentinas de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: tephritidae) conforman una única especie biológica?. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3749\\_Alberti.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3749_Alberti.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Alberti, Andrea Claudia. "Las poblaciones argentinas de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: tephritidae) conforman una única especie biológica?". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3749\\_Alberti.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3749_Alberti.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



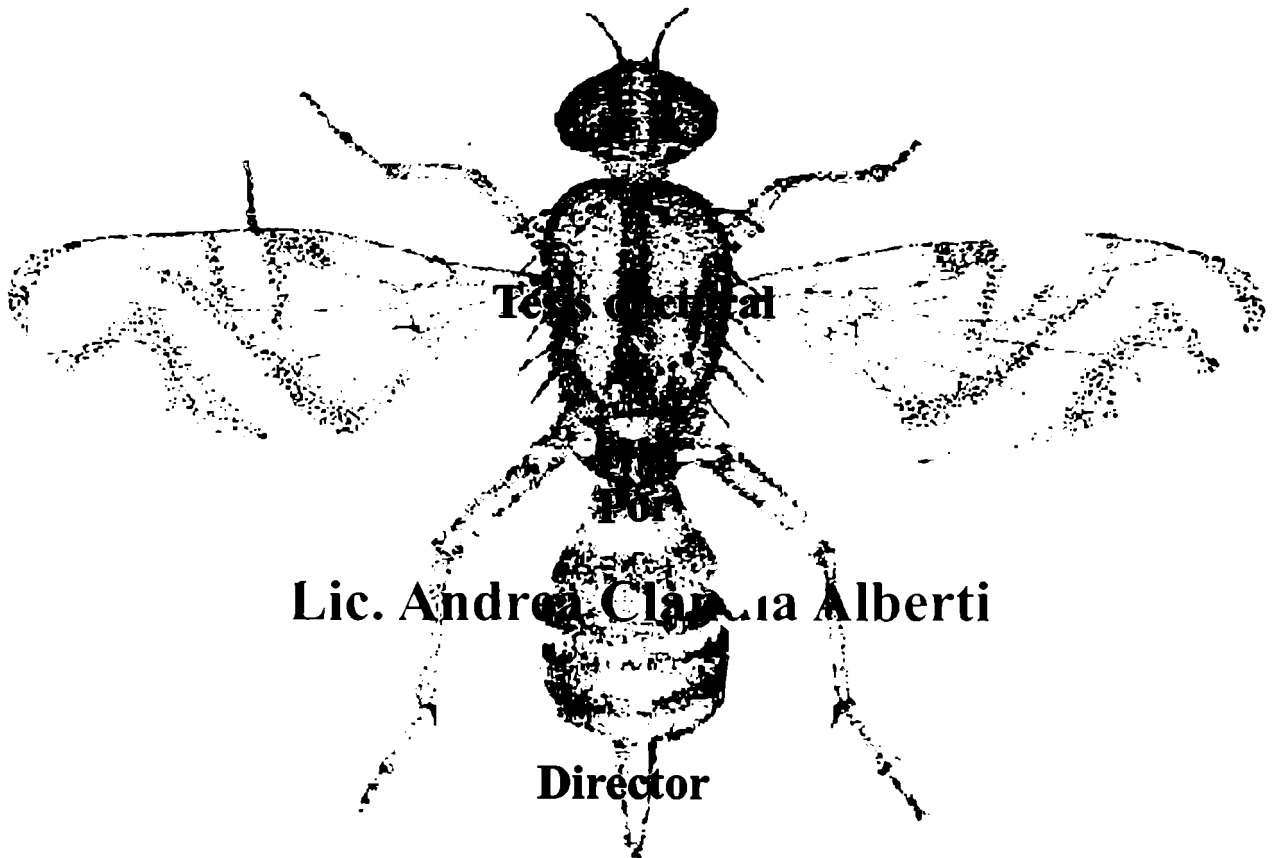
**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Ecología Genética y Evolución**

**¿Las Poblaciones Argentinas de  
*Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)  
Conforman una Única Especie Biológica?**



**Lic. Andrea Clara Alberti**

**Director**

**Prof. Dr. Juan César Vilardi**

3749

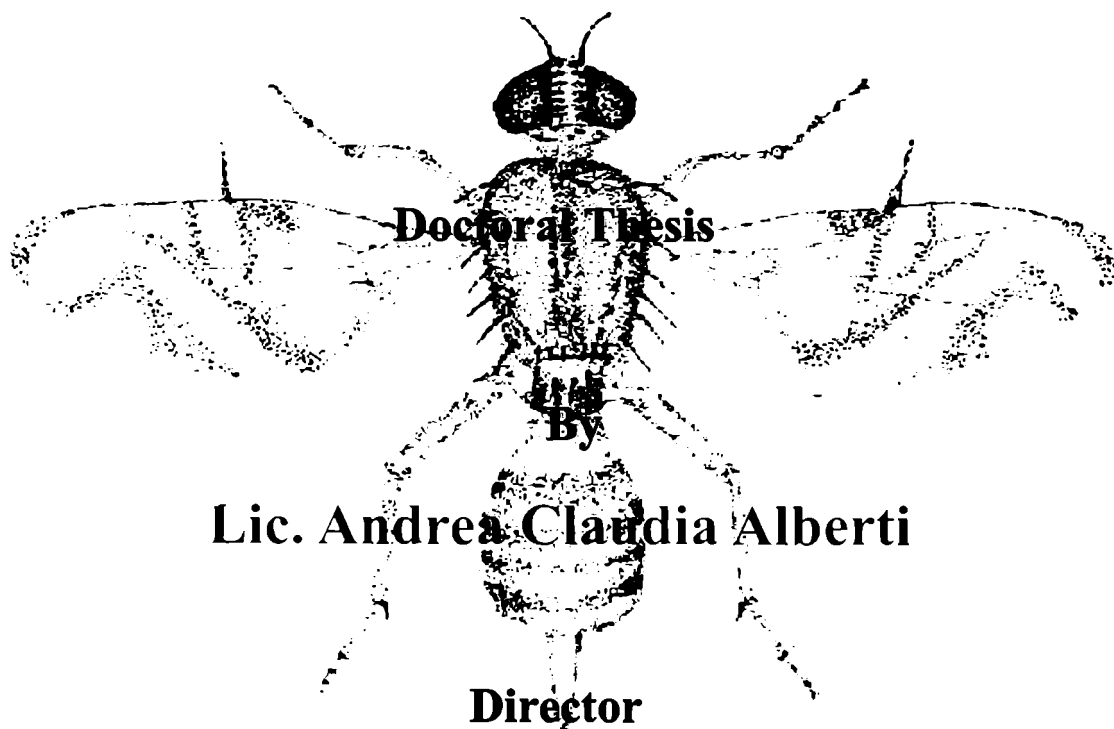
**Laboratorio de Genética de Poblaciones**  
**Buenos Aires**

**2004**



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Ecología Genética y Evolución**

**Do Argentinean population of *Anastrepha*  
*fraterculus* (Diptera: Tephritidae)  
Contitute a Single Biological Species?**



**Lic. Andrea Claudia Alberti**

**Director**

**Prof. Dr. Juan César Vilardi**

**Laboratorio de Genética de Poblaciones**  
**Buenos Aires**

**2004**

La Mosca Sudamericana de la Fruta, *Anastrepha fraterculus* (Wiedmann), díptero perteneciente a la familia Tephritidae, es una importante plaga de árboles frutales, silvestres y cultivados, que provoca un gran daño económico a lo largo de su extensa distribución geográfica en el continente americano. En esta tesis se estudiaron poblaciones naturales de esta mosca en diferentes localidades de la República Argentina y en una localidad del sur del Brasil, por medio de distintas metodologías (Electroforesis de Isoenzimas, PCR + RFLP y Secuenciación). El objetivo fue analizar la estructura y la variación genética en dichas poblaciones a fin de poner a prueba la “Hipótesis del Complejo de Especies Crípticas” propuesta por varios autores. Las diferentes metodologías aplicadas evidenciaron una variabilidad compatible con la esperada para poblaciones de una misma especie, sin una estructuración genética asociada a la distribución geográfica. Por lo tanto los argumentos expuestos en este trabajo sugieren que las poblaciones de nuestro país constituyen una única especie biológica.

**Palabras claves:** *Anastrepha fraterculus*, isoenzima, PCR-RFLP, secuenciación, haplotipo, variabilidad genética, estructura genética.

The South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wiedmann), a dipteran belonging the family Tephritidae, is an important plague of cultivated and wild fruit trees that causes great economic damage throughout its extensive geographic distribution in the American continent. In this thesis natural populations of this fly from different localities from Argentina and in a locality of south Brazil were studied, by means of different methods (Isozymes, PCR + RFLP and Sequencing). The objective was to analyze the genetic structure and variability in these populations in order to evaluate the “Hypothesis of the Complex of Cryptic Species”, advanced by several authors. Different methodologies applied demonstrated a variability compatible with that expected for populations of a same species, without genetic structure associated to the geographic distribution. Therefore the arguments exposed in this work suggest that populations of our country belong to a single biological specie.

**Key words:** *Anastrepha fraterculus*, allozymes, PCR-RFLP, sequencing, haplotype, genetic variability, population structure.

**A la memoria de mis padres**

**Alba y Blas**

**A los tres hombres de mi vida**

**Alberto, Manuel y Pablo**

**(por orden de aparición)**

“Es interesante contemplar un enmarañado ribazo cubierto por numerosas plantas de muchas clases, con pájaros que cantan en los matorrales, con varios insectos revoloteando en torno y con gusanos que se arrastran por entre la tierra húmeda, y reflexionar que estas formas primorosamente construidas, tan diferentes entre sí, y que dependen mutuamente unas de otras de modos tan complejos, han sido producidas por leyes que obran en rededor nuestro.....”

“Así, pues, el objeto más excelso que somos capaces de concebir, es decir, la producción de los animales superiores, resulta directamente de la guerra de la naturaleza, del hambre y de la muerte. Hay grandeza en esta concepción de la vida, con sus diferentes facultades, fue originalmente alentada por el Creador en unas cuantas formas o en una sola, y que, mientras este planeta ha ido girando según la constante ley de la gravitación, se han desarrollado y se están desarrollando, a partir de un comienzo tan sencillo, infinidad de formas cada vez más bellas y maravillosas.”

Charles Darwin

“El Origen de las Especies”

Nunca una tesis es sólo un trabajo individual, por eso agradezco profundamente a las siguientes personas:

Al **Dr. Juan César Vilardi**, mi Director, maestro y consejero en todos estos años, por sus enseñanzas y su fina comprensión en los momentos difíciles.

A la **Dra. Beatriz O. Saidman**, pionera en electroforesis de isoenzimas, por iniciarme en esta técnica y por sus consejos siempre oportunos.

A **Fany Manso**, al **Dr. Jorge Cladera** y a todo el grupo de Genética del INTA Castelar, por su vasto conocimiento teórico y práctico y su enorme generosidad para brindarlo.

A la **Lic. Natalia Petit Marty** y al **Dr. Rubén Zandomeni** por su gran ayuda con el secuenciador automático del Laboratorio de Servicios de Biología Molecular de Alta Complejidad del INTA Castelar.

A la **Dra. Viviana A. Confalonieri (Vivi)**, por su invaluable apoyo en el manejo e interpretación de los programas usados en secuenciación de ADN y cladismo. Porque es una genia, y es esa clase de personas que se brindan a los demás sin esperar nada a cambio.

A la **Dra. María Isabel Remis (Marisabel)**, por su calma sabiduría, su criterio siempre correcto y por estar dispuesta en todo momento a dar su mano por el placer de hacerlo.

A **Laura, Graciela, Paula**, las **Cecis (B y C)**, **Amalia, Vero, Pablo, Paola, Arturo, Mariel, Santi, Alex, Sara, Marcela**, mis compañeros del Laboratorio y de docencia que hacen agradable el trabajo y son una ayuda siempre dispuesta. Por los indispensables almuerzos donde la Facultad, el País y la Vida se debaten diariamente.

A las **Dras. Liliana Mola** y **Alba Papeschi**, por saber tanta genética, por ayudarme a aprenderla y a transmitirla.

A la **Dra. María Cristina Wisnivesky** por señalarme los primeros pasos en el camino y la pasión de investigar.

A la **Lic. Soledad Montoya (Sole)**, mi amiga del alma, mi hermana por elección, por haber estado y estar en los tiempos buenos y en los que no y por recibir tanto que ni ella misma imagina cuánto le debo.



A **Alba**, mi madre, que soñó desde que yo era muy pequeña con un laboratorio para mí.

A **Blas**, mi padre, que me enseñó los ideales de justicia y libertad, el amor a la patria y al prójimo.

A **Manuel y Pablo**, mis adorados y hermosos hijos, porque ser la madre de ellos es muy fácil, ya que todas son satisfacciones.

A **Alberto**, mi amado compañero de tantos años, por hacer suyos mis sueños, por su apoyo incondicional, su comprensión y su amor.

Y a las siguientes Instituciones:

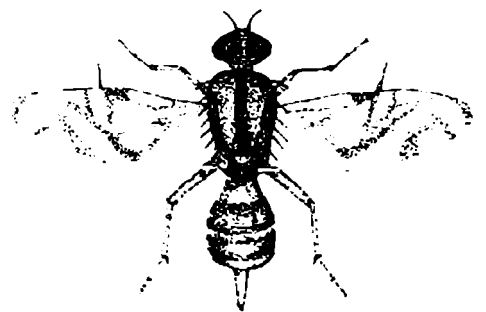
Al viejo **Departamento de Ciencias Biológicas** y al nuevo **Departamento de Ecología, Genética y Evolución** de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires que fue mi casa por tantos años.

A los subsidios que hicieron posible este trabajo: PID EX 241; PIDTW09 de la **Universidad de Buenos Aires**; PIP 0722/98 del **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas**; BID 1201 0C/AR PICT 6628 de la **Agencia de Promoción Científica y Tecnológica**; Research Contract N° 9897/RO de la **Organización Internacional de Energía Atómica**.

<b>Resumen</b>	2
<b>Summary</b>	3
<b>Agradecimientos</b>	6
<b>Índice</b>	8
<b>1. Introducción</b>	10
1.1. Algunos conceptos importantes en Genética Evolutiva	12
1.1.1. ¿Qué es la especie en Biología?	12
1.1.2. Variación genética y Flujo génico	14
1.1.3. Filogeografía	16
1.1.4. Las moscas de la familia Tephritidae como modelo de estudio en Genética de Poblaciones	17
1.1.5. Herramientas moleculares para cuantificar la variabilidad genética	20
a) Las Isoenzimas	21
b) El ADN	22
1.2. Acerca de <i>Anastrepha fraterculus</i>	27
1.2.1. Ubicación taxonómica	27
1.2.2. Algunos aspectos de su biología	28
1.2.3. El problema de su estado taxonómico	35
1.3. Objetivos	38
<b>2. Material y Métodos</b>	39
2.1. Materiales	40
2.1.1. Poblaciones y hospederos	40
2.1.2. Colección de los individuos	44
2.2. Métodos	47
2.2.1. Electroforesis de Isoenzimas	47
2.2.2. ADNmt	49
2.2.3. Extracción de ADN	49
2.2.4. PCR	49
2.2.5. Análisis de fragmentos de restricción (RFLP)	51
2.2.6. Secuenciación	52
2.3. Parámetros Estimados	54
2.3.1. Estudio de Estructura Poblacional	54
2.3.2. Estudio de Variabilidad Genética	56
2.3.3. Secuenciación	58
2.3.4. Análisis cladístico a partir de la Secuenciación	61

<b>3.</b>	<b>Resultados</b>	<b>64</b>
3.1.	Estudio de Estructura Genética en una población por medio de Electroforesis de Isoenzimas	65
3.1.1.	Análisis dentro de frutos	70
3.1.2.	Análisis entre frutos	73
3.1.3.	Asociación entre loci	77
3.2.	Estudio de variabilidad en poblaciones naturales	79
3.2.1.	Análisis Isoenzimático	79
3.2.2.	Análisis PCR-RFLP	88
3.2.3.	Análisis de las secuencias del gen mitocondrial COII	91
3.2.3.	Análisis de las secuencias del gen mitocondrial 16S	106
<b>4.</b>	<b>Discusión</b>	<b>115</b>
4.1.	Estudio de Estructura Genética en una población por medio de Electroforesis de Isoenzimas.	116
4.2.	Estudio de variabilidad en poblaciones naturales	122
4.3.	Conclusiones	131
	<b>Bibliografía</b>	<b>133</b>
	<b>Apéndice I: Isoenzimas</b>	<b>147</b>
	<b>Apéndice II: ADN</b>	<b>153</b>

# 1. Introducción



*Anastrepha fraterculus*, vulgarmente conocida como la Mosca Sudamericana de la Fruta, es un tefrítido cuya identidad específica ha sido y es muy controvertida.

Varios autores discuten si es adecuado hablar de una única especie biológica o si, por el contrario, lo que hoy denominamos *A. fraterculus* sería en realidad un grupo de especies crípticas, o un complejo de especies, ampliamente distribuido a lo largo de buena parte del continente americano.

Establecer la ubicación de un organismo en una determinada especie es un tema crucial de la Biología, ya que las especies biológicas son su principal objeto de estudio.

Por lo tanto, preguntarse acerca de la pertenencia de las poblaciones argentinas a una o más entidades del rango de especie propone una estimulante y atractiva búsqueda.

## **1.1. Algunos conceptos importantes en Genética Evolutiva**

### **1.1.1. ¿Qué es la especie en Biología?**

Desde tiempos inmemoriales los seres humanos se maravillaron por la enorme y fascinante diversidad biológica y siempre intentaron clasificar a los organismos vivientes, como un modo de aproximarse a la comprensión de dicha diversidad.

Esta necesidad de clasificación dio como resultado el advenimiento de una disciplina conocida como Biotaxonomía o Sistemática Biológica.

Fue así como en el siglo XVIII surgió la “jerarquía linneana” (Linnaeus 1758), que será la herramienta con la que los biólogos intentaron ordenar la diversidad biológica. Esta jerarquía está constituida por las llamadas categorías taxonómicas, una serie de conjuntos que tienen como último eslabón o conjunto más pequeño, incluido en otros de rango superior, a la especie.

Dentro de las numerosas definiciones de especie tal vez no exista una ideal y deban ser necesarios una pluralidad de conceptos para definirla. (Templeton 2001).

El concepto biológico de especie propuesto por Dobzhansky en 1937, establecía que las especies eran “sistemas de poblaciones cuyos

cambios genéticos están limitados por un mecanismo de aislamiento reproductivo o quizás por una combinación de varios de esos mecanismos”.

Más tarde, en 1951, Simpson definía el concepto evolutivo de especie como “un linaje (o secuencia de poblaciones ancestro-descendiente) que se desarrolla separadamente de otros con su propio papel evolutivo y tendencias”.

Otra de las definiciones es el concepto cohesivo de especie enunciado por Templeton en 1989, definido como “la más inclusiva población de individuos que tienen potencial cohesivo a través de los mecanismos intrínsecos de cohesión, tales como factores de cambio genético (introducción de nuevas variantes genéticas a través del flujo génico) y factores de cambio demográfico (definido por el nicho fundamental y por introducción de nuevas variantes genéticas a través de la deriva y la selección natural) ”.

Cuando los biólogos clasifican a los organismos con los que trabajan lo hacen en base a una serie de características comunes de dichos individuos, sean éstas morfológicas, fisiológicas, etológicas o moleculares, y ateniéndose a alguna de las definiciones ya mencionadas.

Proceden así a distinguir “grupos de individuos que en la naturaleza están unidos por relaciones genéticas, poblacionales y evolutivas. Y son estos grupos los que los biólogos evolucionistas tienen en cuenta cuando utilizan el concepto de especie” (Reig, 1979).

Decidir si dos o más poblaciones emparentadas pertenecen a una o más especies es adentrarse en uno de los eventos más cruciales en la historia de los seres vivos como es la especiación.

Como dice Ayala, (1976): “Dentro de los procesos cladogénicos uno de los más decisivos es la especiación, el evento por el cual una especie puede separarse en dos o más. Las especies son, por lo tanto, unidades evolutivas independientes. Los cambios adaptativos que ocurren en una especie o en una población pueden extenderse a todos los miembros de la especie por selección natural, pero no pueden extenderse a otras especies”

Dentro de este marco se ubica la discusión sobre el complejo de especies de *A. fraterculus*, descrito por muchos autores de acuerdo a sus investigaciones en diferentes localidades del continente americano (ver ítem 1.2.3.).

A partir de esta discusión, la intención de esta tesis es aproximarse a una respuesta para la pregunta del título e intentar un aporte de evidencias genéticas que contribuyan a resolver la identidad taxonómica de las poblaciones argentinas.

### **1.1.2. Variación genética y Flujo génico**

Un concepto básico de la genética de poblaciones es el de la “población mendeliana”. Ésta se define como un conjunto de individuos interfértiles de la misma especie, que poseen un reservorio génico el cual es transmitido de generación en generación, conforme a las leyes de la herencia mendeliana.

Según el modelo enunciado por de la ley de Hardy-Weinberg, si estas poblaciones mendelianas son de tamaño grande, existe panmixia y no ocurren procesos tales como mutación, selección natural, deriva y flujo



génico entre poblaciones vecinas, entonces las frecuencias génicas y genotípicas se mantendrán estables en el tiempo.

Si en una determinada región se encuentra que coexisten dos o más entidades del rango de especie cercanamente emparentadas, esto implica que se han desarrollado entre ellas mecanismos de aislamiento reproductivo, delineados dentro del proceso evolutivo de dicho grupo. Por el contrario si estos mecanismos de aislamiento reproductivo no se han desarrollado, esto implica que entre las poblaciones debe existir algún grado de flujo génico.

La interrupción del flujo génico entre poblaciones de una misma especie da comienzo al proceso de especiación. Este puede ser simpátrico o alopátrico.

Ambas situaciones se dan en el denominado complejo de especies de *A. fraterculus*, según describen varios autores. Es el caso, por ejemplo, de Brasil donde coexisten simpátricamente entidades suficientemente aisladas desde el punto de vista genético como para considerarlas especies distintas (Morgante 1980, Selivon 1996).

También estaría ocurriendo esta interrupción del flujo génico entre poblaciones alopátricas de *A. fraterculus* según los ejemplos mencionados por Steck (1991).

Flujo génico es un término que indica transferencia de genes de una población a la otra. Esta transferencia ocurre generalmente por la migración de individuos, ya sea esta activa o pasiva, y la integración de esos individuos migrantes como miembros sexualmente activos de la población a la que emigran. En el caso de este organismo es muy probable, dada la falta de controles fitosanitarios entre las provincias de nuestro país, que ocurra una migración pasiva de moscas trasladadas en los frutos que transportan

los hombres de un lugar a otro.

Entre otras cosas, el grado de diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas va a depender de la intensidad con que ocurra este flujo génico.

### **1.1.3. Filogeografía**

El análisis de la variación genética de una determinada especie a lo largo de una distribución espacial dada supone el estudio de la variación geográfica de dicha especie o biogeografía.

Si este estudio implica además el análisis de los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes genealógicos, entonces estamos hablando de filogeografía (Avice 1994, Han y McPherson 2000).

Este análisis se aplica a nivel intraespecífico o de especies cercanamente emparentadas, e intenta revelar la historia del grupo en cuestión.

“En un sentido amplio, la filogeografía comprende los estudios filogenéticos de la distribución espacial de cualquier característica (morfológica, etológica, etc.); sin embargo en la actualidad la disciplina se basa principalmente en el análisis de ADN mitocondrial (ADNmt)” (Lanteri y Confalonieri 2003).

La introducción de datos provenientes del análisis del ADN mitocondrial produjo una revolución en la perspectiva filogenética de la

estructura de las poblaciones, debido al modo de herencia de este marcador (Awise 1994, Han y McPherson 2000).

El ADNmt, en la mayoría de los casos, se hereda en forma materna, no recombina y sus secuencias evolucionan rápidamente, lo que provee múltiples alelos o haplotipos que pueden ser ordenados filogenéticamente dentro de las especies.

Estos clones de ADNmt genéticamente relacionados pueden ser localizados geográficamente y tienden a estar contiguos o solapados (Awise 1994).

Probablemente la localización de clones de ADNmt relacionados en la mayoría de las especies refleja flujo génico entre estos clones o haplotipos. (Awise 1994).

#### **1.1.4. Las moscas de la familia Tephritidae como modelo de estudio en Genética de Poblaciones**

El ciclo de vida de las moscas de la familia Tephritidae tiene ciertas características distintivas que la convierten en un interesante modelo de estudio para la Genética de Poblaciones (ver Fig. 1.2).

Una vez que la hembra fertilizada pone los huevos en una fruta madura, las larvas permanecen dentro de ella hasta la finalización del tercer estadio larval, luego del cual emerge la pupa. De este modo el ambiente, durante el período que va de huevo a pupa, es discontinuo dado que los individuos tienen su movilidad restringida al fruto donde fueron ovipuestos.

Los adultos inmaduros, por el contrario, tienden a dispersarse en la búsqueda de agua y alimento en un ambiente que para ellos es continuo.

Tienen una capacidad de dispersión relativamente alta y alcanzan la madurez sexual aproximadamente a los diez días (Petit Marty y Vilardi 1999).

Es decir que las poblaciones naturales de esta especie, tal como sucede con muchas especies de parásitos, no ocupan un ambiente uniforme, ya que durante la generación larval la población se encuentra estructurada en un número finito de parches discretos, efímeros y heterogéneos (los frutos). (Civetta et al. 1990, 1995, Michalakis et al. 1993, Alberti et al. 1999, 2002).

Esto tiene una gran influencia en la distribución de la variación genética y el modo de acción de los mecanismos adaptativos. Lo cual es una consecuencia del muestreo al azar dentro de cada fruto del acervo de genes de la población total.

Es decir que la variabilidad genética dentro de cada fruto tenderá a ser baja en comparación con la de la población global lo cual limitará el modo de acción de la Selección Natural.

La dispersión vuelve a ser amplia, en cambio, durante la generación adulta lo que permitiría el apareamiento aleatorio. Este tipo de estructuración es similar al que se observa en otros organismos, como por ejemplo *Drosophila buzzatii* y otros insectos holometábolos, en los que la movilidad de las larvas está restringida. (Thomas y Barker 1990, Vilardi et al. 1994b).

El estudio de la estructura genética de *A. fraterculus* basado en la variación alozímica de adultos emergidos de guayabas en una población natural se realizó por primera vez en nuestro país en la localidad de Yuto, provincia de Jujuy. (Alberti et al. 1999)

El enfoque de la Genética de Poblaciones provee evidencia acerca de la estructura genética de las poblaciones de una especie y estos datos

pueden ser estudiados para discutir el movimiento de las poblaciones de una especie plaga a una escala local o global.

Es claramente un estudio fundamental para biólogos interesados en aspectos evolutivos básicos, desde la evolución de la preferencia por los hospedadores, el comportamiento, la morfología, la fisiología, hasta los mecanismos de especiación. Sin embargo, es también de decisiva importancia a la hora de estudiar aspectos más aplicados y relativos al manejo de la plaga (McPheron 2000-b).

La Genética de poblaciones puede entonces brindar información sobre el grado de variabilidad genética de las poblaciones mediante el estudio de sus frecuencias génicas y genotípicas.

Es también posible estimar el tamaño efectivo de las poblaciones, la tasa de migración entre poblaciones vecinas, el origen de las poblaciones colonizadoras o la ocurrencia de diferencias selectivas entre genotipos (Civetta et al. 1990). Asimismo, determinar si estamos en presencia de una población homogénea.

Todos estos aspectos son interesantes, tanto desde el punto de vista de un estudio básico como de un estudio aplicado, por ejemplo, la evaluación de los métodos más apropiados para controlar la plaga. Entre estos se destacan la Técnica del Insecto Estéril (TIE) y la liberación de parasitoides,

La TIE es un método de control genético que consiste en liberar al ambiente, infestado por moscas de la fruta, machos de una población de laboratorio criados masivamente y previamente esterilizados. Esta liberación de machos estériles de laboratorio tiene por objeto establecer la competencia con los machos silvestres en el apareamiento, logrando así que se produzcan un gran número de cópulas estériles y se reduzca drásticamente el número de individuos de la población en la siguiente generación.

La liberación de parasitoides es un método de control biológico que consiste en liberar himenópteros parasitoides al ambiente, los cuales parasitan a los estadios larvales de los tefrítidos impidiéndoles llegar a adulto, lo que también logra disminuir considerablemente la siguiente generación de moscas.

Para poder desarrollar ambos métodos será fundamental saber si la población está aislada o si recibe migrantes de poblaciones vecinas, si es estable y homogénea o, si por el contrario hay más de una entidad (variedad, raza, subespecie o especie) involucrada.

Esto es particularmente importante en el caso de la TIE, debido a que los mecanismos de aislamiento reproductivo adquiridos en el transcurso del proceso evolutivo harán imposible la cruce de los individuos de distintas poblaciones naturales con los criados en el laboratorio.

En el caso de los parasitoides será también fundamental saber si la poblaciones corresponden a una misma entidad taxonómica, ya que en algunos casos estos himenópteros pueden ser específicos de especie.

### **1.1.5. Herramientas moleculares para cuantificar la variabilidad genética**

Previamente al advenimiento de los avances en la Biología Molecular, las herramientas para el estudio de los organismos se basaban en la comparación de datos morfológicos, fisiológicos, etológicas y otras características fenotípicas analizables (Avisé 1994).

A partir de la década del '60 la Sistemática Molecular también empleó el método comparativo, pero la comparación involucraba directa o indirectamente a los ácidos nucleicos (Avice 1994).

### **a) Las Isoenzimas**

En 1966 tres laboratorios independientes (Harris, Johnson et al. y Lewontin y Hubby) publicaron la primera estimación de la variabilidad genética, basada en electroforesis de proteínas (Avice 1994). Contribuyeron de esta forma a la discusión entre la hipótesis Clásica y la hipótesis Equilibrada sobre la estructura genética de las poblaciones naturales, avalando en el laboratorio los postulados del equilibrio.

La escuela "Clásica" (Morgan, Müller, Goldschmidt) sostenía que los genes de una población estaban representados por su forma salvaje y se combinaban de manera homocigota para la mayor parte de los loci génicos. La escuela del "Equilibrio" (Dobzhansky, Ayala), por el contrario, enunciaba que el polimorfismo era considerable dentro de las poblaciones lo que implicaba la presencia de alelos distintos en muchos loci. Quedó demostrado mediante estos trabajos, y muchos otros basados en cruzamientos, que la variabilidad genética era mayor que la que predecía la escuela clásica. (Depew, 1995).

Con la técnica de la electroforesis de isoenzimas los genetistas de poblaciones no tardaron en definir y cuantificar dos estimadores básicos de la variación genética: la proporción de loci polimórficos en una población y el número promedio de loci heterocigotas de un individuo.

La electroforesis de isoenzimas se basa en la propiedad que tienen las proteínas, con diferentes cargas netas, de migrar en un campo eléctrico cuando son sembradas en un medio soporte.

Si posteriormente se aplica sobre el soporte una tinción histoquímica, se revelarán bandas denominadas electromorfos.

Al analizar estas bandas como fenotipos se está estimando indirectamente la constitución genética de los individuos.

De este modo se puede determinar el número de loci estructurales que codifican las proteínas analizadas, el porcentaje de loci polimórficos en la población, la proporción de loci heterocigotas por individuo, etc.

Esta metodología es una poderosa herramienta para detectar variabilidad en poblaciones naturales. Sin embargo esta técnica puede subestimar el grado de variación real. Por ejemplo, la sustitución de un aminoácido por otro en una proteína puede producir una variante con la misma movilidad electroforética que la anterior, y por lo tanto ambas resultarán indistinguibles (Harris y Hopkinson 1976).

## **b) El ADN**

La prueba más contundente de la apreciable variación genética llegó en los tempranos '80 con la explosión de datos aportados inicialmente por dos técnicas:

- 1) Restriction Fragment-Length Polymorphisms (RFLP) o Polimorfismo para el Largo de los Fragmentos de Restricción y



## 2) Secuenciación (Awise 1994).

Todos los análisis de RFLP involucran fragmentos de ADN generados por una o más endonucleasas de restricción, que luego son separados por su peso molecular en un gel electroforético.

Las diferencias entre individuos pueden resultar por la sustitución de una base en el sitio de corte de la enzima, adición o delección del ADN o rearrreglo de secuencias (Awise 1994).

La técnica de RFLP utilizada a partir de ADNmt es muy útil para estudiar variación en el nivel de especies, subespecies y poblaciones de muchos taxones (Steck y Sheppard 1993).

La secuenciación involucra el análisis más detallado de la estructura del ADN, ya que consiste en averiguar la secuencia de los nucleótidos que lo componen y es, por lo tanto, el método que mejor revela toda la variabilidad existente en un genoma.

A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes métodos para obtener la secuencia de nucleótidos del ADN, sin embargo, actualmente los más utilizados son el enzimático de terminación de cadena de Sanger también conocido como el método dideoxi (Sanger et al., 1977), y el de secuenciación automática.

El método de Sanger se basa en la terminación de la cadena de ADN por incorporación de nucleótidos dideoxi (dNTPs) y resulta más rápido y preciso que la secuenciación manual.

Los nucleótidos dideoxi son nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidroxilo en la posición 3' de la desoxirribosa. Estos nucleótidos pueden incorporarse a la cadena de ADN que se está sintetizando. Cuando esto ocurre no es posible que se una a ellos ningún

otro nucleótido por el extremo 3'. Por lo tanto, una vez incorporado un nucleótido didesoxi se termina la síntesis de la cadena de ADN.

Deben realizarse cuatro mezclas en sendos tubos de ensayo, conteniendo cada uno todo lo necesario para la formación de la doble hélice, más uno de los cuatro nucleótidos didesoxi en cada tubo.

Por este sistema, en cada mezcla de reacción se producen una serie de moléculas de ADN de nueva síntesis de diferente longitud, que terminan todas en el mismo nucleótido, marcadas radiactivamente por el extremo 5'.

Los fragmentos de ADN de nueva síntesis obtenidos en cada mezcla de reacción se separan por tamaños mediante electroforesis en geles verticales de acrilamida que permiten distinguir fragmentos de ADN que se diferencian en un solo nucleótido. Una vez terminada la electroforesis, se obtiene una autorradiografía, donde la aparición de una banda en una posición concreta, en una de las cuatro calles, indica que en ese punto de la secuencia del ADN está la base correspondiente al nucleótido didesoxi utilizado en la mezcla de reacción correspondiente.

Teniendo en cuenta que el ADN de nueva síntesis crece en la dirección 5' - 3', si comenzamos a leer el gel por los fragmentos de menor tamaño, extremo 5', y avanzamos aumentando el tamaño de los fragmentos hacia 3', obtendremos la secuencia del ADN de nueva síntesis en la dirección 5' - 3'.

La principal diferencia entre el método enzimático de terminación de cadena y el método automático de secuenciación, radica en el tipo de marcaje. En el método automático en vez de radiactividad se utiliza fluorescencia y lo habitual es realizar cuatro mezclas de reacción, cada una con un nucleótido trifosfato (dTTP) marcado con un fluorocromo distinto. Este sistema permite automatizar el proceso de manera que es posible leer al mismo tiempo los ADNs de nueva síntesis producto de las cuatro

mezclas de reacción. El color de cada banda corresponde al del dideoxinucleótido 3' terminal de ese fragmento. No sólo pueden detectarse los cuatro colores terminada la separación electroforética, sino que a medida que ésta transcurre, el detector puede medir la presencia de las bandas que van pasando por el haz láser y su color.

Se genera así un registro informatizado de los cuatro perfiles de color que, combinados, se interpretan como una secuencia.

Tanto la metodología de los RFLPs como la secuenciación son muy poderosas si además se asocian a otra: la Polymerase Chain Reaction (PCR) o Reacción en Cadena de la Polimerasa, ya que resulta mucho más sencillo y rápido amplificar que clonar. Por otro lado la gran sensibilidad de la PCR permite con muy poca cantidad de ADN obtener muchas copias del fragmento analizado (Awise 1994).

En particular, el ADN mitocondrial (ADNmt) posee ciertas características que lo hacen muy útil en los estudios filogenéticos y poblacionales.

Se trata de una molécula circular, típicamente de 15-20 Kilo-bases (Kb) de longitud, compuesta de alrededor de 37 genes que codifican para 22 ARN de transferencia (ARNt), 2 ARN ribosómicos (ARNr) y 13 ARN mensajeros (ARNm).

Estos genes codifican para proteínas específicas que actúan en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa.

Existe además una "región de control" de alrededor de 1 Kb que inicia la replicación y la transcripción (Clary et al. 1985, Beard et al. 1993, Awise 1994, Simon et al. 1994).

Estos marcadores mitocondriales presentan muchas ventajas ya que son fáciles de manipular, se heredan como clones, son de copia simple, no

recombinantes y abundantes.

Estudios tempranos en mamíferos y otros posteriores en nematodos y en *Drosophila*, demostraron que la tasa promedio de evolución del genoma mitocondrial es 5 - 10 veces más alta que la del genoma nuclear (Beard et al. 1993, Simon et al. 1994).

Existen numerosas moléculas de ADNmt en una sola célula. Los individuos son generalmente homoplásmicos, es decir, con una sola secuencia de ADNmt en todos sus tejidos, probablemente debido a un cuello de botella en el número de copias de ADNmt en las generaciones intermedias de células germinales (Avice 1994).

Las distintas regiones del ADNmt evolucionan a diferentes tasas. Por ejemplo, la región de control cambia muy rápidamente dentro y entre especies, sin embargo, las regiones que codifican para los ARNr cambian muy lentamente, con secuencias que se conservan casi idénticas entre regiones homólogas de procariotas y eucariotas.

Esta heterogeneidad en la frecuencia de cambio en las distintas regiones es la causa por la cual el ADNmt puede ser usado tanto en filogenia de poblaciones como de taxones de rango superior (Avice 1994, Han et al. 2000).

Por último, las mitocondrias se heredan por vía materna, salvo muy raras excepciones, por lo que los genotipos mitocondriales representan caracteres no recombinantes asexualmente transmitidos por las hembras.

Por eso para referirse al genotipo mitocondrial se habla de clon o haplotipo (Avice 1994, Han et al. 2000).

## 1.2. Acerca de *Anastrepha fraterculus*

La Mosca Sudamericana de La Fruta es un díptero perteneciente a la Familia Tephritidae. Ha sido colocada en el grupo *fraterculus*, que reúne aproximadamente treinta especies, entre las que se encuentran: *A. obliqua*, *A. sororcula* y *A. zenilda*, que presentan el ápice del ovipositor muy semejante al de *A. fraterculus*. (Hernández-Ortiz, 1992, Norrbom 1988)

A continuación se detalla su clasificación:

### 1.2.1. Ubicación taxonómica

Phylum: ARTROPODA

Clase: INSECTA

Subclase: HOLOMETABOLA

Orden: DIPTERA

Super familia: TEPHRITOIDEA

Familia: TEPHRITIDAE

Subfamilia: TRYPETINAE

Tribu: TOXOTRYPANINI

Grupo: FRATERCULUS

Especie: *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann)

### 1.2.2. Algunos aspectos de su biología

Los insectos de la familia Tephritidae son fitófagos. Las hembras de estos dípteros depositan sus huevos en tejidos vegetales vivos.

Dentro de esta familia algunos géneros utilizan la pulpa de los frutos como sustrato para el desarrollo de las larvas. Estos géneros son: *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus*, *Ragoletis* y *Toxotrypana*. Todos ellos son plagas de árboles frutales (Morgante 1991, Selivon 1996).

*Anastrepha* Shiner es el género más grande y económicamente importante de la familia Tephritidae en América (Norrbom y Kim 1988).

Este género neotropical es autóctono y endémico de América. Se lo considera probablemente originario de Sudamérica con posterior dispersión hacia el norte del continente. Esta estinación se basa en la mayor diversidad específica y la amplia gama de hospederos halladas en el sur del continente (Hernández-Ortiz 1992, Aluja 1994, Salles 1995).

Morgante y colaboradores en 1980 sugirieron que algunas de las especies del género son relativamente jóvenes y que la especiación fue rápida y reciente.

El género *Anastrepha* incluye alrededor de ciento ochenta especies pobremente conocidas desde el punto de vista biológico.

El conocimiento del género se reduce a las siete especies de importancia económica. Estas son: *A. fraterculus*, *A. grandis*, *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina*, *A. striata* y *A. suspensa* (Norrbom y Kim 1988, Steck 1991, Hernández-Ortiz 1992, Aluja 1994).

La identificación de las especies se basa casi exclusivamente en la morfología del ápice del ovipositor de las hembras adultas, y también en las

variaciones del patrón de manchas alares, aunque esta última característica por sí sola no es suficiente para discriminar especies (Salles 1995).

En Argentina se encontraron treinta especies pertenecientes a la familia Tephritidae que infestan árboles frutales nativos e introducidos (Rosilio 1953, Hayward 1960, Turica y Mallo 1961, Blanchard 1961, Norrbom y Kim 1988, Hernández-Ortiz y Aluja 1993).

Dentro del género existen dieciocho grupos taxonómicos basados en caracteres morfológicos. Entre ellos encontramos el grupo *Fraterculus*, que a su vez comprende veintisiete especies (Zuchi 1981, Norrbom y Kim 1988, Hernández-Ortiz 1992, Hernández-Ortiz y Aluja 1993). Una de estas especies es *A. fraterculus* (Wiedemann), conocida vulgarmente como la “Mosca Sudamericana de la Fruta”.

Esta especie está ampliamente distribuida a lo largo de las regiones tropicales y subtropicales de América, desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, incluyendo la mayoría de las islas del Caribe. (Norrbom y Kim 1988, Steck 1991, Hernández-Ortiz 1992, Aluja 1994).

Sin embargo, se recuperaron adultos de *A. fraterculus* de frutas infestadas a latitudes más bajas, en poblaciones cercanas a la ciudad de Buenos Aires (34° 40' S) (Vilardi et al. 1994a, Alberti et al. 1999, 2002).

Las principales características morfológicas de esta especie se pueden ver en la fig 1.1. En la misma se puede apreciar el dimorfismo sexual, el cual radica fundamentalmente en la última porción del abdomen. Mientras que en las hembras ésta es puntiaguda, por la presencia del ovipositor, en los machos tiene forma redondeada. También el tamaño general del cuerpo constituye una diferencia, siendo las hembras más grandes que los machos. El adulto mide, en promedio, 7mm de longitud y 16 mm de envergadura de alas. (Salles1995). (Fig. 1.1).

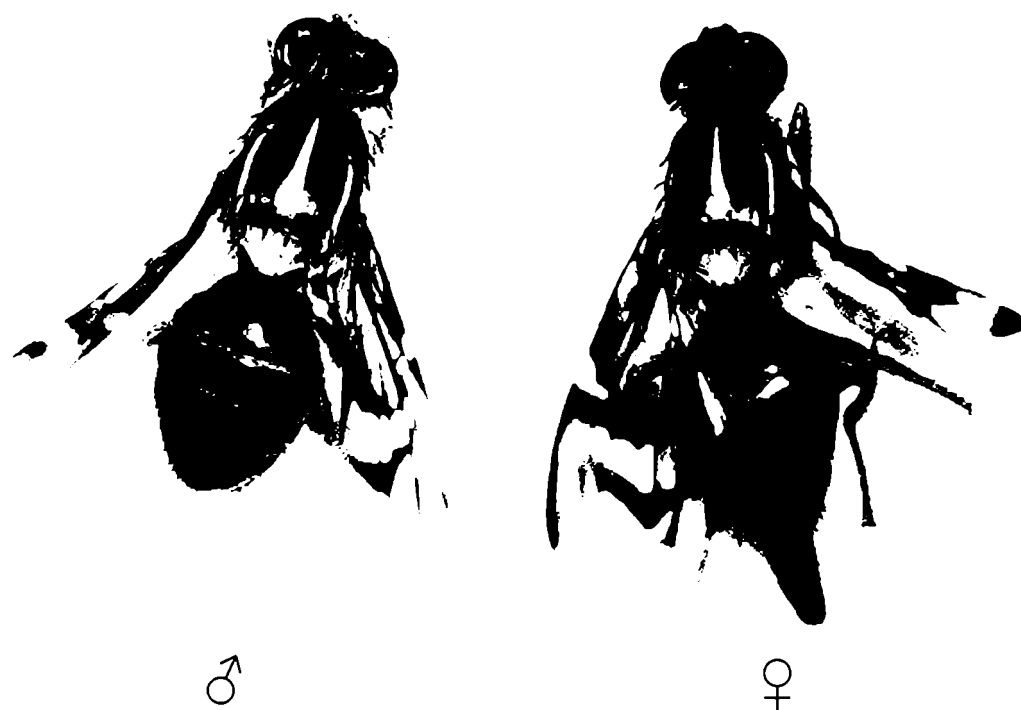


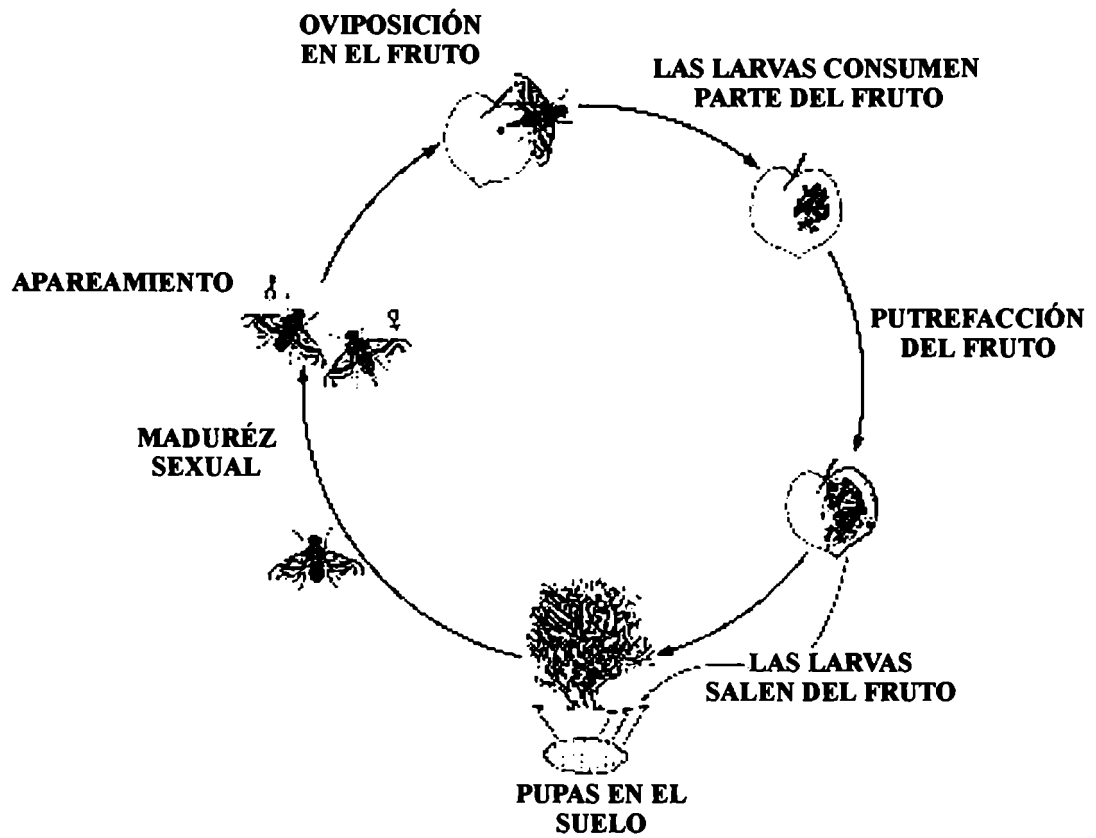
Fig. 1.1: Macho y Hembra de *A fraterculus*. (Allinghi 2002).



Como el resto de los tefritidos, los insectos de esta especie son holometábolos, es decir que su ciclo de vida comprende una metamorfosis completa.

Por medio del ovipositor la hembra perfora la piel de los frutos para oviponer, depositando los huevos en la región del epicarpio o mesocarpio. Estos se desarrollan en tres estadios larvales que se alimentan del fruto.

La larva del tercer estadio sale del fruto y empupa en el suelo. Esta pupa se transforma luego en un adulto de vida libre, reiniciando el ciclo de vida (Morgante 1991, Aluja 1994, Salles 1995). (Fig.1.2).



**Fig. 1.2:** Ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus*. (Salles 1995).

En condiciones de laboratorio, con dieta artificial, temperatura constante de 25°C y 70-80 % de humedad relativa, el período que va desde el huevo hasta la emergencia del adulto es de treinta días para machos y treinta y dos días para hembras. Esta cantidad de tiempo es altamente dependiente de la temperatura y humedad, siendo estos dos factores abióticos, junto con la disponibilidad de hospedadores, los reguladores más importantes de la dinámica poblacional (Salles 1995). La madurez sexual se alcanza aproximadamente a los diez días de la emergencia del adulto (Petit y Vilardi 1999).

Tanto los estadios inmaduros como el adulto requieren vitaminas, aminoácidos, minerales, carbohidratos y agua para desarrollarse, sobrevivir y reproducirse. Tales nutrientes son obtenidos en la naturaleza de los líquidos provenientes de frutas en descomposición, heces de aves, gotas de lluvia, hojas y superficies de frutas. (Morgante 1991, Aluja 1994, Salles 1995).

La longevidad de los adultos en la naturaleza no se conoce, pero en condiciones de laboratorio (25°C, 60-80% de humedad relativa y 16 hs. de luz) viven hasta 170 días. Se estima que en la naturaleza esta cifra sería menor, sin embargo, comparadas con otros insectos, las moscas de la fruta se consideran longevas (Aluja 1994, Salles 1995).

Los adultos, de vida libre, utilizan los frutos cuando estos aún están en el árbol, como sitios de cría y alimentación.

Tanto la perforación del fruto, mediante el ovipositor de la hembra que puede originar el ingreso de organismos oportunistas (bacterias y virus), así como la alimentación de las larvas por medio de la pulpa del fruto, son las causantes de una gran disminución en la cosecha.

Estas pérdidas, sumadas a las restricciones que ponen la mayoría de los países para la compra de frutos libres de moscas, provocan un enorme daño económico.

Se la considera junto con *Ceratitis capitata*, la “Mosca del Mediterráneo”, como las de mayor importancia económica en Argentina. (Rosilio 1953, Blanchard 1961, Turica y Mallo 1961, Hernández-Ortiz y Aluja 1993).

*A. fraterculus* utiliza como hospederos tanto árboles frutales silvestres como cultivados, entre los que pueden encontrarse algunas plantas nativas y otras introducidas. Se la describe como altamente polífaga, con una gran gama de hospederos constituida por más de 90 especies distintas de árboles frutales, es decir, que se trataría de una especie generalista. Como tal, posee una alta movilidad (vagilidad) que le permite la búsqueda de nuevos hábitats y hospederos.

Esta característica ha influido notablemente en su diversificación en el continente americano y en el patrón de su distribución geográfica (Norrbon y Kim 1988, Hernández-Ortiz y Aluja 1993, Aluja 1994, Salles 1995).

Entre las especies de hospederos nativos, los pertenecientes a la familia Myrtaceae son citados como los de mayor preferencia por *A. fraterculus*, ej.: *Psidium guajava* L. (guayaba) y *Eugenia uniflora* L. (pitanga).

Entre las plantas introducidas podemos citar: *Coffea arabica* L. (café), *Eriobotrya japonica* (Thunberg) (níspero), *Mangifera indica* L. (mango), *Prunus persica* L. (durazno), y varios cítricos (Norrbon y Kim 1988, Morgante 1991, Hernández-Ortiz y Aluja 1993). Se considera que existen dos clases de hospederos: los multiplicadores, que producen una gran cantidad de moscas, y los alternativos o de supervivencia, que son infestados

sólo ocasionalmente y generan bajas cantidades de individuos.

Estas dos clases de hospederos varían según las distintas regiones de su distribución geográfica (Salles 1995).

### 1.2.3. El problema de su estado taxonómico

Varios autores sugieren que *Anastrepha fraterculus* no sería una única especie biológica, sino un grupo heterogéneo de entidades al que han denominado complejo de especies, (Baker et al. 1944, Morgante et al. 1980, 1985, Steck 1991, Selivon 1996).

Los fundamentos que sostienen esta hipótesis se basan en la presencia de variaciones morfológicas, genéticas, cariotípicas, diferencias en las preferencias respecto de las plantas hospederas, e incluso en cierta evidencia de aislamiento reproductivo entre poblaciones simpátricas a lo largo de su extensa distribución geográfica.

Esta variación ha generado varios sinónimos: *A. fraterculus* (Wied., 1830), *Dacus fraterculus* (Wied, 1830), *Tephritis mellea* (Walker, 1837), *Trypeta unicolor* (Loew, 1862), *Anthomya frutalis* (Weyenbergh, 1874), *A. soluta* (Bezzi, 1909), *A. peruviana* (Townsend, 1913), *A. distincta* (Greene, 1934), *A. trinidadensis* (Greene, 1934), *A. brasiliensis* (Greene, 1934), *A. pseudofraterculus* (Cappor, 1995), etc. (Zucchi, 1981, Hernández-Ortiz 1992).

McPheron (2000-b) dice que la evolución de una única característica, ecológica o etológica, con pequeñas variaciones morfológicas, o directamente sin ellas, entre poblaciones, lleva a la existencia de complejos de especies

gemelas o crípticas.

Stone en 1942, en una extensa revisión del género observó una variación morfológica importante, pero se mantuvo en una posición conservadora considerando que se trataba de razas geográficas de una única especie biológica. Sin embargo sugirió la existencia, en ocasiones, de dificultades a la hora de determinar los límites de especie entre poblaciones, dejando abierta la posibilidad del complejo de especies.

Baker y colaboradores en 1944 propusieron que las poblaciones de *A. fraterculus* de México y Sudamérica deberían ser consideradas como dos especies diferentes tanto por su morfología como por sus preferencias alimentarias.

Morgante y colaboradores en 1980, trabajando en colecciones brasileñas mostraron un sustancial grado de diferenciación genética en poblaciones simpátricas, mientras que poblaciones geográficamente aisladas revelaron un alto grado de similitud, sugiriendo que para la zona en estudio podrían existir cuatro diferentes taxones enmascarados en la denominación *A. fraterculus*.

Steck en 1991, estudiando la variabilidad genética de la Mosca Sudamericana de la Fruta en poblaciones de Brasil, Perú y Venezuela, encontró que existía entre ellas un significativo grado de diferenciación y propuso que la denominación *A. fraterculus* correspondiera a un grupo polifilético de especies sinmórficas.

También Hernández-Ortiz en 1992 habla de una gran variación en la morfología del ovipositor dentro de *A. fraterculus*, y en el patrón de coloración alar.

Desde el punto de vista morfológico se observan algunas variaciones, por ejemplo, en el patrón de bandas alares. Se conocen por lo menos tres,

asociados a diferentes secciones de su distribución geográfica. Uno de ellos se observa en Brasil, el segundo en otras regiones de Sudamérica y el tercero en América Central (Steck 1991).

Selivon (1996) encuentra, estudiando poblaciones de esta especie en distintas localidades de Brasil, dos grupos a los que denomina I y II que presentan divergencias genéticas significativas (equivalentes a las esperadas para especies distintas). Ambos grupos (I y II) muestran también evidencias de aislamiento reproductivo, cariotipos específicos y diferencias morfológicas.

Todos estos autores expresan las dificultades taxonómicas que presenta este grupo y esto podría indicar que, al menos en algunos casos, las poblaciones que denominamos actualmente *A. fraterculus* incluirían grupos con un grado variable de aislamiento reproductivo.

Estaríamos, entonces, en presencia de un complejo de especies crípticas dentro del género *Anastrepha*, como los anteriormente descritos dentro de la familia Tephritidae para los géneros *Bactrocera* y *Rhagoletis*.

### 1.3. Objetivos

Los objetivos planteados fueron:

1) Analizar la variación genética y estructura poblacional de la Mosca Sudamericana de la Fruta en distintas poblaciones naturales pertenecientes a diferentes localidades y hospederos de nuestro país y en una población de la ciudad de Pelotas, Brasil.

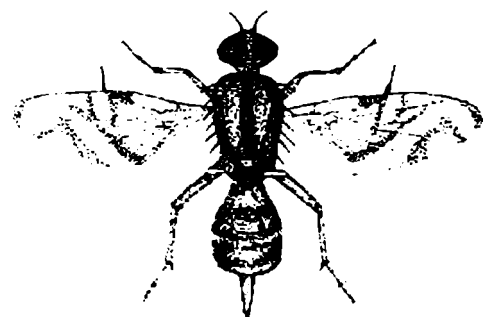
2) Estudiar la correlación entre la distribución geográfica de las distintas poblaciones naturales muestreadas y su variación genética.

3) Establecer si las poblaciones estudiadas en Argentina, constituyen una única especie biológica o por el contrario, tal como sucede en otras regiones del continente, conforman un complejo de especies.

4) Contribuir de este modo a la discusión sobre el estado taxonómico de las poblaciones argentinas de *A. fraterculus* y poner a prueba la hipótesis del “Complejo de Especies Crípticas” en nuestro territorio.



# 2. *Material y Métodos*



## 2.1. Materiales

### 2.1.1. Poblaciones y hospederos

Las poblaciones muestreadas fueron elegidas tratando de abarcar, dentro de lo posible, la distribución geográfica de la Mosca Sudamericana de la Fruta, *Anastrepha fraterculus*, en nuestro país.

Se utilizó para ello el registro bibliográfico (Rosilio 1953, Hayward 1960, Turica y Mallo 1961, Blanchard 1961, Norrbom y Kim 1988, Hernández-Ortiz y Aluja 1993), y la información obtenida en organismos estatales adecuados: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), y Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).

Los sitios seleccionados correspondieron a montes frutales del INTA (**Castelar y Yuto**), huertos particulares (**Horco Molle, San Javier, Aicuña, Merlo, Posadas, Concordia, Ministro Rivadavia, Moreno, Mercedes e Ituzaingo**), un Parque Nacional (**El Palmar**) y una muestra gentilmente donada por el Dr. Luis Salles, proveniente de la ciudad de **Pelotas** (Brasil).

Desde el punto de vista biogeográfico, todas las localidades pertenecen a la Región Neotropical. Dentro de esta región encontramos dos dominios, los cuales a su vez se subdividen en provincias:

Dominio Amazónico:

Provincia de las Yungas: **Yuto, Horco Molle y San Javier.**

Provincia Paranaense: **Posadas.**

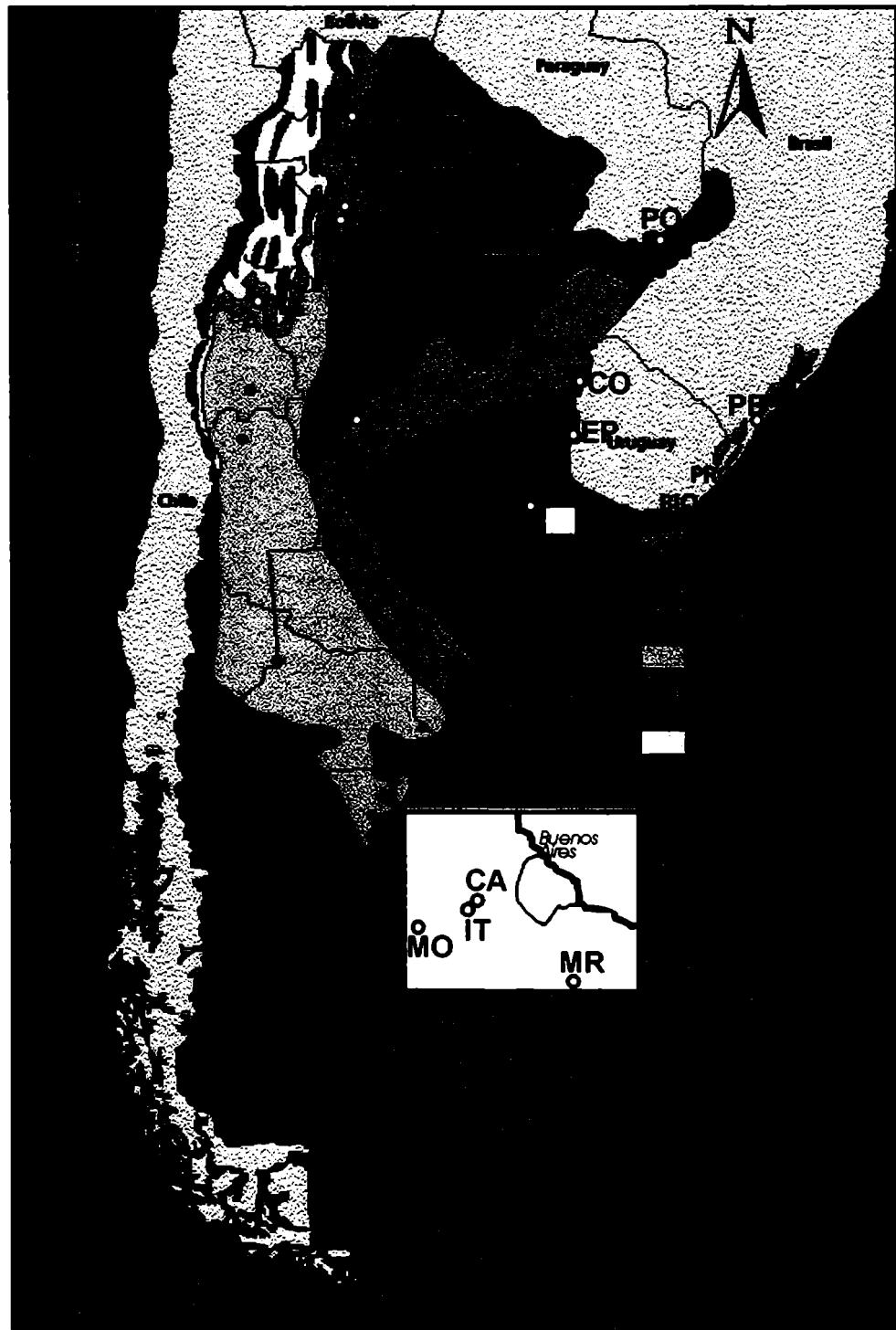
Dominio Chaqueño:

Provincia Monte-Prepuna: **Aicuña.**

Provincia Espinal: **Merlo.**

Provincia Pampeana: **Concordia, El Palmar, Moreno, Castelar, Ituzaingo, Mercedes, Ministro Rivadavia y Pelotas.**

(Cabrera y Willink 1980). (Ver fig. 2.1 y tabla 2.1).



**Fig.2.1:** Provincias biogeográficas y localidades muestreadas de las poblaciones de *A. fraterculus*. Ver referencias en tabla 2.1

**Tabl a 2.1: Localización geográfica, biogeográfica, plantas hospederas y metodologías empleadas en cada sitio muestreado de *A. fraterculus***

DISTRIBUCIÓN BIOGEOGRÁFICA		Localidad (Símbolo)	Provincia	Coordenas	Plantas hospederas	Método
AMAZONICO	LAS YUNGAS	HORCO MOLLE (HM)	Tucumán	26° 48' 65° 20'	D	I-PR-S
		SAN JAVIER (SJ)	Tucumán	26° 47' 65° 23'	D	PR
	PARANAENSE	YUTO (YU)	Jujuy	33° 38' 64° 27'	GA	I-PR-S
		POSADAS (PO)	Misiones	27° 23' 55° 52'	GA	I-PR-S
		AICUÑA (AI)	La Rioja	29° 06' 67° 42'	D	I-PR
		MERLO (ME)	San Luis	32° 21' 65° 02'	GA	PR-S
		CONCORDIA (CO)	Entre Ríos	31° 02' 58° 09'	GA	I-PR-S
		EL PALMAR (EP)	Entre Ríos	31° 59' 58° 14'	GA	PR
		ITUZAINGO (IT)	Buenos Aires	34° 39' 58° 40'	GA	I-PR
		CASTELAR (CA)	Buenos Aires	34° 39' 58° 38'	GV	I-PR-S
CHAQUEÑO	PAMPEANA	MERCEDES (Mer)	Buenos Aires	34° 40' 59° 27'	C	PR
		MINISTRO RIVADAVIA (MR)	Buenos Aires	34° 50' 58° 22'	D-C-N	I-PR-S
	MORENO (MO)	Buenos Aires	34° 38' 58° 48'	D	I-PR	
	PELOTAS (PE)	Río Grande do Sul	31° 46' 52° 21'	GA	PR-S	

Referencias:

- C: ciruela
- D: durazno
- GA: guayaba amarilla
- GV: guayaba verde
- N: níspero
- I: Isoenzimas
- PR: PCR-RFLP
- S: Secuenciación

Los hospederos muestreados fueron: guayabas amarillas (*Psidium guayaba* L.), falsa guayaba o guayaba verde (*Feijoa sellowiana* Berg.), duraznos (*Prunus persica* L.), ciruelas (*Prunus salicina* Lindl.) y nísperos (*Eriobotrya japonica* Thumb). (Ver Tabla 2.1).

### 2.1.2. Colección de los individuos

El método de colección consistió en revisar algunos frutos del árbol que se sospechaba pudiera estar infestado, para tratar de detectar la presencia de larvas. Una vez determinada se procedía a coleccionar la mayor cantidad posible de fruta con signos de ataque por moscas de ese árbol y otros vecinos, para que la muestra fuera lo más representativa posible de la población en estudio.

Los frutos infestados se trasladaron a Buenos Aires, debidamente acondicionados en cajas de cartón con un lecho de arena, para evitar la descomposición.

Una vez en el laboratorio las muestras fueron tratadas, de acuerdo al objetivo del análisis que se fuera a desarrollar, de dos formas diferentes:

- a) Para el estudio de la estructura genética de la población colectada en Yuto los frutos fueron colocados de a uno, sobre una rejilla metálica en frascos con un lecho de arena en el fondo y tapados con tela de malla gruesa para evitar la contaminación por otros insectos, especialmente *Drosophila melanogaster*, y facilitar una buena ventilación. Esta tarea se realizó en el Campo

Universidad de Buenos Aires.

- b) Cuando se quiso, por distintas metodologías, analizar la variabilidad genética, los frutos fueron separados en pequeños grupos de 10, acondicionados sobre una rejilla plástica, la que a su vez se colocaba en bandejas del mismo material con un lecho de arena en el fondo. Al igual que los frascos, y por los mismos motivos, las bandejas fueron tapadas con una tela de malla gruesa. Esta tarea se realizó en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires para el estudio isoenzimático y en el Departamento Genética del INTA de Castelar para los estudios de ADN.

Periódicamente (cada dos días) se procedía al examen de los frascos y bandejas con el objeto de recuperar las pupas que hubieran salido de los frutos. Para ello se tamizaba cuidadosamente la arena y las pupas obtenidas eran colocadas en frascos de vidrio. Éstos se trasladaban a una cámara de cría con más de 60 % de humedad relativa, temperatura controlada (25° C) y un ciclo de luz-oscuridad (14-10 hs).

Los adultos emergidos a partir de estas pupas, eran mantenidos durante 3 ó 4 días en frascos de 3000 cm<sup>3</sup> de capacidad con una fuente de alimento (azúcar negra y proteína hidrolizada, 2:1) y una de agua (agar al 1%).

Una vez finalizado el período de cría los adultos se adormecían con frío (a 4°C), y luego se congelaban en un termo con aire líquido para su preservación y posterior análisis.

Toda vez que los individuos se sacaban del termo con aire líquido para realizar alguna de las técnicas descritas más abajo, primero se determinaba su sexo y luego se procedía a realizar una disección consistente en reservar el abdomen, con especial cuidado de la zona de la genitalia (cuando se trataba de una hembra) y las alas (en ambos sexos), con el objeto de poder hacer la determinación taxonómica, ya que ambas regiones del cuerpo se consideran claves a la hora de clasificar tefrítidos.



## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Electroforesis de isoenzimas**

Para los estudios de variabilidad genética y estructura poblacional se utilizaron marcadores isoenzimáticos, según las técnicas convencionales descritas por Harris y Hopkinson en 1976, modificadas para tefritos por Malavasi y Morgante en 1982.

Se llaman isoenzimas a las distintas formas moleculares de una enzima que catalizan la misma reacción. Las enzimas, por ser proteínas, tienen la capacidad de migrar en un medio soporte cuando éste es sometido a una diferencia de potencial eléctrico y esta migración va a depender de su carga neta y de su peso molecular.

Esta técnica se basa en el principio de que el producto primario de un gen es un polipéptido. Es decir que el análisis de las proteínas sería una primera aproximación al estudio del gen. Entonces, los fenotipos observados en el gel pueden interpretarse en términos de genotipos.

Los imagos fueron homogeneizados en 0.1 ml de un tampón de extracción. Se embebieron trozos de papel Wahtman N°3 de 2 x 5 mm en cada homogenato y posteriormente se sembraron en geles horizontales de poliacrilamida al 7%.

Para la separación electroforética se usaron cubas apropiadas de acrílico, conteniendo un tampón de corrida a las que se les aplicó un campo eléctrico de 100 V x cm, a una temperatura de 4°C durante 5 horas.

Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles se incubaron a 37°C durante 1 hora aproximadamente, con los tampones, sustratos y colorantes apropiados según la enzima que se quería revelar. (Ver Apéndice I)

Se fijaron luego en alcohol etílico: agua: ácido acético (5:5:1), para la posterior interpretación genética de las bandas.

Se estudiaron 9 sistemas isoenzimáticos, los cuales se detallan a continuación junto con los números de código enzimático IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) :

EC 1.1.1.21 Aldehído oxidasa (*Ao*)

EC 3.4.11.1 Aminopeptidasa (*Amp*)

EC 1.1.1.40 Enzima málica (*Me*) EC

EC 3.1.1.1 Esterasa (*Est*)

EC 2.6.1.1 Glutamato oxalacetato transaminasa (*Got*)

EC 1.1.1.37 Malato deshidrogenasa (*Mdh*)

EC 1.6.99.2 Menadione reductasa (*Mnr*)

EC 1.4.1.2 Phospho glutamato isomerasa (*Pgi*)

EC 1.1.1.44 6-Phospho gluconato deshidrogenasa (*6-Pgd*).

(Ver Apéndice I)

### **2.2.2. ADNmt**

Se analizaron fragmentos del ADNmt pertenecientes a dos genes: el que codifica para la subunidad ribosómica 16S y el que lo hace para la enzima citocromo oxidasa II (COII) respectivamente.

Las técnicas empleadas fueron:

- a) PCR – RFLP (gen ribosómico 16S)
- b) Secuenciación (gen ribosómico 16S y COII)

### **2.2.3. Extracción de ADN**

Para desarrollar ambas metodologías el primer paso consistió en extraer el ADN total a partir de individuos adultos. Se utilizó un protocolo que resulta útil tanto para material fresco, congelado, pinchado o en alcohol (Baruffi et al. 1995). (Ver Apéndice II)

### **2.2.4. PCR**

Una vez extraído el ADN de una muestra de individuos pertenecientes a una población, se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando los cebadores que se detallan a continuación.

Gen ribosómico 16S:

LR-J-12883: 5' CTC CGG TTT GAA CTC AGA TC 3'

LR-N-13398: 5' CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT 3'

(Xiong y Kocher, 1991).

Gen COII:

COII S: 5'GGT CAA ACA ATT GAG TCT ATT TGA AC 3'

COII A: 5' CCA CAA ATT TCT GAA CAT TGA CCA 3'

(Litzanberger y Chapco 2001).

En todos los casos las amplificaciones se realizaron incluyendo un blanco, o control negativo, con todos los reactivos, pero sin el ADN.

Para verificar si la reacción de amplificación fue exitosa los productos amplificados se mezclaron con tampón "loading" y se sembraron en geles de agarosa al 1% en 170 ml de tampón TAE 1X, realizándose luego una corrida electroforética. Los geles se prepararon con 5 µl de Bromuro de Etidio y el ADN se reveló con luz UV ( $\lambda = 312$  nm). (Ver Apéndice II).

En el caso del gen ribosómico 16S, el fragmento amplificado comprende una región de aproximadamente 500 pb de acuerdo con la información disponible en el GeneBank (AF152067 y AF152066). En cambio para gen COII el fragmento amplificado consta de aproximadamente 400 pb.

### 2.2.5. Análisis de fragmentos de restricción (RFLP)

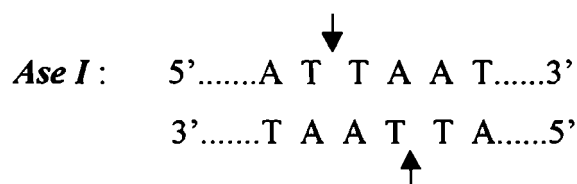
Se utilizó la metodología de PCR + RFLP, según técnicas descriptas para distintos tefrítidos. (Steck y Sheppard 1993, Haymer y McInnis 1993, McPheron et al. 1994, 1995, 1997, Han y McPheron 1997).

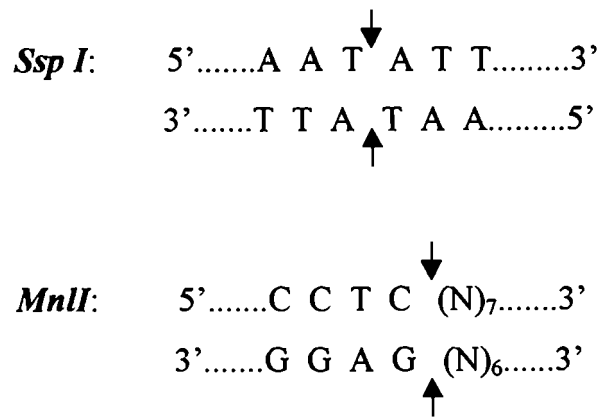
Esta técnica consiste en digerir la región amplificada del ADN por PCR con endonucleasas de restricción, usualmente de cuatro, cinco o seis pares de bases. Estas enzimas cortan al ADN en sitios específicos cuya presencia o ausencia es analizada como un “locus”, y constituye una herramienta útil para estudiar variabilidad poblacional. Los fragmentos obtenidos son separados de acuerdo a su peso molecular mediante geles de poliacrilamida.

La digestión se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante en 15- µl de reacción usando 10 µl del ADN amplificado.

En este caso el producto de la PCR fue digerido con tres endonucleasas de restricción: *Ase I*, *Ssp I* y *Mnl I* (New England Biolabs Inc. Beverly, Ma. USA).

Los sitios de reconocimiento de las enzimas utilizadas son los que se indican en el siguiente esquema:





La elección de estas tres enzimas se basó en los resultados de McPheron (2000-a) los que mostraron variación entre poblaciones de Bertioiga (Brasil) y Mérida (Venezuela) en el número esperado de sitios de restricción, de acuerdo con las secuencias disponibles en el GenBank (AF152067 y AF152066, respectivamente). (Ver Apéndice II).

### 2.2.6. Secuenciación

Los productos de amplificación se secuenciaron según la metodología de secuenciación automática convencional basada en una modificación de la introducida por Maxam y Gilbert (1977, 1980) y Sanger y colaboradores en 1977.

El método de Sanger (1977) se conoce como método de los terminadores de cadena o dideoxi. Para este método resulta esencial disponer de un ADN de cadena simple (molde) y un iniciador, cebador o "primer" complementario de una región del ADN molde anterior a donde va a iniciarse la secuencia. Este cebador se utiliza como sustrato de la enzima

ADN polimerasa I que va a extender la cadena copiando de forma complementaria el molde de ADN.

La secuenciación automática es una alternativa al método de Sanger. Consiste en marcar el oligo cebador o los terminadores con un compuesto fluorescente y activar la reacción de secuencia.

Los productos de la reacción se detectan directamente durante la electroforesis al pasar por delante de un láser que al excitar los fluoróforos permite detectar la fluorescencia emitida.

Esta técnica fue desarrollada con el secuenciador automático del Laboratorio de Servicios de Biología Molecular de Alta Complejidad del INTA Castelar que dirige el Dr. Rubén Sandomeni.

Las secuencias se editaron mediante el programa BioEdit (Hall, T.A. 1999). La siguiente figura muestra un cromatograma obtenido mediante el mencionado programa:





Esos índices  $F$  fueron definidos por Wright (1951, 1965) como la correlación entre la unión de gametas relativa a las subpoblaciones (frutos) ( $F_{IS}$ ) y relativa a la población total ( $F_{IT}$ ).

Por otro lado,  $F_{ST}$ , es la correlación al azar de las gametas dentro de cada subdivisión relativa a la población total.

El método de Nei y Chesser's (1983) plantea una reformulación de esos índices definida en función de los heterocigotos observados y esperados. Ambos métodos brindan resultados similares en el análisis de los estadísticos  $F$ .

La significación de los  $F_{IS}$  estimados fue analizada por el método de Li y Horvitz's (1953).

La significación de los valores  $F_{ST}$  fue estimada por medio de una prueba  $X^2$  de heterogeneidad de frecuencias alélicas entre subpoblaciones (frutos).

Los  $F_{IT}$  estimados fueron evaluados por una prueba  $X^2$  de bondad de ajuste a las frecuencias esperadas por la expresión de Hardy-Weinberg.

Para loci neutros la diferenciación al azar entre sustratos puede ser evaluada por medio de la correlación entre las frecuencias alélicas, basada en Nei (1965) (Santos et al. 1989). Las frecuencias de alelos alternativos deben correlacionarse negativamente debido a que la alta frecuencia de uno de ellos implica bajas frecuencias de los otros. Entonces, la correlación esperada entre los alelos  $m$  y  $n$  debe estar dada por:

$$r(m,n) = -[pmpn/(1-pm)(1-pn)]^{1/2}$$

(Nei 1965, Nei y Imaizumi 1966).

Donde  $p_m$  y  $p_n$  representan las frecuencias promedio de los alelos  $m$  y  $n$  respectivamente.

Los valores observados y esperados fueron comparados usando el método descrito en Sokal y Rolf (1979, pp. 564-573).

Información adicional de la estructura genética fue obtenida del coeficiente de endogamia efectiva ( $F_e$ ) (Lewontin y Krakauer 1973), definido como:

$$F_e = s_p^2 / p(1-p),$$

Donde  $s_p^2$  representa la varianza en la frecuencia de uno de los dos alelos alternativos en cada población y  $p$  es la frecuencia media del alelo en el conjunto de las poblaciones. Es decir que cada locus se compara con el valor promedio para todos los loci y alelos.

Con el objeto de reducir errores muestrales, sólo se incluyeron en el estudio las frutas en las cuales fue posible analizar al menos 5 individuos para cada enzima.

### 2.3.2. Estudio de Variabilidad Genética

A partir de las frecuencias alélicas se estimó la heterocigosidad media ( $H$ ) (Nei 1965). Los desvíos con respecto a lo esperado para poblaciones con apareamiento aleatorio y la diferenciación genética fueron evaluados por medio de los estadísticos  $F$  (Wright 1951, 1965), estimados de acuerdo con Nei (1977). Ver apartado anterior (2.3.1).

Estos índices fueron calculados usando el programa BIOSYS versión 1.7 (Swofford y Selander 1981).

La significación de los  $F_{IS}$  fue evaluada usando el comando HDYWBG del programa BIOSYS para medir exceso o deficiencia de heterocigotas.

La significación de los  $F_{ST}$  fue evaluada, de acuerdo con lo recomendado por Nei y Chesser (1983), por medio del análisis de heterogeneidad entre poblaciones en una tabla de contingencia, usando el comando HETSQ del mismo programa.

La distribución de la variabilidad dentro y entre regiones geográficas fue analizado por medio de los estadísticos  $F$  jerarquizados (Wright 1978). Los coeficientes  $F$  y los componentes de la varianza fueron también estimados usando el programa BIOSYS 1.7.

La distribución de la variación genética entre regiones, entre poblaciones dentro de las regiones y entre poblaciones fue también expresada en términos de diversidad genética (Nei 1973,1977).

La diferenciación genética entre todos los pares de poblaciones fue estimada por medio de la distancia genética ( $D$ ) de Nei (1978).

Para realizar un fenograma representativo de las distancias genéticas relativas se utilizó el análisis de agrupamiento basado en las medias no ponderadas (UPGMA), a partir de matrices de distancia genética de Nei, usando el programa BIOSYS 1.7 (Swofford y Selander 1981).

### 2.3.3. Secuenciación

Las alineaciones de secuencias fueron hechas usando el programa Clustal W (Thompson et al. 1994).

El número promedio de diferencias de nucleótidos por sitio entre las distintas secuencias, ya sea entre poblaciones o dentro de la misma población, fue estimado mediante los índices de distancia basados en el modelo de sustitución nucleotídica de “Kimura-2 parámetros”, y teniendo en cuenta las ecuaciones de Nei y Kumar (2000). Se utilizó para esto el programa MEGA v2.1 (Kumar et al., 2001). En base a estos parámetros, y teniendo en cuenta la variabilidad intra e interpoblacional, se obtuvieron árboles de distancia entre poblaciones, utilizando el algoritmo de Neighbour- Joining.

En el caso del gen COII las secuencias fueron traducidas como un control adicional, tomando en cuenta el código mitocondrial de aminoácidos de invertebrados. Éstas se compararon con los patrones de variación aminoacídica obtenidos por Liu & Beckenbach (1992) para distintas familias y órdenes de insectos, a fin de establecer si la distribución de la variabilidad en las secuencias estudiadas coincide con las de dichas proteínas.

Estos autores observaron que existen zonas de la proteína con secuencias de aminoácidos que se conservan en todos los insectos.

No se pudo hacer lo mismo con el gen 16S por tratarse de un gen que codifica para ARN y no para proteínas.

Las unidades terminales del análisis cladístico fueron los distintos haplotipos obtenidos para las poblaciones de *A. fraterculus* de acuerdo con

las secuencias de COII y 16S. Los haplotipos empleados como unidades terminales representan un individuo de una población.

Los grupos externos (*Ragoletis pomonella* para COII y *Anastrepha striata* y *Anastrepha fraterculus*, de Bertioga, Brasil, para 16S) fueron incorporados como taxones terminales para enraizar los árboles y establecer la polaridad de los caracteres.

Cada sitio nucleotídico del alineamiento constituyó un carácter en el análisis cladístico de las secuencias.

Se construyeron dos matrices de datos, una para las secuencias de COII y otra para la 16S.

Los caracteres de ambas matrices fueron analizados como no ordenados o no aditivos, y bajo pesos iguales, en consecuencia a todos los caracteres se les asignó “a priori” del análisis un peso = 1.

Se realizó una búsqueda exacta y una búsqueda heurística para encontrar los árboles.

La búsqueda del árbol más parsimonioso para COII se realizó mediante el método heurístico y utilizando el programa NONA (Goloboff 1994), dado que el número de taxones fue superior a 20.

Para 16S en cambio fue exacta, dado que el número de unidades terminales fue 12.

Una estrategia de búsqueda heurística aconsejable es partir de uno o más árboles de Wagner iniciales (este es un algoritmo básico de construcción para la cladística), con secuencias de adición al azar de los taxones. Se aplican a ellos permutación de ramas, como por ejemplo la llamada TBR, o “Tree Bisection y Reconnection” (Kitching et al., 2000). El comando utilizado para este tipo de búsqueda fue el “mult\*N”, el cual aleatoriza el orden de los taxones. Crea un árbol de Wagner y lo envía a un

proceso de permutación de ramas (Branch-swapping). El “\*” indica que el tipo de permutación es TBR. Este proceso se repite N veces (en nuestro caso 10). El comando “hold” establece cuantos árboles se guardarán en la memoria (en nuestro caso 100).

La búsqueda exacta fue realizada mediante el comando “whennig”, para obtener un árbol inicial de Wagner, seguido de permutaciones múltiples por medio del comando “mswap+”. Para los árboles obtenidos se brindan dos parámetros indicativos de la homoplasia de los caracteres: el largo y el índice de consistencia (CI).

La confianza de los resultados de los análisis cladísticos realizados se determinó a partir de la aplicación de un método estadístico denominado “bootstrapping” que consiste en eliminar al azar la mitad de los caracteres de una matriz de datos, duplicarlos (para obtener así una matriz del mismo tamaño) y analizar esta nueva matriz para obtener el o los cladogramas más parsimoniosos. Este proceso se repite N veces y el número de veces (porcentaje) en que aparece cada componente se considera un índice de su soporte (Felsenstein, 1985; Sanderson, 1989; Harshman, 1994; Li y Zharkikh, 1994).

En el caso del gen COII los árboles fueron convertidos en series anidadas de haplotipos ligados en clados siguiendo el esquema propuesto por Templeton (ver más arriba ítem 2.2.4).

A fin de evaluar la asociación geográfica entre haplotipos se utilizó el software GEODIS 2.0 (Posada y Templeton 2000).

#### **2.3.4. Análisis cladístico a partir de la Secuenciación**

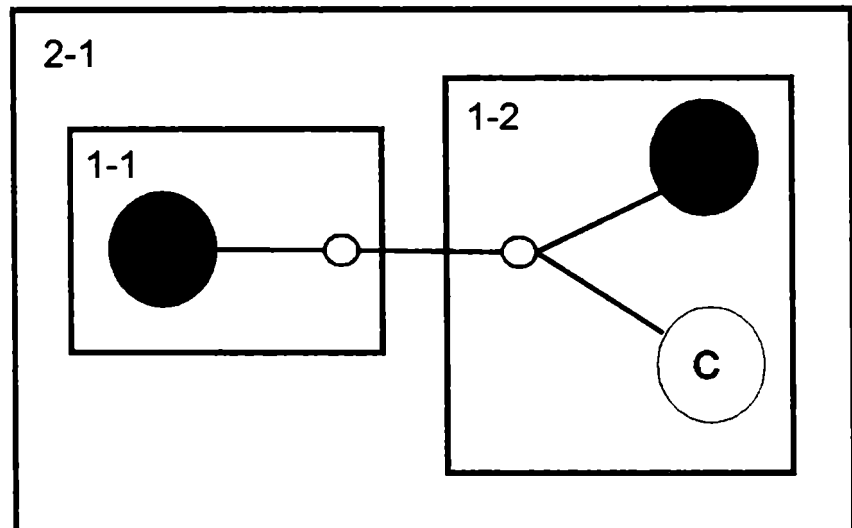
El análisis cladístico incluyó todos los diferentes haplotipos como taxones terminales y fue realizado con el programa NONA (Goloboff 1994).

Los cladogramas fueron convertidos en series anidadas de haplotipos en una red, siguiendo las reglas descritas por Templeton et al. (1987), Templeton y Sing (1993), Templeton (1998).

Mediante la aplicación de algún algoritmo de parsimonia, se construye una red filogenética de haplotipos no enraizada.

Se deben indicar todos los pasos mutacionales que diferencian a los haplotipos, los cuales se cuentan como haplotipos intermediarios ausentes.

Según la serie de reglas descritas en Templeton et al. (1987) y Templeton y Sing (1993) el árbol de haplotipos se convierte en una serie anidada de clados o “nested clade”, como se observa en el siguiente esquema.



**Fig. 2.3: Esquema que muestra un hipotético anidamiento de haplotipos**

En la figura se observa un ejemplo hipotético de cinco haplotipos, de los cuales tres (A, B y C) están representados en las poblaciones que existen actualmente y dos (los círculos blancos más pequeños) significan haplotipos intermediarios ausentes.

Los haplotipos interiores son en este caso los ausentes y A, B y C son haplotipos exteriores o “tips”.

El agrupamiento comienza de afuera hacia adentro (de los haplotipos “tips” hacia los interiores) y se van uniendo de a dos, (o más cuando de a



dos no es posible) ya sean haplotipos presentes o ausentes, para formar los clados de un paso (1-1 y 1-2 en el ejemplo).

Luego se va aumentando el nivel de agrupamiento uniendo los clados ya formados, también de a dos, y comenzando nuevamente desde los extremos hacia adentro. Estos son los clados del nivel 2-1 del ejemplo.

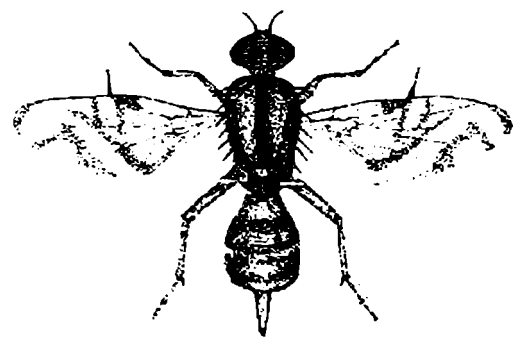
Para determinar la asociación geográfica se realiza un test de permutación exacto de contingencia en donde las variables son cada clado dentro de cada nido. Para ello se toman dos tipos de distancias.

Una de ellas se denomina  $D_c$ . Es un promedio de todas las distancias geográficas de los individuos que tienen haplotipos en un determinado clado, respecto del centro geográfico de dicho clado y da una idea de la dispersión de los individuos de ese clado (Ej. clado 1-1)

La otra medida de distancia se denomina  $D_n$ . Para calcularla se determina el centro geográfico de nivel  $n+1$  respecto del que habíamos tomado para calcular la  $D_c$  (clado 2-1 en el ejemplo). Luego se calculan y se promedian todas las distancias geográficas de los individuos del clado  $n-1$  (clado 1-1 en el ejemplo) respecto del clado  $n+1$  (clado 2-1 en el ejemplo).  $D_n$  mide cuán lejos están los individuos con haplotipos del clado 1-1 de todos los individuos con haplotipos del clado 2-1.

La hipótesis nula plantea que no existe asociación geográfica dentro del clado. Si esta hipótesis se rechaza significa que la dispersión ha sido restringida y que hay una asociación significativa entre haplotipos y distribución geográfica. Por el contrario, si no se rechaza la hipótesis nula implica que existe flujo génico entre las poblaciones. Además cuanto más ampliamente distribuido esté un haplotipo esto indica que es más antiguo.

# 3. Resultados



### 3.1. Estudio de Estructura Genética en una población por medio de Electroforesis de Isoenzimas

De los nueve sistemas isoenzimáticos estudiados: Aldehido oxidasa (*Ao*), Aminopeptidasas (*Amp*), Enzima málica (*Me*), Esterasa (*Est*), Glutamato oxalacetato transaminasa (*Got*), Malato deshidrogenasa (*Mdh*), Menadione reductasa (*Mnr*), Phospho glutamato isomerasa (*Pgi*) y 6-Phospho gluconato deshidrogenasa (*6-Pgd*), sólo cuatro fueron polimórficos (*Amp*, *Got*, *Mdh* y *6-Pgd*) Ver fig 3.1.

Cada uno de estos cuatro sistemas variables mostraron un locus con tres alelos. En la fig. 3.2 se esquematizan los alelos de los cuatro loci variables.

En la tabla 3.1 se muestran las frecuencias alélicas de estos loci y el número de individuos analizados por fruto.

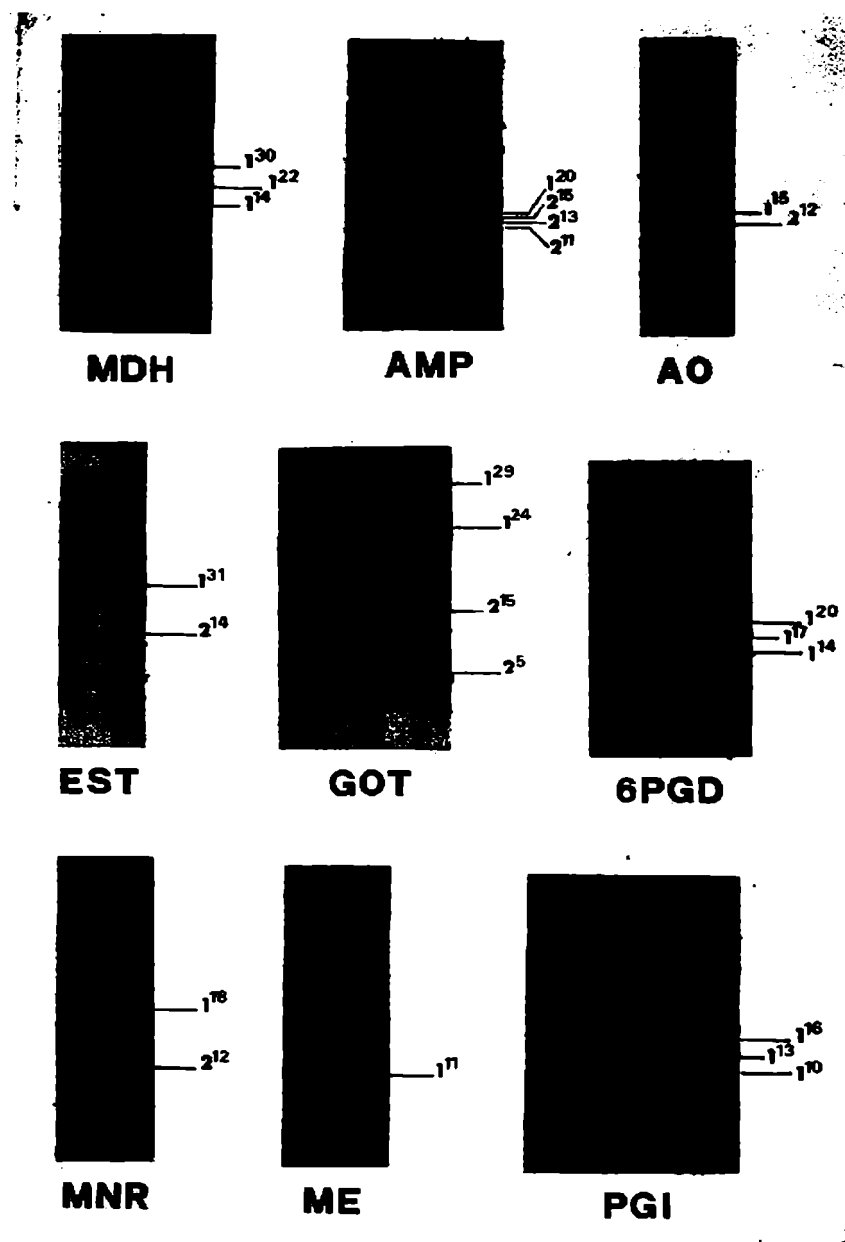


Fig.3.1: Sistemas isoenzimáticos analizados

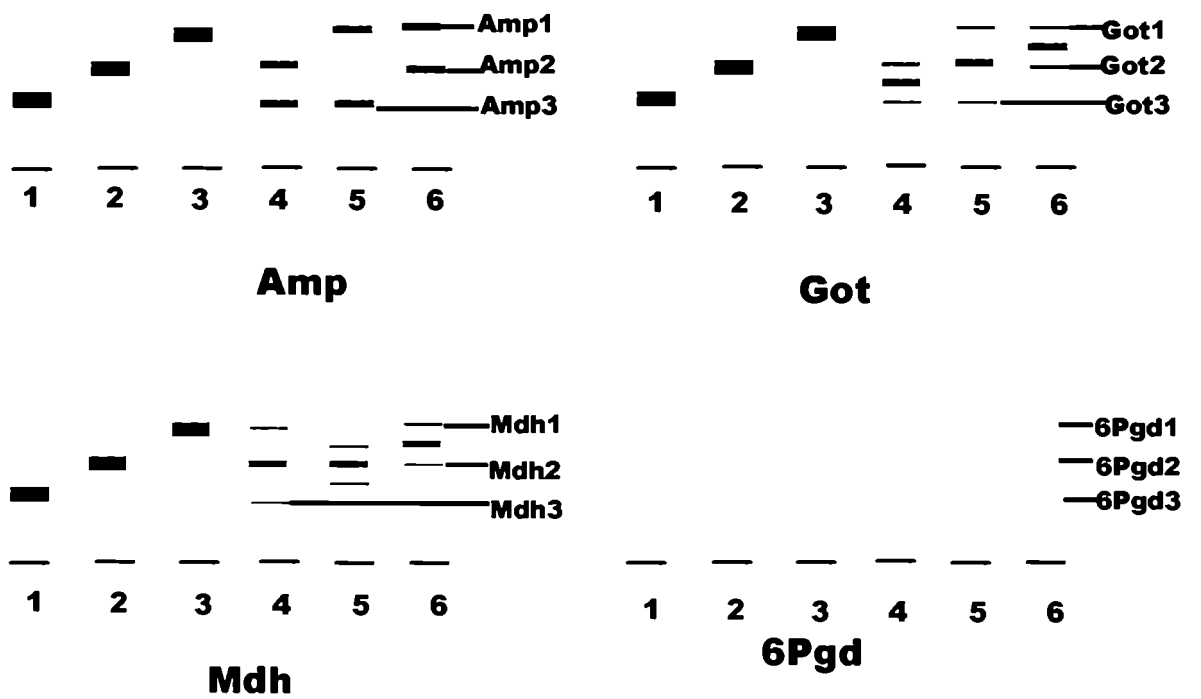


Fig. 3.2: Zimograma de los cuatro loci variables.

**Tabla 3.1: Frecuencias alélicas de los loci *Amp-1*, *Got-1*, *Mdh-1* y *6Pgd-1* de adultos de *A. fraterculus* emergidos de guayabas en en Yuto (Jujuy, Argentina).**

Loci	<i>Amp-1</i>			<i>Got-1</i>			<i>Mdh-1</i>			<i>6Pgd-1</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>1</b>	9	0.22	0.55	0.23	0.22	0.78	0.00	0.63	0.13	0.24	--	--
<b>2</b>	10	0.25	0.30	0.45	0.10	0.75	0.15	0.55	0.22	0.23	--	--
<b>3</b>	10	0.25	0.60	0.15	0.00	0.80	0.20	--	--	--	0.00	0.65
<b>4</b>	22	0.13	0.19	0.68	0.07	0.80	0.13	0.62	0.12	0.26	--	--
<b>5</b>	20	0.15	0.53	0.32	0.03	0.88	0.09	--	--	--	--	--
<b>6</b>	9	0.28	0.50	0.22	--	--	--	--	--	--	--	--
<b>7</b>	7	0.21	0.36	0.43	--	--	--	--	--	--	--	--
<b>8</b>	18	0.05	0.59	0.36	0.00	0.98	0.02	0.28	0.48	0.24	0.50	0.22
<b>9</b>	18	0.16	0.22	0.62	0.05	0.80	0.15	0.28	0.64	0.08	0.55	0.27
<b>10</b>	20	0.32	0.53	0.15	0.03	0.75	0.22	0.33	0.53	0.14	0.39	0.39
<b>11</b>	16	0.16	0.34	0.32	0.03	0.82	0.15	0.40	0.50	0.10	0.56	0.31

Tabla 3.1: (Continuación)

Loci	Amp-1			Got-1			Mdh-1			6Pgd-1			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
<b>Alelo</b>													
<b>Fruto</b>													
<b>n</b>													
12	6	0.33	0.42	0.25	0.00	0.67	0.33	0.42	0.42	0.16	0.08	0.50	0.42
13	20	--	--	--	0.03	0.97	0.00	0.03	0.97	0.00	0.13	0.68	0.19
14	22	--	--	--	0.02	0.98	0.00	0.05	0.95	0.00	0.33	0.48	0.19
15	14	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.07	0.60	0.33
16	12	0.23	0.55	0.22	0.00	0.86	0.14	0.18	0.77	0.05	0.29	0.46	0.25
17	9	0.33	0.50	0.17	0.00	0.94	0.06	0.22	0.61	0.17	0.25	0.56	0.19
18	19	0.11	0.35	0.54	0.03	0.97	0.00	0.08	0.85	0.07	0.07	0.61	0.32
19	21	0.05	0.55	0.40	0.00	0.76	0.24	0.02	0.95	0.03	--	--	--
20	20	0.21	0.40	0.39	0.00	0.83	0.17	0.02	0.95	0.03	0.11	0.56	0.33

**n = Número de individuos analizados en cada fruto.**

### **3.1.1. Análisis dentro de frutos**

La mayoría de los  $F_{IS}$  estimados fueron positivos y en 15 de 62 casos fueron significativos (Tabla 3.2). Estos resultados indicaron una deficiencia de heterocigotas dentro de los frutos respecto a lo esperado por la ley de Hardy-Weinberg bajo condiciones de apareamiento aleatorio.

Los valores promedio de  $F_{IS}$  para cada locus fueron altamente significativos en todos los casos (Tabla 3.3). Estos resultados indicaron una tendencia al exceso de homocigotas dentro de los frutos.



Tabla 3.2.  $F_{ISi}$  estimados para los loci *Amp-1*, *Got-1*, *Mdh-1* y *6Pgd-1* de adultos de *A. fraterculus* emergidos de guayabas en Yuto (Jujuy, Argentina).

FRUTOS	LOCI			
	<i>Amp-1</i>	<i>Got-1</i>	<i>Mdh-1</i>	<i>6Pgd-1</i>
1	0.48	-0.23	-0.11	--
2	0.42	-0.18	0.30	--
3	0.50	-0.20	--	0.39
4	0.37	0.62 *	0.22	--
5	0.35	-0.09	--	--
6	0.16	--	--	--
7	0.19	--	--	--
8	0.25	0.00	0.07	0.05
9	0.56 *	-0.15	-0.06	0.57 *
10	0.66 *	0.12	0.24	0.03
11	0.11	0.09	0.08	0.05
12	0.78	1.00 *	0.02	-0.08
13	--	0.00	0.00	0.10
14	--	0.00	1.00 *	0.26
15	--	--	--	0.61 *
16	0.72 *	0.64 *	0.30	0.39
17	0.52	0.00	0.82 *	0.42
18	0.62 *	0.00	-0.09	0.23
19	0.53 *	0.75 *	-0.01	--
20	0.61 *	0.50 *	-0.01	0.24

\* valores Significativos ( $p < 0.05$ )

**Tabla 3.3: Estadísticos  $F$  para los cuatro loci variables estudiados de adultos de *A. fraterculus* emergidos de guayabas en Yuto (Jujuy, Argentina).**

<b>Loci</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>F_{IT}</math></b>	<b><math>F_{ST}</math></b>
<b><i>Amp-1</i></b>	0.46	0.47	0.01
<b><i>Got-1</i></b>	0.24	0.27	0.03
<b><i>Mdh-1</i></b>	0.17	0.35	0.21
<b><i>6-Pgd-1</i></b>	0.25	0.29	0.05
<b>Promedio</b>	0.28	0.35	0.08

**Todos los índices fueron altamente significativos ( $p < 0.01$ )**

### 3.1.2. Análisis entre frutos

La tabla 3.3 muestra también los valores  $F_{IT}$  y  $F_{ST}$  promedio para cada locus. Las diferencias entre frutos fue altamente significativa en todos los casos, al igual que los  $F_{IT}$  estimados que además indicaron exceso de homocigotas en la población global.

La tabla 3.4 muestra la correlación esperada y observada entre las frecuencias alélicas de cada locus tomados de a pares. Para los loci *Amp-1*, *Mdh-1* y *6Pgd-1* hubo al menos un par para el cual la correlación observada fue diferente del valor esperado y altamente significativa ( $p < 0.01$ ).

Estos resultados muestran que la frecuencia de homocigotas es más alta que la esperada para poblaciones panmícticas y que la distribución de alelos entre frutos se alejó de la esperada por azar.

Otro método de analizar la hipótesis de neutralidad selectiva del polimorfismo se basó en las diferencias entre los coeficientes estimados de endogamia para diferentes loci, de acuerdo a Lewontin y Krakauer (1973).

Ellos sugieren que mientras la selección actúa diferencialmente para cada locus y cada alelo de un locus, el efecto de la estructura de apareamiento es uniforme sobre todos los loci y alelos.

**Tabla 3.4: Correlación observada ( $r_o$ ) y esperada ( $r_e$ ) entre las frecuencias alélicas de los loci *Amp-1*, *Got-1*, *Mdh-1* y *6Pgd-1* de adultos de *A. fraterculus* emergidos de guayaba en Yuto (Jujuy, Argentina).**

Loci	$r_e$	$r_o$	$t$
<b><i>6Pgd-1</i></b>			
1-2	-0.58	-0.92	3.00 **
1-3	-0.35	-0.73	1.82
2-3	-0.57	0.4	-3.42 **
<b><i>Amp-1</i></b>			
1-2	-0.24	0.09	-1.25
1-3	-0.23	-0.61	1.83
2-3	-0.43	-0.84	2.88 **
<b><i>Got-1</i></b>			
1-2	-0.06	-0.25	0.74
1-3	-0.06	-0.32	1.04
2-3	-0.77	-0.83	0.68
<b><i>Mdh-1</i></b>			
1-2	-0.27	-0.98	7.63 **
1-3	-0.18	0.84	-4.88 **
2-3	-0.43	-0.92	3.95 **

**\*\* Valores altamente significativos ( $p < 0.01$ )**

Los valores  $F_e$  estimados para todos los loci y alelos (Tabla 3.5) se compararon con el valor promedio según Lewontin y Krakauer (1973). Los resultados indicaron que el coeficiente de endogamia de dos de los tres alelos de *Mdh-1* se apartaron significativamente ( $p < 0.05$ ) o altamente significativamente ( $p < 0.01$ ) de los valores esperados bajo la hipótesis de divergencia neutral entre los sustratos.

**Tabla 3.5: Coeficiente de Apareamiento Efectivo ( $F_e$ ) para cada alelo de los loci *Amp-1*, *Got-1*, *Mdh-1* y *6Pgd-1* de adultos de *A. fraterculus* emergidos de guayabas en Yuto (Jujuy, Argentina).**

Loci	Alelo	$F_e$	$\chi^2$
<i>Amp-1</i>	1	0.048	6.203
	2	0.067	8.629
	3	0.113	14.554
<i>Got-1</i>	1	0.088	11.329
	2	0.069	8.832
	3	0.090	11.561
<i>Mdh-1</i>	1	0.234	26.282 *
	2	0.375	42.181 **
	3	0.081	9.078
<i>6Pgd-1</i>	1	0.204	19.633
	2	0.088	8.433
	3	0.038	3.639
<b>Promedio</b>		0.125	

\* : Significativo ( $p < 0.05$ )

\*\* : Altamente significativo ( $p < 0.01$ )

### 3.1.3. Asociación entre loci

En una población en equilibrio se espera que las frecuencias de alelos pertenecientes a diferentes loci independientes no estén correlacionadas.

En esta tesis se puso a prueba esta hipótesis estimando la correlación entre todos los pares de las frecuencias de los alelos entre diferentes loci (tabla 3.6).

Si bien ninguna de las correlaciones observadas difirió significativamente de cero a nivel de matriz, diez comparaciones fueron significativas a nivel individual.

Considerando un nivel de confianza del 5%, el número esperado de pruebas significativas por azar es aproximadamente 2 de las 54 correlaciones estimadas entre variantes no alélicas.

La comparación entre las proporciones de las correlaciones observadas (10/54) y las esperadas (2/54), produjeron diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ).

De acuerdo con esos resultados, existe una asociación mayor a la esperada para loci independientes en equilibrio gamético entre *Mdh-1/Got-1*, *Got-1/6Pgd-1* y *Mdh-1/6Pgd-1*.

Tabla 3.6: Correlación de frecuencias génicas entre variantes no alélicas de los loci *Amp-1*, *Got-1*, *Mdh-1* y *6Pgd-1* de adultos de *A. fraterculus* emergidos de guayabas en Yuto (Jujuy, Argentina).

Loci	<i>Amp1-1</i>	<i>Amp1-2</i>	<i>Amp1-3</i>	<i>Got1-1</i>	<i>Got1-2</i>	<i>Got1-3</i>	<i>Mdh1-1</i>	<i>Mdh1-2</i>	<i>Mdh1-3</i>
<i>Got1-1</i>	0.03	-0.17	0.13						
<i>Got1-2</i>	-0.40	0.17	0.09						
<i>Got1-3</i>	0.36	-0.05	-0.17						
<i>Mdh1-1</i>	0.25	-0.30	0.06	0.67*	-0.54*	0.15			
<i>Mdh1-2</i>	-0.22	0.25	-0.05	-0.64*	0.48*	-0.11			
<i>Mdh1-3</i>	0.13	-0.07	0.02	0.50*	-0.30	0.02			
<i>6Pgd1-1</i>	-0.37	-0.25	0.25	0.44	0.05	-0.12	0.50*	-0.47	0.31
<i>6Pgd1-2</i>	0.44	0.20	-0.30	-0.25	0.15	-0.10	-0.65*	0.65*	-0.53*
<i>6Pgd1-3</i>	0.14	0.27	-0.10	-0.57*	-0.37	0.46	0.02	-0.09	0.22

\* valores Significativos ( $p < 0.05$ )



## 3.2. Estudio de variabilidad en poblaciones naturales

### 3.2.1. Análisis Isoenzimático

El análisis de 6 sistemas isoenzimáticos detectó la presencia de 8 loci isoenzimáticos : *Mnr-1*, *Mnr-2*, *Ao-1*, *Me-1*, *Got-1*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, y *6Pgd-1*.

Como ya había sido previamente observado (Vilardi et al. 1994-a; Alberti et al. 1999) cinco de estos loci fueron invariantes, tanto dentro como entre poblaciones. Sólo *Got-1*, *Mdh-1*, y *6Pgd-1* presentaron variabilidad. Es decir que la proporción de loci polimórficos fue  $P = 0.375$ .

Las estimaciones de variabilidad genética, estructura poblacional y diferenciación entre poblaciones se basaron en esos loci.

En todos los casos, excepto *Mdh-1* en Yuto y *Got-1* en Ituzaingó, los loci fueron polimórficos al criterio del 5% (Tabla 3.7). Todas las poblaciones compartieron un alelo más frecuente (*Mdh-1<sup>B</sup>*, *6Pgd-1<sup>B</sup>*, *Got-1<sup>B</sup>*).

**Tabla 3.7: Frecuencias alélicas y heterocigosis media (H) estimadas en las poblaciones estudiadas de *Anastrepha fraterculus***

	AI	CO	MR	MO	PO	HM	YU	IT	CA
<b>Mdh-1<sup>A</sup></b>	0.240	0.086	0.050	0.000	0.200	0.150	0.023	0.187	0.297
<b>Mdh-1<sup>B</sup></b>	0.660	0.879	0.825	0.818	0.675	0.683	0.955	0.625	0.554
<b>Mdh-1<sup>C</sup></b>	0.100	0.034	0.125	0.182	0.125	0.167	0.023	0.188	0.149
<b>H<sub>i</sub></b>	0.498	0.220	0.285	0.298	0.490	0.485	0.087	0.541	0.584
<b>N</b>	25	29	20	11	20	30	22	40	37
<b>6Pgd-1<sup>A</sup></b>	0.132	0.033	0.340	0.182	0.068	0.071	0.292	0.064	0.108
<b>6Pgd-1<sup>B</sup></b>	0.605	0.733	0.480	0.682	0.727	0.643	0.438	0.628	0.525
<b>6Pgd-1<sup>C</sup></b>	0.263	0.233	0.180	0.136	0.205	0.286	0.271	0.308	0.367
<b>H<sub>i</sub></b>	0.548	0.408	0.591	0.484	0.426	0.501	0.651	0.508	0.580
<b>N</b>	19	15	25	11	22	14	24	39	60
<b>Got-1<sup>A</sup></b>	0.100	0.100	0.020	0.045	0.083	0.158	0.059	0.000	0.117
<b>Got-1<sup>B</sup></b>	0.850	0.750	0.680	0.500	0.667	0.711	0.618	1.000	0.883
<b>Got-1<sup>C</sup></b>	0.050	0.150	0.300	0.455	0.250	0.132	0.324	0.000	0.000
<b>H<sub>i</sub></b>	0.266	0.406	0.447	0.541	0.488	0.454	0.512	0.000	0.208
<b>N</b>	20	20	25	11	24	19	17	39	60
<b>H*</b>	0.167	0.132	0.175	0.173	0.178	0.184	0.160	0.132	0.172
<b>H</b>	0.447	0.353	0.467	0.462	0.477	0.492	0.427	0.353	0.460
<b>SE*</b>	0.089	0.065	0.094	0.077	0.022	0.015	0.173	0.177	0.126

**H<sub>i</sub> = Heterocigosis media para cada locus, H\* = Heterocigosis media tomando todos los loci, H = Heterocigosis media tomando sólo los loci polimórficos, SE\* = error estándar de H**

Tomando el total de loci la heterocigosis media varió desde 0.132 en Concordia e Ituzaingó, hasta 0.183 en Horco Molle.

Si se analizan sólo los loci polimórficos la heterocigosis media varió desde 0.353 en Ituzaingó y Concordia, hasta 0.492 en Horco Molle (Tabla 3.7). Estas diferencias observadas fueron no significativas.

En la tabla 3.8 se observa que la mayoría de los  $F_{IS}$  estimados fueron positivos. Para las poblaciones en equilibrio de Hardy-Weinberg los  $F_{IS}$  deberían ser iguales a cero, de modo que pueden esperarse errores muestrales positivos y negativos en similar frecuencia. En las poblaciones estudiadas la proporción de  $F_{IS}$  estimados mayores que cero (19/27) fue significativamente más alta que la esperada (1/2) ( $\chi^2 = 3.86$ ,  $p < 0.05$ ). De los 19  $F_{IS}$  positivos, 11 fueron significativos o altamente significativos (Tabla 3.8). Ninguno de los  $F_{IS}$  negativos estimados fueron significativos. Finalmente todos los  $F_{IS}$  promedio fueron positivos (Tabla 3.9).

Estos resultados muestran una tendencia al exceso de homocigotas dentro de las poblaciones.

La divergencia entre poblaciones, medida por medio del coeficiente  $F_{ST}$ , fue significativa o altamente significativa para todos los loci estudiados (Tabla 3.9).

**Tabla 3.8:  $F_{IS}$  estimados para todos los loci en las poblaciones estudiadas de *Anastrepha fraterculus***

	Mdh-1	6Pgd-1	Got-1
<b>AI</b>	0.195	0.423 *	-0.132
<b>CO</b>	-0.106	-0.148	0.506 **
<b>MR</b>	0.170	0.356 *	0.732 **
<b>MO</b>	-0.222	0.248	0.664 **
<b>PO</b>	-0.023	-0.178	0.486 **
<b>HM</b>	0.310 *	0.143	0.535 **
<b>YU</b>	-0.035	0.039	0.539 **
<b>IT</b>	-0.007	0.001	0.057
<b>CA</b>	0.316	0.258 *	0.489 **

**\*: significativo; \*\*: altamente significativo**

**Tabla 3.9: Resumen de los estadísticos  $F$  promedio de las poblaciones estudiadas de *Anastrepha fraterculus***

LOCI	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
<i>Mdh-1</i>	0.115	0.059**	0.167
<i>6Pgd-1</i>	0.149	0.051**	0.192
<i>Got-1</i>	0.513	0.050*	0.537
<b>Promedio Ponderado</b>	0.261	0.053**	0.300

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

A partir de las diferencias entre las frecuencias alélicas, se pudo estimar indirectamente el flujo génico mediante de la expresión:

$$Nm = \frac{(1 - F_{ST})}{4 \cdot F_{ST}} \quad (\text{Wright 1940})$$

Este fue de 4.5 migrantes por generación, sugiriendo un importante intercambio genético entre las poblaciones estudiadas en este trabajo.

A fin de determinar si la variación genética observada estaba asociada con patrones de distribución geográficos, las poblaciones muestreadas fueron agrupadas en tres regiones geográficas: Noroeste (NO), Noreste (NE) y Sur (S).

En el NO se incluyeron las poblaciones de **Yuto** (Jujuy), **Horco Molle** (Tucumán) y **Aicuña** (La Rioja).

El NE incluye las poblaciones de **Posadas** (Misiones) y **Concordia** (Entre Ríos).

Por último el S comprende las poblaciones ubicadas en las cercanías de la ciudad de Buenos Aires, **Castelar**, **Ituzaingó**, **Moreno** y **Ministro Rivadavia** (Buenos Aires).

El centro de la República Argentina, que corresponde a las regiones biogeográficas de Chaco y Espinal, es un área semidesértica, en la cual prácticamente no se encuentran extensiones importantes de árboles frutales cultivados y por lo tanto no es una zona colonizada por *A. fraterculus* (ver Fig. 2.1).

Dada esta barrera natural era de esperar un aislamiento importante entre las poblaciones del NO y el resto de las poblaciones aquí estudiadas.

Respecto de las poblaciones del NE, localizadas en la Mesopotamia, una región delimitada por dos grandes ríos (Paraná y Uruguay) era de esperar que exista también un relativo aislamiento respecto de las poblaciones de la provincia de Buenos Aires, ubicadas en la margen opuesta de los ríos Paraná y de La Plata.

La distribución de la variación genética dentro de las poblaciones, entre poblaciones (dentro de cada región) y entre regiones fue analizada por medio de los estadísticos  $F$  jerárquicos de Wright (Wright, 1978).

La varianza entre todas las poblaciones fue  $V = 0.07$  y el valor de  $F$  correspondiente fue  $F_{total} = 0.05$ . Este resultado indica que alrededor del 95% de la variación total ( $1 - F$ ) ocurre dentro de las poblaciones.

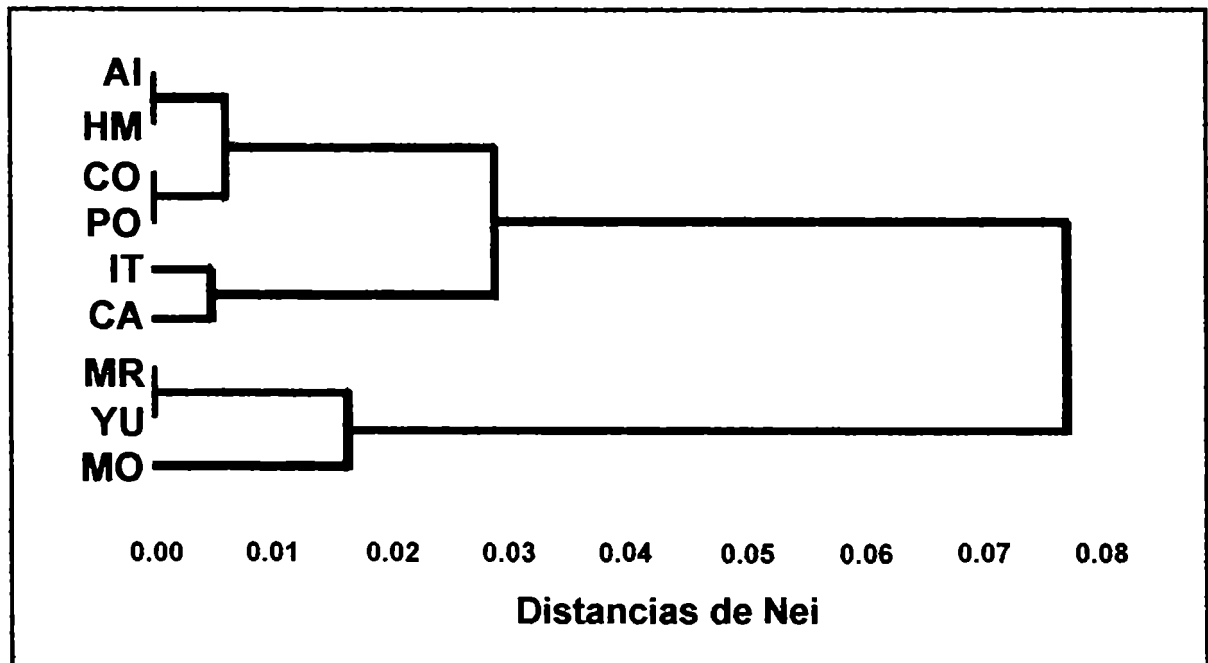
La varianza y el  $F$  estimado entre regiones fueron negativos ( $V = -0.03$  ;  $F = -0.02$ ). Estos resultados se interpretaron como ausencia de diferenciación entre regiones. En consecuencia toda la variación entre poblaciones ocurre dentro de cada región ( $V = 0.10$  ;  $F = 0.07$ ).

Estos resultados fueron confirmados por un análisis de agrupamiento a partir de una matriz de distancias genéticas (Tabla 3.10 y Fig. 3.1) (Nei, 1978).

**Tabla 3.10: Distancias genéticas de Nei entre poblaciones de *Anastrepha fraterculus***

	AI	CO	MR	MO	PO	HM	YU	IT	CA
AI	-----								
CO	0.015	-----							
MR	0.052	0.038	-----						
MO	0.099	0.034	0.012	-----					
PO	0.010	0.000	0.040	0.019	-----				
HM	0.000	0.000	0.039	0.044	0.000	-----			
YU	0.080	0.041	0.000	0.021	0.063	0.057	-----		
IT	0.000	0.045	0.092	0.148	0.041	0.016	0.133	-----	
CA	0.000	0.062	0.105	0.177	0.050	0.018	0.139	0.005	-----





**Fig. 3.3:** Fenograma representativo de la similitud genética entre las poblaciones estudiadas de *A. fraterculus*

En el fenograma se observan dos agrupamientos con alta similitud que corresponden respectivamente a las poblaciones del NE (**Posadas** y **Concordia**) y dos poblaciones del NO (**Horco Molle** y **Aicuña**).

Estos dos grupos están fuertemente asociados entre sí. Esto sugiere que, con excepción de **Yuto**, las poblaciones del norte de Argentina poseen alta afinidad genética.

En contraste las poblaciones de la región S no forman un único agrupamiento, sino dos, uno comprendido por **Castelar** e **Ituzaingo** y el otro por **Moreno** y **Ministro Rivadavia**, el que también incluye a **Yuto**, población del NO.

Ambos análisis, estructura jerárquica y distancias genéticas, indican la falta de correlación entre variación genética y patrones de distribución geográfica.

Esta conclusión fue validada comparando las matrices de distancias genética y geográfica por medio del test de Mantel (Mantel, 1967). Con 100 permutaciones la probabilidad de obtener una correlación más alta que la observada ( $r = -0.24$ ) fue  $p = 0.9$ .

### 3.2.2. Análisis PCR-RFLP

La reacción de PCR con los cebadores LR-J-12883 / LR-N-13398 produjo en todas las poblaciones y todos los individuos una única banda de alrededor de 480 pares de base.

La digestión simple con las enzimas *Ase I* y *Ssp I* originó en todos los casos dos fragmentos.

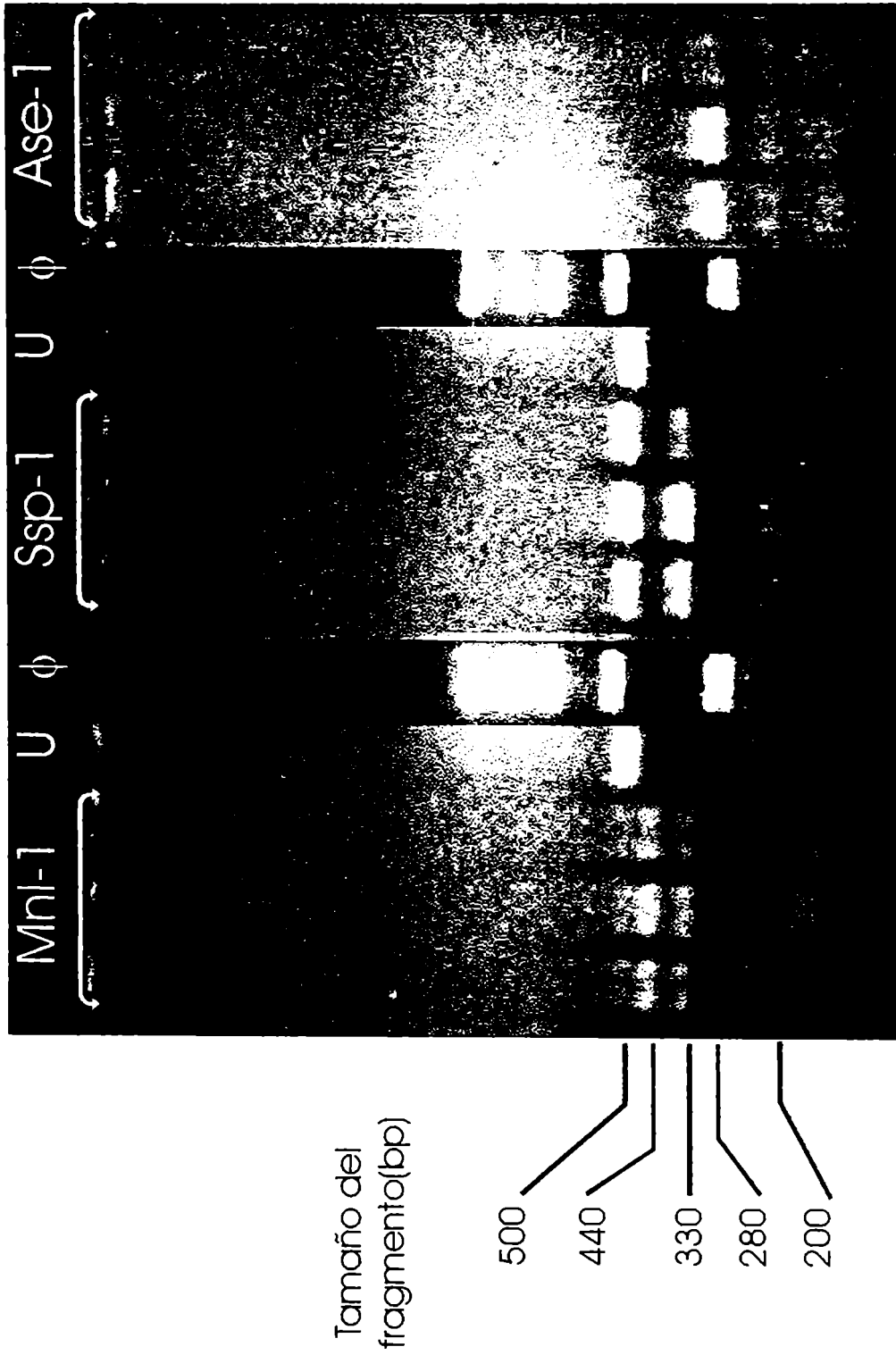
El sitio de corte para *Ssp I* produce dos fragmentos de alrededor de 330 y 200 pares de base respectivamente.

Para *Ase I* también existe un sitio de corte, que origina dos fragmentos de alrededor de 280 y 200 pares de base.

*Mnl I* aparentemente reconoce dos sitios cercanos a los extremos del fragmento, produciendo un gran fragmento de alrededor de 330 pares de base, sin embargo los fragmentos pequeños no pudieron ser identificados. La digestión parcial produjo un fragmento de 440 pares de base.

Estos patrones no mostraron variación dentro ni entre poblaciones para las tres enzimas estudiadas. Ver fig. 3.4.

Fig. 3.4: Gel mostrando la digestión del gen 16S con las enzimas *Mnl-I*, *Ssp-I* y *Ase-I*.



### 3.2.3. Análisis de las secuencias del gen mitocondrial COII

Respecto del fragmento secuenciado del gen mitocondrial de la enzima Citocromo Oxidasa II (COII), se analizaron un total de 28 secuencias de la hebra sentido del ADN (a partir del cebador COIIS) y 28 secuencias de la hebra antisentido del ADN (a partir del cebador COIIA), las cuales fueron editadas mediante el programa BioEdit (Hall, T.A. 1999). (Ver ítem 2.2.4. de Material y Métodos).

Del producto de amplificación pudieron analizarse 417 pares de bases (pb). Del alineamiento de las 28 secuencias surgió que 19 de ellas eran distintas por lo que fueron definidas como haplotipos diferenciados. La fig 3.5 muestra las secuencias completas de estos haplotipos cuyos acrónimos y frecuencias en las distintas poblaciones se describen en la tabla 3.12.

Un haplotipo (**B**) estuvo presente en todas las poblaciones, salvo en **Ministro Rivadavia** y **Concordia** y fue el único que encontramos en la muestra de la población brasileña. Hubo otro haplotipo (**P10**) que se encontró presente tanto en **Yuto** como en **Posadas**. Los restantes estuvieron presentes en una sola población.

Las frecuencias nucleotídicas generales fueron:

T = 36,20 %

A = 34,30 %

C = 15,00 %

G = 14,50 %.

Como se observa muestran, a lo largo de los 417 pb analizados, un fuerte sesgo hacia A + T, promediando un 70 % entre todos los individuos. Este desvío fue mayor para la tercera posición (91,30 %), que para la segunda (64,8 %) y la primera (55,5%). Estas proporciones son muy similares a las encontradas en otros insectos. (Langor y Sperling 1997, Scataglini et al., en preparación).

A partir del alineamiento de estas secuencias se construyó una matriz de datos moleculares que fue analizada cladísticamente mediante el programa NONA (Goloboff 1994), utilizando como grupo externo a *Rhagoletis pomonella*, de acuerdo con la información disponible en el GeneBank, (RPU53230) (Smith y Bush 1997).

Los caracteres fueron tratados como desordenados y con igual peso. De ellos, 334 fueron constantes, 63 variables y no informativos (autoapomorfias) y 20 fueron variables e informativos para el análisis de parsimonia (sinapomorfias).

La búsqueda heurística arrojó un total de 100 árboles de longitud  $L = 107$ , índice de consistencia  $CI = 84$  e índice de retención  $RI = 57$ .

El árbol concenso de los 100 obtenidos se muestra en la fig. 3.6. Se observa en él que un haplotipo perteneciente a la población de **Ministro Rivadavia**, el **Mr6** (tabla 3.12), surge basalmente con respecto a una politomía formada por el resto de los haplotipos. Tres de las ramas de esta politomía agrupa cada una a un par de haplotipos: (**P3**, **P6**), (**Co6**, **Hm4**) y (**Me1**, **P8**).

Se desprende de estos resultados que el árbol obtenido no resuelve agrupamientos por localidad geográfica, salvo en el caso de **P3**, **P6** que pertenecen a la población de **Posadas**. Todos los clados resueltos en este

árbol consenso, salvo el agrupamiento de **Mr6** y la politomía, muestran valores significativos ( $> 50\%$ ) de bootstrap.

Con el objeto de investigar estadísticamente si existe una asociación entre diversidad de haplotipos y distribución geográfica se realizó un análisis estadístico sobre el cladograma de haplotipos denominado “método anidado” de Templeton et al. (1987), Templeton y Sing (1993), Templeton (1998).

Se aplicaron las reglas de Templeton para construir el diseño anidado a partir de uno de los cladogramas obtenidos mediante el análisis de parsimonia. (ver ítem 2.3.4 de Material y Métodos).

La elección de este árbol fue arbitraria ya que todos los análisis realizados a partir de más de 10 de estos 100 árboles de igual longitud (elegidos al azar), dieron el mismo resultado final.

La fig. 3.7 muestra uno de los 100 árboles a partir del cual se realizó el análisis anidado y la fig. 3.8 muestra el sistema anidado.

En la tabla 3.13 se muestran los resultados del análisis de contingencia por permutación dentro de cada clado anidado correspondiente a la fig. 3.8.

Ningún clado mostró asociación geográfica significativa, por lo tanto no se puede rechazar la hipótesis nula del análisis que plantea que no existe asociación significativa entre la variabilidad haplotípica y su distribución geográfica.

Un resultado similar se obtuvo cuando se analizaron las distancias de sustitución nucleotídica interpoblacionales aplicando el algoritmo de Neighbour joining. En la fig. 3.9 se observa que poblaciones muy alejadas geográficamente presentan poca distancia genética. Es decir que el árbol

agrupa a las distintas poblaciones sin seguir un patrón acorde a la distribución geográfica.

Estos resultados, es decir la falta de asociación geográfica y genética, fueron validados estadísticamente comparando las matrices de distancias nucleotídicas y geográficas mediante el test de Mantel (Mantel 1967). Con 500 permutaciones, la probabilidad de obtener una correlación más alta que la observada fue  $P = 0,412$  (ver tabla 3.11).



**Tabla 3.11: Distancias nucleotídicas vs. Distancias geográficas del gen COII analizadas mediante el Test de Mantel.**

	Pe	C	Co	Me	P	Mr	Hm	Yu
Pe		672,00	541,00	1199,00	597,00	667,00	1378,00	1493,00
C	0,00640		366,00	645,00	848,00	33,50	1084,00	1352,00
Co	0,00549	0,01193		670,00	489,00	387,00	877,00	1071,00
Me	0,00456	0,00854	0,01008		1039,00	675,00	618,00	972,00
P	0,01581	0,01742	0,02120	0,01815		862,00	939,00	957,00
Mr	0,00410	0,00961	0,00962	0,00778	0,01843		1113,00	1376,00
Hm	0,00273	0,00916	0,00763	0,00731	0,01828	0,00685		364,00
Yu	0,00091	0,00609	0,00640	0,00548	0,01549	0,00502	0,00365	

Triángulo superior: distancias geográficas (en Km)

Triángulo inferior: distancias nucleotídicas.

**Fig. 3.5: Secuenciación completa de los 19 haplotipos encontrados para el gen COIL.**

**B**

TTGAGTCTATTTGAACAATTTTGCCAGCTATTATTCTATTATTTATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
 TTTTATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
 ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
 AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
 AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTGGAGTAA  
 AGGTAGATGGAACCTCCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
 ATGGTCAATGTTCAGAAATTT

**C1**

TTGAGTCTATTTGAACGATTTTGCCAGCTATTATTATATTATTTATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
 GTTTATATTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
 ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
 AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
 AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTGGAGTAA  
 AGGTAGATGGAACCTCCTGGACGATTAATCAAATTAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
 NNN

**C8**

TTGAGTCTATTTGAACGATTTTGCCAGCTAGTATTATATTATTTATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
 TTTTATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
 ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
 AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
 AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTGGAGTAA  
 AGGTAGATGGAACCTCCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
 ATGGTCAATGTTCAGAAATTT

**Co1**

GTGAGTCTATGTGTACAATTTTGCCAGCTATTATTCTATTATATATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
 TTTTATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
 ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
 AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
 AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTGGAGTAA  
 AGGTAGATGGAACCTCCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTATAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
 ATGGTCAATGTTCAGAAATTT

**Co6**

TGGAGTCTATTGGAACAATTTTGCCAGCTATTATTCTATTATTTATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
 TTTTATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
 ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
 AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
 AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTGGAGTAA  
 AGGTAGATGGAACCTCCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
 ATGGTCAATGTTCAGAAATTT

**Fig. 3.5: Continuación:****Co8**

TTGAGTCTATTTGAACAATTTTGCCAGCTATTATTCTATTATTTATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
 TTTTATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
 ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
 AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
 AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTGGAGTAA  
 AGGTAGATGGAACCTCCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
 ATGGTCAATGTTCAGAAATTT

**Me1**

TTGAGTCTATTTGAACGATTTTGCCAGCTATTATTCTATTATTAATTTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
 TTTGATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
 ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
 AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
 AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTGGAGTAA  
 AGGTAGATGGAACCTCCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
 ATGGTCAATGTTCAGAAATTT

**Me2**

TTGAGTCTATTTGAACGATTTTGCCAGCTATTATTCTATTATTTATTGCTTGTCTTCTTTACGAC  
 TTTTATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
 ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
 AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
 AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTGGAGTAA  
 AGGTAGATGGAACCTCCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
 ATGGTCAATGTTCAGAAATTT

**Mr1**

TTGAGTCTATTTGAACAATTTTGCCAGCTATTATTCTATTATTTATTGCTTGTCTTCTTTACGAC  
 TTTTATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
 ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
 AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
 AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTGGAGTAA  
 AGGTAGATGGAACCTCCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
 ATGGTCAATGTTCAGAAATTT

**Mr6**

TTGAGTCTATTTGAACAATTTTGCCAGCTATTATTCTATTATTTATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
 TTTTATATTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
 ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
 AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
 AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTGGAGTAA  
 AGGTAGATGGAACCTCCTGGACGACTAAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
 ATGGTCAATGTTCAGAAATTT

**P1**

TTGAGTCTATTTGAACAATTTTGCCAGCTAGTATTATATTATTTATTGCTTGTCTTCTTTACGAC  
 TTTTATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
 ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
 AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
 AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTGGAGTAA  
 AGGTAGATGGAACCTCCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
 ATGGTCAATGTTCAGAAATTT

**Fig. 3.5: Continuación:****P2**

TTGAGTCTATTTGAACAATTTTGCCAGCTATTATTCTATTATTTATTGCTTTACCTTCTTTACGAC  
TTGTATACTTGATTGACGAAATGAGTGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTTGGAGTAA  
AGGTAGATGGAACCTCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
ATGGTCAATGTTTCAGAAATTT

**P3**

TTGAGTCTAGTTGAACAATTTTGCCAGCTAGTATTATATTTAAAATTTGCTTGACCTTCTCGACGAA  
ACTGATACTTGATTGACGAAATTAGTGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTTGGAGTAA  
AGGTAGATGGAACCTCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
ATGGTCAATGTTTCAGAAATTT

**P6**

TTGAGTATAGTTGAACGATTTTTCCAGCTAGTATTATATTATTTATTGCTTGACCTTCTCGACGAG  
GTGTATGCTTAATTGACGAAATTTGGGGGACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTTGGAGTAA  
AGGTAGATGGAACCTCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
ATGGTCAATGTTTCAGAAATTT

**P8**

TTGAGTCTATTTGAACGATTTTTGCCAGCTATTATTCTATTATTTATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
TTTGATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTTGGAGTAA  
AGGTAGATGGAACCTCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
ATGGTCAATGTTTCAGAAATTT

**P9**

TTGAGTCTATTTGAACAATTTTGCCAGCTAGTATTATATTATTTATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
TTTTATATTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTTGGAGTAA  
AGGTAGATGGAACCTCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
ATGGTCAATGTTTCAGAAATTT

**P10**

TTGAGTCTATTTGAACAATTTTGCCAGCTATTATTATATTATTTATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
TTTTATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTTGGAGTAA  
AGGTAGATGGAACCTCTGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
ATGGTCAATGTTTCAGAAATTT

**Fig. 3.5: Continuación:****Hm4**

TGGAGTATATTTGAACAATTTTGCCAGCTATTATTCTATTATTTATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
TTTTATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTTGGAGTAA  
AGGTAGATGGAACCTCGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
ATGGTCAATGTTTCAGAAATTT

**Hm5**

TTGAGTCTATTTGAACAATTTTACCAGCTATTATTCTATTATTTATTGCTTTTCCTTCTTTACGAC  
TTTTATACTTAATTGACGAAATTAATGAACCTTCAGTAACTCTAAAAGCTATTGGACACCAATGAT  
ACTGAAGTTATGAATATTCAGATTTTATAAATGTAGAATTTGATTCATATATAATCCCAACAAATG  
AATTAACAGTAGATAGATTCCGATTACTAGATGTAGATAATCGTGTTATTTTACCAATAAATTCAC  
AAATTCGTATTTTAGTAACAGCCGCAGATGTAATTCATTCATGAACAGTACCCGCTCTTGGAGTAA  
AGGTAGATGGAACCTCGGACGATTAATCAAATTAATTTTTTAATAAATCGACCAGGATTATTCT  
ATGGTCAATGTTTCAGAAATTT

**Referencias:**

**B:** haplotipo presente en Pelotas, Castelar, Merlo, Posadas y Horco Molle.

**C:** Castelar

**Co:** Concordia

**Me:** Merlo

**P:** Posadas

**Mr:** Ministro Rivadavia

**Hm:** Horco Molle

**-:** base faltante

**N:** sitio no analizado

**Tabla 3.12: Frecuencias por localidad de los haplotipos hallados en el gen COII.**

LOCALIDAD	PROVINCIA PAÍS	ACRÓNIMO	N	FRECUENCIAS DE HAPLOTIPOS
<b>Yuto</b>	Jujuy Argentina	Yu	3	2 B*; 1 P10
<b>Horco Molle</b>	Tucumán Argentina	Hm	3	1 B*; 1 Hm4; 1 Hm5
<b>Merlo</b>	San Luis Argentina	Me	3	1 B*; 1 Me1; 1 Me2
<b>Posadas</b>	Misiones Argentina	P	9	1 B*; 2 P1; 1 P2; 1 P3; 1 P6; 1 P8; 1 P9; 1 P10
<b>Concordia</b>	Entre Ríos Argentina	Co	3	1 Co1; 1 Co6; 1 Co8
<b>Castelar</b>	Buenos Aires Argentina	C	3	1 B*; 1 C1; 1 C8
<b>Ministro Rivadavia</b>	Buenos Aires Argentina	Mr	2	1 R1; 1 R6
<b>Pelotas</b>	Río Grande do Sul Brasil	Pe	2	2 B*

\* Haplotipo B: común a varias poblaciones.

Fig. 3.6: Árbol de consenso estricto de todos los haplotipos encontrados, obtenido a partir del programa NONA (Goloboff 1994). Se indican los valores de bootstrap significativos (> 50 %)

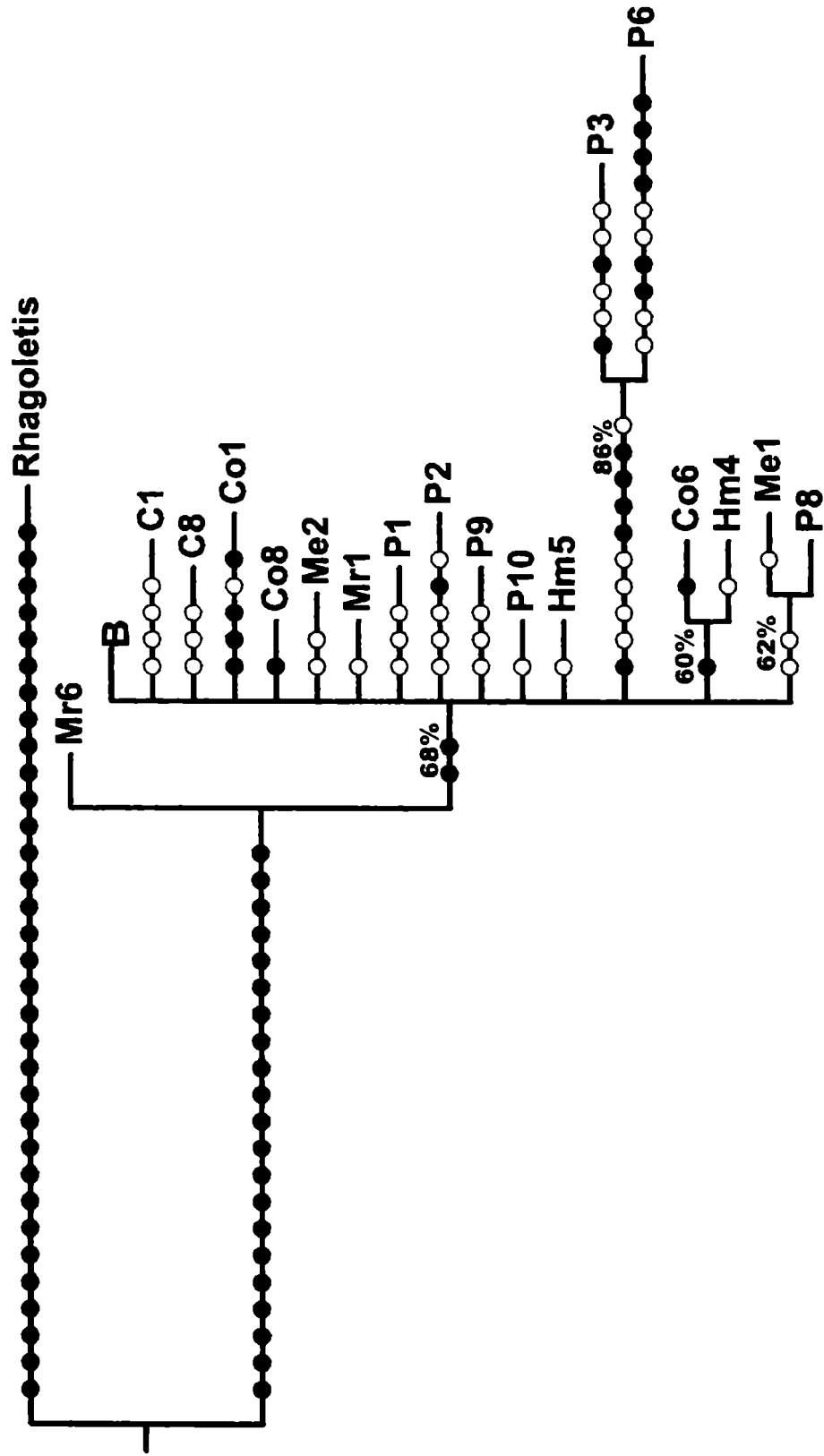
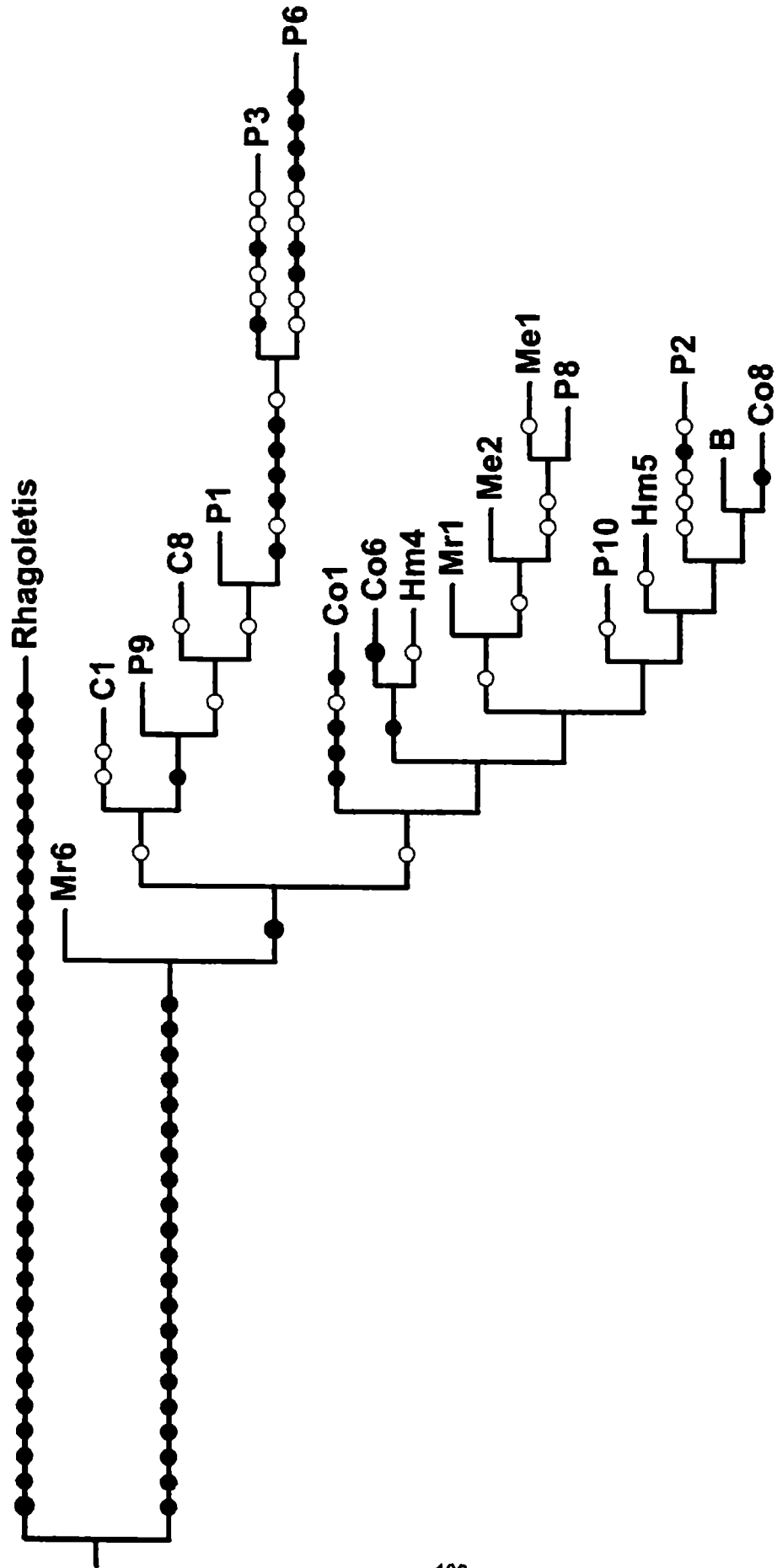


Fig. 3.7: Árbol a partir del cual se realizó el análisis anidado.

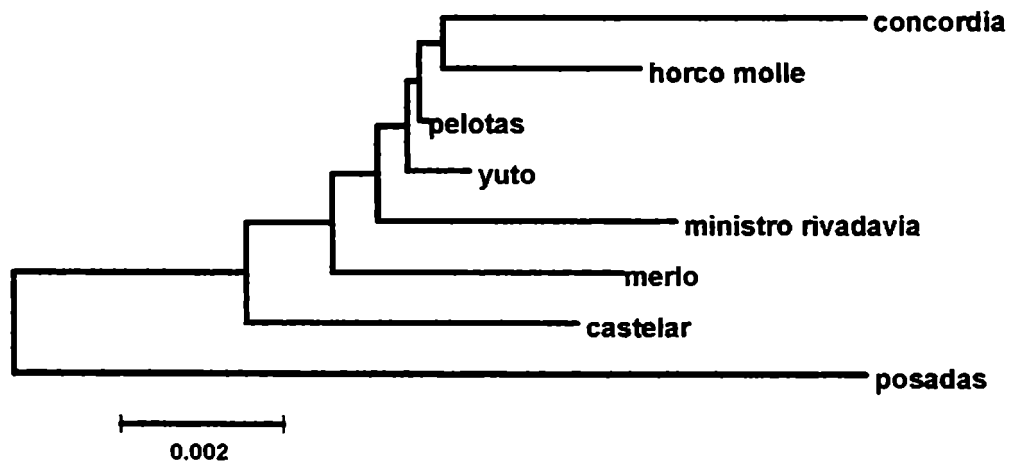






**Tabla 3.13: Análisis de contingencia anidado de asociación geográfica para los haplotipos de COII.**

<b>CLADO</b>	<b>ESTADISTICO <math>\chi^2</math> DE PERMUTACIÓN</b>	<b>PROBABILIDAD</b>
1 – 1	35,2083	0,1770
1 – 4	2,0000	1,0000
1 – 8	3,0000	0,3290
1 – 9	2,0000	1,0000
2 – 1	4,9083	0,9260
2 – 3	0,7500	1,0000
2 – 5	6,0000	1,0000
3 – 1	27,8044	0,5530
3 – 2	0,4444	1,0000
4 – 2	0,3125	1,0000
<b>Cladograma total</b>	<b>8,3053</b>	<b>0,4070</b>



**Fig. 3.9: Árbol de todas las poblaciones obtenido por el método de NJ.**

### 3.2.3. Análisis de las secuencias del gen mitocondrial 16S

En el caso del fragmento secuenciado perteneciente al gen ribosómico que codifica para la subunidad 16S del ADN mitocondrial, se analizaron un total de 13 secuencias de la hebra sentido del ADN (a partir del cebador LR-J-12883) y 13 secuencias de la hebra antisentido del ADN (a partir del cebador LR-N-13398), las cuales fueron editadas mediante el programa BioEdit (Hall, T.A. 1999) (Ver ítem 2.2.4. de Material y Métodos).

Del producto de amplificación pudieron analizarse 270 pares de bases (pb). Del alineamiento de las 13 secuencias surgió que 10 de ellas eran distintas por lo que fueron definidas como haplotipos diferenciados. La fig. 3.10 muestra las secuencias completas de estos haplotipos cuyos acrónimos y frecuencias en las distintas poblaciones se describen de la tabla 3.15.

Hubo un haplotipo, al que denominamos A, que apareció tanto en **Horco Molle** como en **Ministro Rivadavia**. Los demás estuvieron presentes en una sola población.

Las frecuencias nucleotídicas a lo largo de los 270 pb analizados fueron las siguientes:

T = 36.40 %

A = 45.90 %

C = 10.90 %

G = 6.70 %

Se observa en estas proporciones un fuerte sesgo hacia A + T, un 82.3 % entre todos los individuos.

A partir del alineamiento de estas secuencias se construyó una matriz de datos moleculares que fue analizada cladísticamente mediante el programa NONA (Goloboff 1994), utilizándose como grupos externos, de acuerdo con la información disponible en el GeneBank, a *Anastrepha striata* (AF152088) y *A. fraterculus* (AF152067), de la localidad de Bertioga (Brasil) (McPheron et al. 2000-a).

Los caracteres fueron tratados como desordenados y con igual peso. De ellos, 248 fueron constantes, 17 variables y no informativos y 5 fueron variables e informativos.

La búsqueda exacta arrojó un total de 8 árboles de longitud  $L = 26$ , un índice de consistencia  $CI = 92$  y un índice de restricción  $RI = 81$ .

En la fig. 3.11 se muestra el árbol consenso de todos los haplotipos encontrados. Se observa en él una politomía formada por todos los haplotipos y el grupo externo *A. fraterculus* de Bertioga (Brasil).

Una de las ramas de esta politomía agrupa a los haplotipos **C2**, **C3** y **Mr1**.

Se concluye que el árbol consenso obtenido está muy poco resuelto, lo cual se debe fundamentalmente al bajo número de caracteres informativos que se obtuvo del alineamiento de las secuencias.

Es por este motivo que en este caso no se aplicó el análisis de anidamiento para investigar la asociación entre diversidad de haplotipos y distribución geográfica.

Cuando se analizaron las distancias de sustitución nucleotídica interpoblacionales aplicando el algoritmo de Neighbour joining, como se muestra en la fig. 3.12., se observó que poblaciones muy alejadas geográficamente presentaban poca distancia genética. Es decir que el árbol

agrupó a las distintas poblaciones sin seguir un patrón acorde a la distribución geográfica.

Estos datos parecen sugerir que no existe asociación significativa entre la variabilidad haplotípica y su distribución geográfica. Para convalidar estadísticamente esta conclusión se compararon las matrices de distancias nucleotídicas y geográficas mediante el test de Mantel (Mantel 1967). Con 500 permutaciones, la probabilidad de obtener una correlación más alta que la observada fue  $P = 0.41$ (tabla 3.14).

**Tabla 3.14: Distancias nucleotídicas vs. Distancias geográficas del gen 16S analizadas mediante el Test de Mantel.**

	<b>C</b>	<b>P</b>	<b>Mr</b>	<b>Hm</b>	<b>Yu</b>
<b>C</b>		848,00	33,50	1084,00	1352,00
<b>P</b>	0,02210		862,00	939,00	957,00
<b>Mr</b>	0,01509	0,01127		1113,00	1376,00
<b>Hm</b>	0,01765	0,00873	0,00626		364,00
<b>Yu</b>	0,01830	0,00560	0,00876	0,00498	

Triángulo superior: distancias geográficas (en Km)

Triángulo inferior: distancias nucleotídicas.

**Fig. 3.10: Secuenciación completa de los 13 haplotipos encontrados para el gen ribosomal 16S.**

**A**

GTCGATATGAACTCTCAAAAAAATTACGCTGTTATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATAATCAATA  
TTAATGGATCAATAATTCATAAATTAATGATTTAAAAAATTTAAAAGTTCATTAAATTTAATATC  
ACCCCAACAAAATAATTAATATAAAAAAATAAAATAAATCAAAAAAATTTAGTTTATATTAATA  
TAAAGATTTATAGGGTCTTCTCGTCTTTTAATAAAAATTTAGCTTTTTAACTAAAATATAAA-TTC  
TATTAT

**C1**

GTCGATATGAACTCTCAAAAAAATTACGCTGTTATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATAATCAATA  
TTAATGGATCAATAATTCATAAATTAATGATTTAAAAAATTTAAAAGTTCATTAAATTTAATATC  
ACCCCAACAAAATAATTAATATAAAAAAATAAAATAAATCAAAAAAATTTAGTTTATATTAATA  
TAAAGATTTATAGGGTCTTCTCGTCTTTTAATAAAAATTTAGCTTTTTAACTAGTATATGAA-TTC  
TATTAT

**C2**

GTCGATATGAACTCTCAAAAAAATTACGCTGTTATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATAATCAATA  
TTAATGGATCAATAATTCATAAATTAATGATTTAAAAAATTTAAAAGTTCATTAAATTTAATATC  
ACCCCAACAAAATAATTAATATAAAAAAATAAAATAGATCAAAAAAATTTAGTTTATATTAATA  
TAAAGATTTATAGGGTCTTCTCGTCTTTTAATGAAATTTAGCTTTTTAACTGGTATATGGA-TTC  
TATTAT

**C3**

GTCGATATGAACTCTCACAAAAAATTACGCTGTGATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATAATCAATA  
TTAATGGATCAATAATTCATAAATTAATGATTTAAAAAATTTAAAAGTTCATTAAATTTAATATC  
ACCCCAACAAAATAATTAATATAAAAAAATAAAATAAATCAAAAAAATTTAGTTTATATTAATA  
TAAAGATTTATAGGGTCTTCTCGTCTTTTAATAAAAATTTAGCTTTTTAACTAGAAATATAAA-TTC  
TATTAT

**P1**

GTCGATATGAACTCTCAAAAAAATGACGCTGTCATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATAATCAATA  
TTAATGGATCAATAATTCATAAATTAATGATTTAAAAAATTTAAAAGTTCATTAAATTTAATATC  
ACCCCAACAAAATAATTAATATAAAAAAATAAAATAAATCAAAAAAATTTAGTTTATATTAATA  
TAAAGATTTATAGGGTCTTCTCGTCTTTTAATAAAAATTTAGCTTTTTAACTAAAATATAAA-TTC  
TATTAT

**P2**

GTCGATATGAACTCTCAAAAAAATTACGCTGTCATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATAATCAATA  
TTAATGGATCAATAATTCATAAATTAATGATTTAAAAAATTTAAAAGTTCATTAAATTTAATATC  
ACCCCAACAAAATAATTAATATAAAAAAATAAAATAAATCAAAAAAATTTAGTTTATATTAATA  
TAAAGATTTATAGGGTCTTCTCGTCTTTTAATAAAAATTTAGCTTTTTAACTTAAATATAAA-TTC  
TATTAT

**Mr1**

GTCGATATGAACTCTCAAAAAAATTACGCTGTTATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATAATCAATA  
TTAATGGATCAATAATTCATAAATTAATGATTTAAAAAATTTAAAAGTTCATTAAATTTAATATC  
ACCCCAACAAAATAATTAATATAAAAAAATAAAATAAATCAAAAAAATTTAGTTTATATTAATA  
TAAAGATTTATAGGGTCTTCTCGTCTTTTAATAAAAATTTAGCTTTTTAACTTGTATATGAA-TTC  
TATTAT



**Fig. 3.10: Continuación:****Hm1**

GTCGATATGAACTCTCAAAAAAATTACGCTGTTATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATAATCAATA  
 TTAATGGATCAATAATTCATAAATTAATGATTTAAAAAATTAAAAGTTCATTAAATTTAATATC  
 ACCCCAACAAAATAATTAATATAAAAAAATAAAATAAATCAAAAAAATTTAGTCTATATTAATA  
 TAAAGATTTATAGGGTCTTCTCGTCTTTTAATAAAATTTTAGCTTTTAACTAAAATATAAA-TTC  
 TATTAT

**Yu1**

GTCGATATGAACTCTCAAAAAAATTACGCTGTCATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATAATCAATA  
 TTAATGGATCAATAATTCATAAATTAATGATTTAAAAAATTAAAAGTTCATTAAATTTAATATC  
 ACCCCAACAAAATAATTAATATAAAAAAATAAAATAAATCAAAAAAATTTAGTTTATATTAATA  
 TAAAGATTTATAGGGTCTTCTCGTCTTTTAATAAAATTTTAGCTTTTAACTAAAATATAAA-TTC  
 TATTAT

**Yu2**

GTCGATATGAACTCTCAAAAAAATTACGCTGTGATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATAATCAATA  
 TTAATGGATCAATAATTCATAAATTAATGATTTAAAAAATTAAAAGTTCATTAAATTTAATATC  
 ACCCCAACAAAATAATTAATATAAAAAAATAAAATAAATCAAAAAAATTTAGTTTATATTAATA  
 TAAAGATTTATAGGGTCTTCTCGTCTTTTAATAAAATTTTAGCTTTTAACTAAAATATAAA-TTC  
 TATTAT

**Referencias:**

C: Castelar

P: Posadas

Mr: Ministro Rivadavia

Hm: Horco Molle

Yu: Yuto

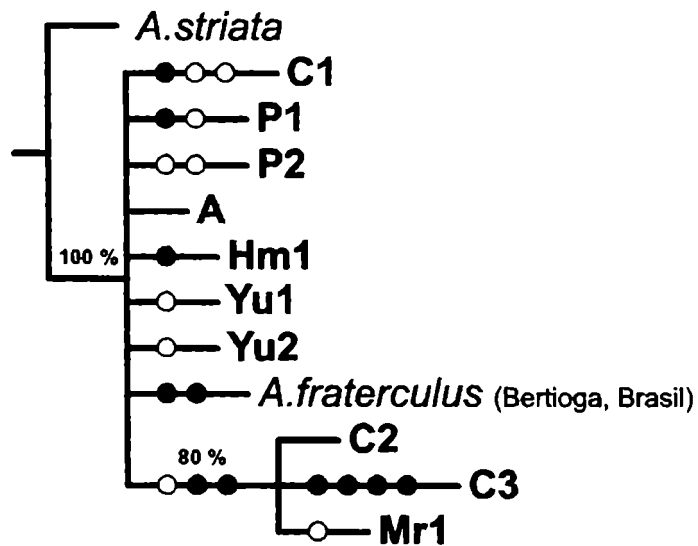
A: haplotipo compartido por Ministro Rivadavia y Horco Molle.

-: base faltante

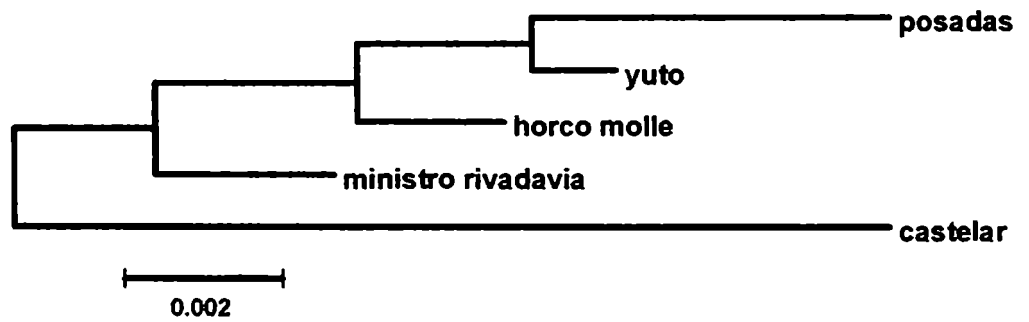
**Tabla 3.15: Frecuencias por localidad de los haplotipos hallados en el gen 16S.**

<b>LOCALIDAD</b>	<b>ESTADO PAIS</b>	<b>ACRÓNIMO</b>	<b>N</b>	<b>FRECUENCIAS DE HAPLOTIPOS</b>
<b>Yuto</b>	Jujuy Argentina	Yu	2	1 Yu1; 1 Yu2
<b>Horco Molle</b>	Tucumán Argentina	Hm	3	2 A*; 1 Hm1
<b>Posadas</b>	Misiones Argentina	P	2	1 P1; 1 P2
<b>Castelar</b>	Buenos Aires Argentina	C	3	1 C1; 1 C2; 1 C3
<b>Ministro Rivadavia</b>	Buenos Aires Argentina	Mr	3	2 A*; 1 R1

**\* Haplotipo B: común a las poblaciones de Ministro Rivadavia y Horco Molle.**

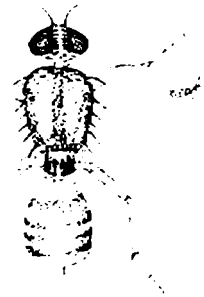


**Fig. 3.11:** Árbol consenso de todos los haplotipos encontrados, obtenido a partir del programa NONA (Goloboff 1994). Se indican los valores de bootstrap significativos (> 50 %).



**Fig. 3.12: Árbol del gen ribosomal 16S de todas las poblaciones estudiadas obtenido con el método de NJ.**

# 4. *Discusión*



#### **4.1. Estudio de Estructura Genética en una población por medio de Electroforesis de Isoenzimas**

Una característica distintiva de la estructura de las poblaciones de los tefritidos y otras especies de dípteros, es la alternancia de ambientes continuos y discontinuos para los estadios adultos y larvales respectivamente.

Durante el estado adulto los procesos evolutivos pueden operar uniformemente sobre la población global, quedando poco espacio para los efectos de la deriva genética.

En contraste la población de larvas está compuesta de algunas subpoblaciones o parches ambientales constituidos por las frutas atacadas, los cuales poseen un pequeño tamaño efectivo. Además una alta proporción de individuos dentro de cada fruto pueden ser hermanos enteros.

La eficiencia de la selección dentro de las frutas puede verse reducida por el efecto fundador y podemos esperar entonces diferencias entre frutos a causa de la deriva genética.

Esta estructura alternante puede tener consecuencias en la distribución de la variabilidad en adultos y larvas, dando como resultado una oportunidad única para estudios de estructura poblacional.

Considerando loci neutros en una población subestructurada, se espera que, si el número efectivo de individuos reproductores es pequeño, habrá tendencia al exceso de heterocigotas dentro de cada demo debido a que las frecuencias alélicas diferirán entre machos y hembras a causa del azar. Esta condición es alcanzada inmediatamente tomando generaciones completas y produciendo valores de  $F_{IS}$  relativos al tamaño poblacional efectivo ( $N$ ) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$F_{IS} = -1/(2N) \quad (\text{Long 1986}) \quad (1)$$

La diferenciación entre demos, al mismo tiempo, tiende a incrementarse de generación en generación ( $t$ ) de acuerdo a:

$$F_{ST} = 1 - \left\{ 1 - 1/(2N) \right\}^t \quad (\text{ver Hedrick 1983}) \quad (2)$$

Si el aislamiento entre demos dura una sola generación la ecuación (2) se reduce a:

$$F_{ST} = 1/(2N) \quad (3)$$

Y se espera que  $F_{IS} = -F_{ST}$  (ver Civetta et al. 1990 y Vilardi et al. 1994-a).

Sobre este fundamento Civetta et al. (1990) analizaron la estructura genética en poblaciones argentinas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann).

Ellos concluyeron que cada fruto es usado por sólo una generación de larvas y que la estructura genética puede ser explicada principalmente por azar. Cada fruto es colonizado por alrededor de cuatro o cinco hembras y, a su vez, cada una ovipone en un solo fruto.

Se evaluó la distribución de la variación genética dentro y entre frutas individuales siguiendo un procedimiento similar al aplicado por (Civetta et al., 1990) en *C. capitata*. Esto permitió una aproximación a la dinámica interna de una población natural con el objetivo de determinar las posibles causas del desvío de las frecuencias genotípicas con respecto a lo esperado para el equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de una población individual. (Alberti et al. 1999).

Aunque el comportamiento de oviposición y el ciclo de vida de *A. fraterculus* es muy similar al de *C. capitata* (Morgante 1991), los resultados de esta tesis muestran discrepancias con lo esperado. En particular, se observó un exceso de homocigotas, tanto dentro de frutos ( $F_{IS} > 0$ ) como en la población total ( $F_{IT} > 0$ ).

Este alto número de homocigotas podría atribuirse a una sobrestimación debido a la ocurrencia de alelos nulos no expresados. Estos pueden estar presentes en muy baja frecuencia enmascarando los heterocigotas entre ellos y los alelos con expresión fenotípica, dando falsos homocigotas. Sin embargo, no existe evidencia de tales alelos ya que nunca se encontraron calles vacías en los geles que deberían aparecer (en muy baja frecuencia) como resultado de la siembra de un homocigota para alelos nulos en dichas calles.

Una posible explicación para el exceso de homocigotas puede ser la endogamia debido al apareamiento entre individuos relacionados por parentesco y emergidos del mismo fruto.

No obstante, esto no es muy probable, pues la madurez sexual se alcanza aproximadamente a los 10 días de la emergencia del adulto (Petit y Vilardi 1999). Durante este período las moscas hermanas emergen del sustrato original, ya podrido e inútil para propósitos alimentarios, y se dispersan en busca de agua y comida.

Por otro lado, el tiempo diferente de desarrollo entre machos y hembras, junto con la habilidad de dispersión de los adultos inmaduros, (Salles 1995) reduciría la probabilidad de apareamientos endogámicos. Por lo tanto, no es de esperar que ocurran apareamientos entre hermanos en una tasa significativa.



Steck (1991) hizo un amplio estudio en distintas poblaciones de esta especie empleando diferentes metodologías. Él se interesó por la estimación de las diferencias alélicas entre poblaciones geográficamente aisladas y estimó la variabilidad y las frecuencias genotípicas en el nivel poblacional, sin considerar las subdivisiones internas (frutos) de la población larval.

Sin embargo, también encontró exceso de homocigotas en todas las poblaciones, cuantificado a través del  $F_{IS}$  (Tablas 1-3 en el mencionado estudio) que representa lo que aquí se considera exceso de homocigotas en la población total, equivalente al  $F_{IT}$  obtenido en **Yuto**.

Las estimaciones de los valores de  $F_{IS}$  de Stek (1991) para lo que él denominó Grupo 2 de las poblaciones de *A. fraterculus* (Perú, Venezuela y Andes venezolanos) fueron positivas para la mayoría de los loci con un promedio de 0.30, similar al  $F_{IT}$  promedio de la localidad de **Yuto**, que fue de 0.35, indicando una tendencia fuerte al exceso de homocigotas.

Además, las correlaciones observadas y esperadas entre las frecuencias de los diferentes alelos de cada locus (Tabla 3.4), también resultaron diferentes a las del modelo teórico.

El comportamiento del locus *Mdh-1* mostró diferencias significativas respecto de otros loci con relación al coeficiente efectivo de endogamia ( $F_e$ ) (Tabla 3.5), alejándose del valor esperado si los alelos fueran selectivamente neutrales.

Debido al desvío de la neutralidad, estos resultados no son compatibles con las diferencias entre sustratos esperadas por deriva genética y efecto fundador en una población homogénea.

Los datos en la Tabla 3.6 pueden ser interpretados como una prueba adicional de que la estructuración de la población no es debida al azar.

Los presentes resultados y la variabilidad cromosómica detectada en la misma muestra (Vilardi et al. 1994-b, Manso y Basso 1999) pueden estar relacionados con distintas características de estas especies.

Estudios sobre la variabilidad genética en poblaciones sudamericanas de esta mosca, sugieren que dentro del nombre *A. fraterculus*, pueden agruparse especies sinmórficas monofiléticas.

Por otro lado, las poblaciones de *A. fraterculus* del grupo 2 de Steck (1991) están geográficamente cercanas a las poblaciones estudiadas aquí y, en forma consistente, muestran el más elevado exceso de homocigotas y fueron las que más se diferenciaron entre sí. (El mayor  $F_{ST}$ ). En concordancia con los resultados obtenidos en Yuto, este exceso de homocigotas se aleja de lo esperado por azar.

Debido a que se descarta como posible causa de este exceso de homocigotas el apareamiento entre hermanos, una causa alternativa del desvío de las predicciones de Hardy-Weinberg puede ser la mezcla de individuos de distinto origen que no constituyan una población mendeliana, o selección de hábitat. Estos resultados son también compatibles con la existencia de variación genética entre poblaciones vecinas.

Esta mezcla entre individuos de distinto origen se explican por el comportamiento particular de estas especies polífagas, caracterizado por la continua búsqueda de hospederos disponibles. Los sitios muestreados pueden involucrar un grupo heterogéneo de individuos de diferente procedencia, en vez de una población mendeliana. (Alberti et al. 1999).

Dado que *A. fraterculus* está descrita como una especie colonizadora que experimenta cambio de plantas hospederas durante el año,

las frecuencias alélicas pueden cambiar de generación en generación por efecto fundador con cada cambio de hospedero.

Es decir, cada población podría no ser estable, sino estar constituida por una mezcla de individuos migrantes provenientes de diferentes sitios en busca de un hospedador disponible. Tal comportamiento es esperable que produzca exceso de homocigotas.

Por otro lado, Malavasi y Morgante en 1982 mostraron que en *A. fraterculus* ocurren drásticas reducciones en el tamaño poblacional, las que podrían llevar a una pérdida de alelos, con la consecuente pérdida de la variabilidad genética.

En *C. capitata*, Civetta et al. (1995) mostraron la ocurrencia de tales cambios en las frecuencias alélicas y la estructura genética cuando el análisis fue realizado sobre dos plantas hospederas.

Consecuentemente, las poblaciones de *A. fraterculus* pueden estar constituidas por una mezcla de individuos procedentes de diferentes orígenes, con el consecuente desequilibrio respecto de lo esperado por el modelo de Hardy-Weinberg para las asociaciones gaméticas.

Estos resultados están de acuerdo con Morgante et al. (1980) quienes encontraron que había un sustancial grado de diferenciación genética en poblaciones simpátricas colectadas en Brasil.

Los antecedentes y los presentes resultados podrían indicar que, al menos en algunos casos, las poblaciones de *A. fraterculus* incluirían en realidad grupos heterogéneos con un grado variable de divergencia genética, dando como resultado una subestructuración mayor que la esperada por deriva genética en poblaciones uniformes.

#### 4.2. Estudio de variabilidad genética en poblaciones naturales

Como se dijo anteriormente, estudios previos sobre variación genética en *A. fraterculus* (Stone 1942, Baker et al. 1944, Morgante et al. 1980, Morgante y Malavasi 1985, Steck 1991, Steck y Sheppard 1993) mostraron que este nombre específico puede involucrar grupos de poblaciones con un alto grado de diferenciación genética, mayor que el esperado para poblaciones coespecíficas.

Steck (1991) observó que un grupo de poblaciones compuesto por tierras bajas de Venezuela, Costa Rica y México era muy diferente de otro grupo de poblaciones constituido por Andes venezolanos, Perú y San Pablo (Brasil).

La diferenciación entre las muestras provenientes del Noreste y Sur de Brasil fueron confirmadas por Steck y Sheppard (1993) con el análisis de los patrones de variación del ADN mitocondrial entre las poblaciones de Bahía (Brasil) y la costa de Venezuela, a pesar de los bajos valores de diferenciación isoenzimática.

Debido a que esta mosca es originaria de Sudamérica, con posterior expansión al resto del continente (Hernández-Ortiz 1992), los estudios de variabilidad en esta región son de gran importancia para una mejor comprensión de la historia evolutiva de esta especie o grupo de especies sinmórficas.

Las características biogeográficas de la Argentina y su gran extensión provee una conexión entre el Sur de Brasil y la región de los

Andes, con una diversidad de ambientes que pueden ser colonizados por *A. fraterculus*.

Sin embargo, a pesar de esta amplia distribución en Sudamérica, la información acerca de la variabilidad genética de las poblaciones de esta mosca en Argentina es muy escasa.

En esta tesis se estudió la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones naturales de *A. fraterculus* usando las siguientes metodologías:

- a) Tres sistemas isoenzimáticos que evidenciaron alta variabilidad en estudios previos (Vilardi et al. 1994-a, Alberti et al. 1999).
- b) Polimorfismos para fragmentos de ADN mitocondrial analizados por PCR-RFLP.
- c) Secuenciación de dos fragmentos de ADN mitocondrial.

Las poblaciones muestreadas son representativas de una gran diversidad de ambientes y características biogeográficas, involucrando localidades desde el Sur del Brasil y noreste de Argentina, en el este, hasta los Andes en el noroeste de Argentina.

Una característica común a todas las poblaciones fue otra vez el exceso de homocigotas dentro de ellas ( $F_{IS} > 0$ ).

Esta desviación de lo esperado según las proporciones de Hardy-Weinberg ha sido también observada en otras poblaciones de esta especie (Steck 1991, Steck y Sheppard 1993, Alberti et al. 1999, 2002).

Las poblaciones estudiadas aquí mostraron muy alta similitud genética. De 8 loci isoenzimáticos, 5 fueron invariables en todas ellas. El análisis de la estructura basado en los 3 loci más variables, dio como

resultado que la diferenciación entre poblaciones, estimada a partir del coeficiente  $F_{ST}$ , fuera significativa. Sin embargo, la estimación indirecta del flujo génico ( $Nm$ ) fue mayor que 1, según lo esperado para poblaciones coespecíficas.

De acuerdo con estos resultados las distancias genéticas entre poblaciones, variaron dentro del intervalo esperado (Ayala y Gilpin 1974) para poblaciones coespecíficas, a pesar que se consideraron sólo los loci variables.

El análisis jerárquico de la distribución de la variación genética basado en el método de Wright (1978), indicó que toda la variación entre poblaciones puede ser explicada por la diferenciación dentro de las regiones.

La proporción de la variación genética que ocurre dentro de las poblaciones, expresada en términos de diversidad genética (Nei 1973, 1977) fue de alrededor del 95% y la diferenciación entre poblaciones alcanzó sólo el 5% de la diversidad total.

En el fenograma (fig. 3.3) obtenido a partir de la matriz de distancia de Nei, las poblaciones del Noreste (**Posadas** y **Concordia**) forman un agrupamiento con alta similitud genética, y lo mismo ocurre con dos de las poblaciones del Noroeste (**Aicuña** y **Horco Molle**).

Esos dos agrupamientos forman a su vez otro grupo sugiriendo un alto grado de similitud entre las poblaciones del Norte. Sin embargo **Yuto** no se encuentra en este conjunto y se agrupa con **Ministro Rivadavia** y **Moreno**, ambas de la región Sur.

Las poblaciones del sur de Argentina muestran una importante diversidad a pesar de la proximidad geográfica. La distancia promedio entre poblaciones dentro de esta región fue 0.09. Este valor fue más alto que los

observados entre poblaciones de algunas de las otras regiones, y fue también más alto que la distancia promedio entre poblaciones de diferentes regiones.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos a partir del análisis jerárquico.

Es otra vez evidente que las poblaciones no están agrupadas de acuerdo a un patrón de distribución geográfica y que no se encontró diferenciación regional en este país, a pesar del hecho que los loci isoenzimáticos analizados fueron seleccionados por su alta variabilidad.

La mayor discrepancia entre las distancias genética y geográfica se evidencia en la alta diversidad entre poblaciones del Sur y la alta similitud entre **Yuto** con una población de esta región.

La alta diversidad dentro de la región Sur puede estar relacionada con el intenso intercambio comercial de fruta debido a la proximidad de la Ciudad de Buenos Aires.

La importación de fruta proveniente de diferentes regiones favorece la inmigración de moscas transportadas pasivamente, incrementando la diversidad genética en dicha área.

El gen mitocondrial 16S del ADN<sub>r</sub> ha sido usado por varios autores para inferir relaciones entre poblaciones, por debajo del nivel de familia. Este gen acumula mutaciones más rápidamente que el nuclear ADN<sub>r</sub> (Han y McPheron 1997). Dicho gen es muy útil para estudiar relaciones entre insectos desde el nivel de especie hasta el nivel de familia (McPheron y Han 1997).

El análisis del polimorfismo para la longitud de los fragmentos generados por endonucleasas de restricción en la región del gen 16S del ADN mitocondrial analizado aquí, mostró en estudios previos (en los que se

utilizaron las mismas enzimas) variación entre poblaciones (McPheron et al. 2000-a). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis son consistentes con la identidad taxonómica encontrada entre todas las poblaciones estudiadas.

En todos los individuos de las diferentes poblaciones analizadas se observó un único patrón de restricción. Ese patrón fue, sin embargo, diferente de los encontrados en las poblaciones de Bertioga (Brasil) y Mérida (Venezuela), tomando en cuenta la secuencia disponible en el GenBank (accesos: AF152067 y AF152066 respectivamente) (McPheron et al. 2000-a).

En individuos de Mérida y Bertioga está presente un sitio *Mnl I*, el que puede originar dos fragmentos de alrededor de 443/444 y 35 pares de bases (pb) respectivamente. Este sitio parece estar presente en las poblaciones estudiadas aquí, ya que una digestión parcial produce un fragmento de alrededor de 440 pb. Sin embargo, una digestión completa produce un fragmento de alrededor de 330 pb, sugiriendo la presencia de un segundo sitio para esta enzima, aunque probablemente los fragmentos originados por este segundo sitio no puedan ser reconocidos en un gel por su pequeño tamaño.

En Bertioga se encontraron 3 sitios para *Ase I* correspondientes a fragmentos de 276, 57, 23 y 122 pb respectivamente. En Mérida la secuencia tiene dos sitios para esta enzima, con fragmentos esperados de 275, 59 y 145 pb respectivamente. Las poblaciones aquí analizadas, en cambio, exhibieron dos fragmentos de 280 y 200 pb respectivamente, sugiriendo la existencia de un único sitio de reconocimiento para esta enzima.



La secuencia de Bertioga tiene un sitio para *Ssp I* que debe producir dos fragmentos de 360 y 118 pb respectivamente. En Mérida hay dos sitios presentes los que producen tres fragmentos de 235, 38 y 206 pb respectivamente.

Ambos patrones también difieren de los resultados aquí logrados que fueron dos fragmentos de 330 y 200 pb respectivamente.

La secuencia del mismo fragmento obtenida a partir de moscas provenientes de Chiapas (México) (McPheron, comunicación personal) también muestra diferencias respecto de los patrones obtenidos para las poblaciones de Argentina y **Pelotas** (Brasil).

Estas conclusiones son consistentes con otras previas (Steck 1991, Steck y Sheppard 1993) las cuales muestran diversidad macrogeográfica entre las poblaciones de *A. fraterculus*.

De todos modos las poblaciones argentinas parecen ser bastante homogéneas respecto de estos marcadores y los presentes resultados soportan su identidad específica. Es decir, no se observó diferenciación regional dentro del país respecto del fragmento de ADN mitocondrial estudiado. Sin embargo, éste exhibió variación macrogeográfica, si comparamos las poblaciones argentinas con las poblaciones de Chiapas (México), Mérida (Venezuela) y Bertioga (Brasil).

Respecto del análisis cladístico elaborado a partir de la secuenciación del fragmento correspondiente al gen mitocondrial COII, se observa en la fig 3.6 que el árbol de consenso estricto obtenido, no resuelve agrupamientos por localidad geográfica, salvo en un solo caso de la población de **Posadas (P3, P6)**.

Todos los clados resueltos en este árbol, salvo el agrupamiento de **Mr6** y la politomía, muestran valores significativos (> 50 %) de bootstrap.

Asimismo el análisis de anidamiento (“Nested clade”) que resultó a partir de la secuenciación de dicho fragmento no mostró asociación significativa entre la variabilidad haplotípica y su distribución geográfica.

Ningún clado mostró asociación geográfica significativa, por lo tanto no se puede rechazar la hipótesis nula del análisis que plantea que no existe asociación significativa entre la variabilidad haplotípica y su distribución geográfica. Ver Tabla 3.12. y Fig.3.8.

Lo mismo se observó cuando se analizaron las distancias de sustitución nucleotídica interpoblacionales aplicando el algoritmo de Neighbour joining, ya que, poblaciones muy alejadas geográficamente, presentaron poca distancia genética. El árbol, representado en la fig. 3.9, agrupó a las distintas poblaciones sin seguir un patrón acorde a la distribución geográfica.

Con respecto al análisis cladístico del fragmento correspondiente al gen mitocondrial 16S, se observa que la secuencia que se obtuvo difiere de la lograda para la localidad de Bertioga (Brasil) de acuerdo con la información disponible en el GeneBank (AF152067). (McPheron et al.2000-a),

Por otro lado, el árbol de consenso estricto que se ve en la fig. 3.11 no resuelve agrupamientos por localidad geográfica, salvo en el caso de dos haplotipos de **Castelar (C2 y C3)**.

Los clados resueltos en este árbol muestran valores significativos (> 50 %) de bootstrap.

Cuando se analizaron las distancias de sustitución nucleotídica interpoblacionales aplicando el algoritmo de Neighbour joining, que puede verse en la fig. 3.12, nuevamente ocurrió que poblaciones muy alejadas geográficamente presentaron poca distancia genética. Es decir, los

agrupamientos del árbol no siguieron un patrón acorde a la distribución geográfica.

Podemos concluir que para ambos genes no existe correlación entre la distancia genética de las poblaciones y la distribución geográfica, lo que pudo a su vez convalidarse mediante el test de Mantel (1967).

Por lo tanto, la variabilidad genética no seguiría, en este caso, un modelo de aislamiento por distancia como cabría esperar para marcadores neutros. Esta falta de estructuración implicaría la existencia de algún grado de flujo génico entre las poblaciones estudiadas, tal vez ocasionado por la migración pasiva de moscas como consecuencia del transporte que hace el hombre de frutos atacados.

Se debe remarcar que todos los marcadores analizados en esta tesis, sugirieron que las poblaciones estudiadas de Argentina y Brasil de *A. fraterculus* constituyen una única especie biológica y que las distancias genéticas entre ellas no siguen un patrón acorde a su distribución geográfica.

Otro dato a tener en cuenta, que es de fundamental importancia cuando hablamos de poblaciones de una especie biológica, es la ausencia entre ellas de mecanismos pre y post-cigóticos de aislamiento reproductivo.

Petit-Marty et al. (2004-a) estudiaron el comportamiento sexual en jaulas de campo en cuatro poblaciones argentinas de la Mosca Sudamericana de la Fruta (**Yuto, Horco Molle, Posadas y Concordia**) y probaron todas las combinaciones posibles entre ellas sin encontrar impedimentos en los apareamientos ni mecanismos de aislamiento precigóticos en ninguna de las combinaciones analizadas.

Petit-Marty et al. (2002, 2004) analizaron también el aislamiento post-cigótico para dos poblaciones de esta mosca (**Yuto y Concordia**), recuperando huevos, pupas y adultos de dos generaciones.

Desde muy diversas metodologías se refuerza la hipótesis de la pertenencia de las poblaciones argentinas de *A. fraterculus* a una única especie biológica.

### 4.3. Conclusiones

A propósito de la pregunta que da título a esta tesis, en el marco de la discusión sobre el estado taxonómico de las poblaciones de *A. fraterculus* (ver ítem 1.2.3.) y en base a los datos moleculares (aportados por este trabajo), etológicos (Petit-Marty 2002, 2004) y cromosómicos (Manso 1999), se puede concluir que:

➤ Las poblaciones argentinas estudiadas de la Mosca Sudamericana de los Frutos constituyen una única especie biológica y no existen entre ellas, por el momento, mecanismos de aislamiento reproductivo.


➤ Todos los patrones de variación genética analizados no guardan relación con la distribución geográfica.

➤ Se considera, sin embargo, que las poblaciones argentinas, respecto de otras poblaciones americanas, podrían constituir una entidad reproductivamente aislada. Esta afirmación se basa en:

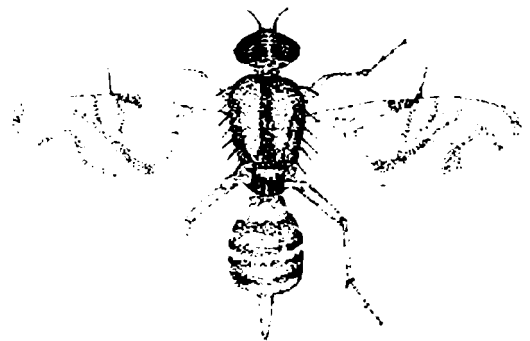
- a) Los diferentes patrones RFLP encontrados entre nuestras poblaciones y las de Chiapas (México), Mérida (Venezuela) y Bertioga (Brasil).
- b) Las diferencias entre las secuencias del fragmento del gen 16S analizado en esta tesis y el publicado para la localidad de Bertioga.

c) El aislamiento postcigótico encontrado entre distintas poblaciones del continente y las argentinas (Vera et al. 2004).

➤ Por último, es importante destacar la utilidad que estos datos tienen para el empleo de métodos de control de la plaga, ya sean genéticos (Técnica del Insecto Estéril) o biológicos (liberación de parasitoides), ya que para la aplicación de dichas técnicas, es de fundamental importancia el conocimiento biológico del organismo que se quiere combatir y sobre todo su identidad taxonómica.



# 5. Bibliografía



- Alberti, A.C., G. Calcagno, B.O. Saidman, and J.C. Vilardi. 1999.** Analysis of the Genetic Structure of a Natural Population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92 (5): 731-736.
- Alberti, A.C., M.S. Rodriguez, P. Gomez Cendra, B.O. Saidman and J.C. Vilardi. 2002.** Evidence Indicating that Argentine Populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) Belong to a Single Biological Species. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95 (4): 505-512.
- Allinghi, A. 2002.** Inducción de esterilidad en la Mosca Sudamericana de la Fruta, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) mediante radiación gamma, para su aplicación en el control genético. Tesis doctoral.
- Aluja, M. 1994.** Biomomics and management of *Anastrepha*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 155-178.
- Avise, J.C. , J. Arnold, R.M. Ball,Jr., E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb y N.C. Saunders. 1987.** Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetic and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avise, J.C. 1994.** Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall. New York, NY. 511 pp.
- Ayala, F.J. and M.E. Gilpin. 1974.** Gene frequency comparisons between taxa: support for the natural selection of protein polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 4847-4849.
- Ayala, F.J. 1976.** Molecular Genetics and Evolution. Pp1-20 in: *Molecular Evolution*, F.J. Ayala ed, Sinauer, Sunderland, MA.



- Baker, A.C., W.E. Stone, C.C. Plummer, H. McPhail. 1944.** A review of studies on the Mexican fruit fly and related Mexican species. United States Dept. Agric. Miscellaneous Publication. V. 531: 1-155.
- Baruffi, L., G. Damiani, C.R. Guglielmino, C. Bandis, A.R. Malacrida and G. Gasperi. 1995.** Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*: Comparison between RAPD and Multilocus Enzyme Electrophoresis data. *Heredity*. 74: 425-437.
- Beard C.B., D. Mills Hamm and F.H. Collins. 1993.** The Mitochondrial Genome of the Mosquito *Anopheles gambiae*: DNA Sequence, Genome Organization, and Comparisons with Mitochondrial Sequences of other Insects. *Mol. Biol.* 2(2): 103-124.
- BioEdit Sequence Alignment Editor. 1997-2001.** Tom Hall. Department of Microbiology. North Carolina State University.
- Blanchard, E.E. 1961.** Especies Argentinas del género *Anastrepha* Schiner (Sens. Lat.) (Diptera, Trypetidae). *Rev. Invest. Agric. (Buenos Aires)*. 15: 281-342.
- Cabrera, A.L. y A. Willink. 1980.** Biogeografía de América Latina. Monografías Científicas de la OEA. Buenos Aires. 13.
- Civetta, A., J. Vilardi, B. Saidman, C. Leanza and J. Cladera. 1990.** Estimation of the number of ovipositing females per fruit in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera, Tephritidae). *Heredity* 65: 59-66.
- Civetta, A., J.C. Vilardi, B.O. Saidman, A.C. Alberti, J.L Cladera. 1995.** Population Structure of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedeman). Comparison between two alternative hosts. *Evolución Biológica (Rev. Asoc. Iberoamer. Evol.)* 8 & 9: 203-214.

- Clary, D.O. and D.R. Wolstenholme. 1985.** The Mitochondrial DNA Molecule of *Drosophyla yakuba*: Nucleotide Sequence, Gene Organization, and Genetic Code. *J. Mol. Evol.* 22: 252-271.
- Depew, D. and B. Weber. 1995.** Darwinism Evolving. Systems dynamics and the genealogy of natural selection. MIT Press. Massachusetts.
- Dobzhansky, T. 1937.** Genetics and the Origins of Species. Columbia Univ. Press, New York.
- Felsenstein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783 – 791.
- Goloboff, P.A. 1994.** NONA/Pee-Wee, ver 1.1. The American Museum of Natural History, New York.
- Han, H-Y and B.A. McPheron. 1997.** Molecular Phylogenetic Study of Tephritidae (Insecta: Diptera) Using Partial Sequences of Mitochondrial 16S Ribosomal DNA. *Mol. Phyl and Evol.* 7 (1): 17-32.
- Han, H-Y and B.A. McPheron. 2000.** Nucleotide Sequence Data as a Tool to Test Phylogenetic Relationships among Higher Groups of Tephritidae: A Case Study Using Mitochondrial Ribosomal DNA. In Aluja M. and Norrbom A.L. (Eds.). *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. Washington, D.C. 115-132.
- Harris, H. 1966.** Enzyme polymorphisms in man. *Proc. Roy. Soc. Lond.* B164: 298 – 310.
- Harris, H. and D.A. Hopkinson. 1976.** Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland publishing company. Amsterdam, New York, Oxford.
- Harshman, J., 1994.** The effect of irrelevant characters on bootstrap values. *Systematic Biology* 43: 419-424.

- Haymer, D.S. and D.O. McInnis. 1993.** Resolution of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*, 37: 244-248.
- Hayward, K. 1960.** Insectos Tucumanos Perjudiciales. *Rev. Industrial y Agrícola de Tucumán*. XLII (1). 144 pp.
- Hedrick, P. W. 1983.** Genetics of populations. Science Books International. Boston.
- Heruández-Ortiz, V. 1992.** El género *Anastrepha* Schiner en México. (Diptera: Tephritidae). Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes. Instituto de Ecología. Sociedad Mexicana de Entomología. Xalapa, Veracruz. México.
- Heruández-Ortiz, V., y M. Aluja. 1993.** Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomol. Mex.* 88: 89-105.
- Johnson, F. M., C.G. Kanapi, R. H. Richardson, M. R. Wheeler, and W. S. Stone. 1966.** An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light *Drosophila ananassae* strains from American and Western Samoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 119- 125.
- Kitching, I.A., Forey, P.L, Humphries, C.J and Williams, D.M. 1998-2000.** Cladistics: The Theory and Practice of Parsimony Analysis. Oxford University Press Inc., New York. 228 pp.
- Kumar, S., K. Tamura, I. Jakobsen, and M. Nei. 2001.** Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA). Version 2.1
- Langor, D.W. and F.A.H. Sperling. 1997.** Mitochondrial DNA sequence divergence in weevils of the *Pissodes strobi* species complex (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Mol. Biol.* 6(3): 255-265.

- Lanteri, A. y V.A. Confalonieri. 2003.** Filogeografía: Objetivos, Métodos y Ejemplos. En: Una Perspectiva Latinoamericana de la Biogeografía. Ed.: J.J. Morrone y J. Llorente Bousquets. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Lewontin, R. C. and J. L. Hubby. 1966.** A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595 – 609.
- Lewontin, R. C. and J. Krakauer. 1973.** Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics* 74: 175-195.
- Li, C. C. and D. G. Horvitz. 1953.** Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Ann. J. Hum. Genet.* 5: 107-117.
- Li, W.-H. and A. Zharkikh. 1994.** What is the bootstrap technique? *Syst. Biol.* 43:424-430.
- Linnaeus, C. 1758.** *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I.*
- Litzenberger, G. And W Chapco. 2001.** A molecular phylogeographic perspective on a fifty-year-old taxonomic issue in grasshopper systematics. *Heredity* 86:54-59.
- Liu, H. and A. Beckenbach. 1992.** Evolution of the Cytochrome Oxidase II gene among 10 orders of insects. *Mol. Phyl. Evol.* 1: 41 – 52.
- Long, J. C. 1986.** The allelic correlation structure of Gaij-and Kalam-speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-statistics. *Genetics* 112: 629-647.

- Malavasi, A., and J.S. Morgante. 1982.** Genetic variation in natural population of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). Rev. Bras. Genet. 5: 263-278.
- Manso, F. C. and A. Basso. 1999.** Notes on the present situation of *Anastrepha fraterculus* in Argentina. In The South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.); advances in artificial rearing, taxonomic status and biological studies. IAEA, Vienna.
- Mantel, N. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209 - 220
- Maxam, A.M. and W Gilbert. 1977.** A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74. 560-564.
- Maxam, A.M. and W Gilbert. 1980.** Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Meth. Ezymol. 65: 499-559.
- McPheron, B.A., G.E. Gasparich, H. -Y. Han, G. J. Steck and W. S. Sheppard. 1994.** Mitochondrial DNA restriction map for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Biochem. Genet. 32: 25-33.
- McPheron, B.A., W.S. Sheppard and G.J. Steck. 1995.** Genetic research and the origin, establishment, and spread of the Mediterranean fruit fly. In J.G. Morse, R.L. Metcalf, J.R. Carey & R.V. Dowell, eds., Proceedings: The Medfly in California: Defining critical research, 9-11 November, 1994, Riverside, California. University of California, Riverside. p. 93-107
- McPheron, B. A. and H.-Y. Han.1997.** Phylogenetic Analysis of North American *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) and Related Genera Using Mitochondrial DNA Sequence Data. Mol. Phyl and Evol. 7 (1): 1-16.

- McPheron, B.A., H.-Y. Han, J.G. Silva, and A. Norrbom. 2000-a.** Phylogeny of the Genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) Based upon 16S rRNA Mitochondrial DNA Sequences, pp. 343-361. In Aluja M. and Norrbom A.L. (Eds.). Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior. Washington, D.C. 343-361.
- McPheron, B. A. 2000-b.** Population Genetics and Cryptic Species. In Keng-Hong Tan (Ed.). Area – Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests. Malaysia. 483 – 490.
- Michalakis, Y, A.W. Sheppard, V. Noël, and I. Olivieri. 1993.** Population Structure of a Herbivorous Insect and its Host Plant on a Microgeographic Scale. *Evolution*, 45 (5): 1611-1616.
- Morgante, J. S., A. Malavasi, and G.L. Bnsh. 1980.** Biochemical systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 73: 622-630.
- Morgante, J. S., and A. Malavasi. 1985.** Genetic variability in populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Tephritidae). *Rev. Brasil. Genet.* 8: 241-347.
- Morgante, J. S. 1991.** Moscas das frutas (Tephritidae): Características biológicas, deteção e controle. Boletim tecnico de recomendações para os perímetros irrigados do vale do São Francisco. Nº 2. Ministerio da Agricultura e Reforma Agraria. Brasilia.
- Nei, M. 1965.** Variation and covariation of gene frequencies in subdivided populations. *Evolution* 19: 256-258.
- Nei, M. and Y. Imaizumi. 1966.** Genetic structure of Human population. Y. Local differentiation of blood group gene frequencies in Japan. *Heredity* 21: 9-35.

- Nei, M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1977.** F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Ann. Human Genet. 41: 225-233.
- Nei, M. 1978.** Estimation of average heterocigosity and genetic distance from a small numbers of individuals. Genetics. 89: 583-590.
- Nei, M., and R.K. Chesser. 1983.** Estimation of fixation indices and gene diversities. Ann. Hum. Genet. 47: 253-259.
- Nei, M., and S. Kumar. 2000.** Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford Univ. Press. New York.
- Norrbom, A.L., and K.C. Kim. 1988.** A list of the reported host plants of the species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). USDA. APHIS-PPQ. Hyatrsville. MD.
- Petit Marty N. y J.C. Vilardi. 1999.** Comportamiento reproductivo de una población natural de *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae) (Wied.) en jaulas de campo. X Jornadas Fitosanitarias Argentinas, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina. April 7-9 1999.
- Petit-Marty, N., M.T. Vera, G. Calcagno, J.L. Cladera, J.C. Vilardi. 2002.** Lack of post-mating isolation between two populations of *Anastrepha fraterculus* from different ecological regions in Argentina. Scientific Programme and Abstracts. 6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. Stellenbosch, South Africa (6-10 May). Matthew Addison & Brian Barnes (comp.): 70.

- Petit-Marty N., M.T. Vera, G. Calcagno, J.L. Cladera, D.F. Segura, A. Allinghi, M. Rodriguez, P. Gomez Cendra, M M. Viscarret and J.C. Vilardi. 2004.** Sexual behaviour and mating compatibility among four populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. *Ann. Entomol. Soc. Am.* En prensa.
- Posada D., KA Crandall, AR Templeton. 2000.** GEODIS: a program for the cladistics nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9, 487-488.
- Raymond M. and F. Rousset. 1995.** GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86:248-249.
- Reig, O.A. 1979.** Propositiones para una solución al problema de la realidad de las especies biológicas. *Rev. Venez. Filosofía* 11: 79-106.
- Rosilio, M.A. 1953.** Resultados preliminares de un estudio bioecológico de los Dipteros Trypétidae del noroeste argentino. *Rev. Invest. Agric. (Buenos Aires)* 7: 97-130.
- Salles, L.A. B. 1995.** Bioecologia e controle da Mosca-das-Frutas Sul-Americana. EMBRAPA- CPACT. Pelotas, RS. 58 pp.
- Sanderson, M. J., 1989.** Confidence limits on phylogenies: the bootstrap revisited. *Cladistics* 5: 113-129.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74. 5463-5467.
- Santos, M., A. Ruiz and A. Fontdevila. 1989.** The evolutionary history of *Drosophila buzzatti*. XIII. Random differentiation as a partial explanation of chromosomal variation in a structured natural population. *Amer. Nat.* 133: 183-187.



- Scataglieni, M.A., A.A. Lanteri, and V. Confalonieri. 2004.** The boll Weevil History in South America: Recent invader or ancient inhabitant?. En preparación.
- Selivon, D. 1996.** Estudo sobre a Diferenciação populacional em *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) Tesis doctoral. Universidad de Sao Paulo. 137 pp.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu and P. Flook. 1994.** Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87(6): 651-701.
- Simpson, G.G.. 1951.** The species concept. *Evolution.* 5: 285-298.
- Smith, J.J. and G.L. Bush. 1997.** Phylogeny of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase II *Mol. Phylogenet. Evol.* 7 (1), 33-43
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. 1979.** *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica.* H. Blume ediciones. Rosario 17. Madrid 5.
- Steck, G.J. 1991.** Biochemical systematic and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 84: 10-28.
- Steck, G.J., and W.S. Sheppard. 1993.** Mitochondrial DNA variation in *Anastrepha fraterculus*, pp. 9-14. In M. Aluja and P. Liedo (Eds.), *Fruit Flies: Biology and Management.* Springer Verlag New York, Inc.

- Stone, A. 1942.** The fruitflies of the genus *Anastrepha*. USDA. Miscellaneous Publication. V 439, 112 pp.
- Swofford, D.L., and R.B. Selander. 1981.** BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.* 72: 281-283.
- Templeton, A.R., E. Boerwinkle and C. F. Sing. 1987.** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*. 117: 343-351.
- Templeton, A.R. 1989.** The meaning of species and speciation: a genetics perspective. Pp 3-27 in: *Speciation and Its Consequences*, D. Otte and J.A. Endler eds., Sinauer, Sunderland, MA.
- Templeton, A.R. and C.F. Sing. 1993.** A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*. 134: 659-669.
- Templeton, A.R. 1998.** Nested clade analyses of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7: 381-397.
- Templeton, A.R. 2001.** Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Mol. Ecol.* 10: 779-791.
- Thomas, R.H. and J.S.F. Barker. 1990.** Breeding Structure of Natural Populations of *Drosophila buzzatii*: effects of the distribution of larval substrates. *Heredity* 64: 355-365.

- Thompson, J.D., G. Higgins and T.J. Gibson. 1994.** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Turica, A., and R.G. Mallo. 1961.** Observaciones sobre la población de las “Tephritidae” y sus endoparásitos en algunas regiones citricolas argentinas. *IDIA. Suplemento.* 6: 145-161.
- Vera, M. T., C. Cáceres, V. Wornoayporn, A. Islam, A. S. Robinson, M. de la Vega, J. Hendrichs, and J-P Cayol. 2004.** Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus*: implications for the Sterile Insect Technique. In: *Proceedings 5° Meeting of the Working Group on Fruit Flies of the Western Hemisphere.* May 16-21 2004, Ft. Lauderdale, Florida, USA (en prensa).
- Vilardi, J. C. 1989.** Un programa BASIC para calcular índices de fijación (F). *Mendeliana* 9: 67-68
- Vilardi, J.C., B.O. Saidman, A.C. Alberti, G.E. Calcagno, A. Basso, F. Manso, and J. Cladera. 1994-a.** Isoenzymatic and chromosomal analyses in three argentine populations of *Anastrepha fraterculus*. In *proceedings, IV Internatl. Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, 5-10 June, VIII-14, Sand Key, Florida.*
- Vilardi, J., E.R. Hasson, C. Rodriguez, J. Fanara, A. Fontdevila, O. Reig. 1994-b.** The evolutionary history of *Drosophila buzzatii* XIX. Genetic structure determined by stochastic factors. *Genetica (Holanda)* 92: 123-128.
- Wright, S. 1940.** Breeding structure of populations in relation to speciation. *Amer. Natur.* 74: 232 – 248.

- Wright, S. 1951.** The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323-354.
- Wright, S. 1965.** The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution.* 15: 395-420.
- Wright, S. 1978.** *Evolution and Genetics of populations, Vol 4. Variability within and among natural populations.* University of Chicago Press, Chicago.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham. 1984.** Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Xiong, B., and T.D. Kocher. 1991.** Comparisons of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome.* 34: 306-311.
- Zucchi, R.A. 1981.** *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera, Tephritidae): Novas sinonímias. *Rev. bras. Ent.* 259 (4): 289-294.

## **Apéndice I: Isoenzimas**

**1. Gel de Siembra (Poliacrilamida al 7 %).** Preparados en cubetas de vidrio con las siguientes medidas: 17 cm x 15 cm x 0,02 cm.

Acrilamida: 7,15 g

Bisacrilamida: 0,2 g

TEMED: 140  $\mu$ l

Persulfato de amonio: punta de espátula

Tampón de gel: 105 ml (ver apartado 4)

### **2. Tampón de extracción:**

Tris 0,1 M–ClH 12 N hasta pH 7,1

### **3. Tampones de corrida:**

#### **3.1. Sistemas Mnr, Me y Mdh:**

0,135 M Tris–Citrato–EDTA, HONa hasta pH 7

Tris: 32,8 g

Ac. Cítrico: 18,9 g

EDTA: 0,605 g

#### **3.2. Sistemas Ao, 6-Pgd y Pgi:**

0,223 M Tris–0,086 M Citrato, HONa hasta pH 6,3

Tris: 54 g

Ac. Cítrico: 36,15 g

**3.3. Sistema Est :**

0,129 M Tris–0,071 M Borato–0,003 M EDTA,

HONa hasta pH 8,8

Tris: 15,57 g

Ac. Bórico: 4,417 g

EDTA: 1,063 g

**3.4. Sistema Got :**

0,34 M Tris–0,08 M Citrato, HONa hasta pH 8

Tris: 41,6 g

Ac. Cítrico: 16,5 g

**3.5. Sistema Amp :**

0,2 M Phosphatos (Monobásico y Dibásico) pH 7

Phosphato monobásico: 390 ml (24,2 g / l)

Phosphato dibásico: 610 ml (28,6 g / l)

**4. Tampones de gel:****4.1. Sistemas Mnr, Me y Mdh:**

1 tampón de corrida : 3 H<sub>2</sub>O

**4.2. Sistemas Ao, 6Pgd y Pgi:**

0,008 M Tris–0,003 M Citrato, HONa hasta pH 6,7

Tris: 0,97 g

Ac. Cítrico monohidratado: 0,63 g

**4.3. Sistema Est:**

0,09 M Tris–0,05 M Borato–0,002 M EDTA, HONa hasta pH 9

Tris: 10,89 g

Ac. Bórico: 3,092 g

EDTA: 0,672 g

**4.4. Sistema Got:**

0,038 M Tris–0,0025 M Citrato, HONa hasta pH 8,7

Tris: 4,605 g

Ac. Cítrico monohidratado: 0,525 g

**4.5. Sistema Amp:**

0,01 M Phosphatos (Monobásico y Dibásico) pH 7

1 tampón de corrida : 19 H<sub>2</sub>O

**5. Sistemas de Tinción: Tampones, colorantes, coenzimas y snstratos:****5.1. Enzima Mnr:**

Tampón: 0,05 M Tris pH 7 = 50 ml

MTT: 12,50 mg

NADH: 16,66 mg

Menadione: 16,66 mg

**5.2. Enzima ME:**

Tampón: 0,1 M Tris pH 8,4: 10 ml + H<sub>2</sub>O: 37,5 ml +

ClMg 10%: 0,5 ml + Sustrato málico: 2,5 ml (ver 5.3.)

NBT: 10 mg  
PMS: 5 mg  
NADP: 10 mg

### 5.3. Enzima Mdh:

Tampón: 0,5 M Tris pH 7,1: 5 ml + H<sub>2</sub>O: 40 ml  
+ Sustrato málico: 5 ml  
MTT: 15 mg  
PMS: 1 mg  
NAD: 25 mg  
Sustrato málico: L-malato: 13,4 g + H<sub>2</sub>O:  
5 ml, 5 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hasta pH 7

### 5.4. Enzima Est:

Tampón: 0,2 M Phosphatos (Monobásico: 34,25 ml y  
Dibásico: 15,75 ml) pH 6,5: 50 ml  
FBRRS 40 mg  
 $\alpha$  Naftil acetato 40 mg + 1ml de acetona  
 $\beta$  Naftil acetato 40 mg + 1ml de acetona

### 5.5. Enzima Got:

Tampón: 0,2 M Phosphatos (Monobásico: 8 ml y  
Dibásico: 42 ml) pH 7,5: 50 ml  
FBBBS 150 mg  
Piridoxal 1-5-phosphato 1 mg  
Ac. L-aspártico 226 mg  
Ac. L-cetoglutárico 37 mg



Polivinilpirridona 125 mg

### 5.6. Enzima Amp:

Tampón: (Solución A: 50 ml + Solución B: 10 ml) pH 5,8

Solución A: NaOH: 4 g + Ac. Maleico: 9,8 g en 500 ml de H<sub>2</sub>O

Solución B: NaOH: 6,4 g en 500 ml de H<sub>2</sub>O

Frasco I: FBKS: 30 mg + F garnet GBC:

punta de espátula + tampón: 60 ml

Frasco II : L-Leucyl-βNaphthylamida ClH: 70 mg

+ Metanol 10%: 10 ml

Verter sobre el gel ambos frascos (I y II)

### 5.7. Enzima Pgi:

Tampón: 0,05 M Tris pH 8: 50 ml

MTT 15 mg

PMS 2 mg

Fructosa-6-P 20 mg

MgCl<sub>2</sub> 100 mg

Glucosa-6-Phosphato deshidrogenasa 40 U

NAD 15 mg

NADP 15 mg

### 5.8. Enzima AO:

Tampón: 0,2 M Tris pH 9: 50 ml + Benzaldehido: 1 ml

NBT 20 mg

PMS 0,8 mg

NAD 10 mg

**5.9. Enzima 6-Pgd**

Tampón: 0,05 M Tris pH 8: 50 ml

MTT                    15 mg

PMS                    2 mg

Mg Cl<sub>2</sub>                50 mg

NADP                   15 mg

Ac. 6-P-Glucónico 40 mg

**Apéndice II: ADN****Extracción de ADN:**

1. Colocar en un tubo Eppendorff de 1,5 ml un individuo con 250  $\mu$ l de solución A.
2. Homogeneizar la mosca con un tip azul con la punta roma lograda por calor.
3. Agregar 250  $\mu$ l de solución B. Incubar sobre hielo 10'.
4. Agregar igual volumen de fenol y homogeneizar suavemente para no hacer burbujas. Dejar sobre hielo 3'.
5. Centrifugar en microcentrífuga 5' a 4° C a 14.000 rpm.
6. Extraer la capa acuosa. Pasarla a un nuevo tubo Eppendorf y agregar igual volumen (aproximadamente 400  $\mu$ l) de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25 : 25 : 1). Mezclar bien e incubar en hielo 3'.
7. Centrifugar en microcentrífuga 5' a 4° C a 14.000 rpm.
8. Extraer la capa acuosa. Pasar a otro tubo Eppendorf. Agregar igual volumen de cloroformo : alcohol isoamílico (24 : 1). Agitar suavemente con golpecitos con el dedo.
9. Centrifugar en microcentrífuga 5' a 4° C a 14.000 rpm.
10. Extraer el sobrenadante. Pasar a un nuevo tubo Eppendorf.
11. Agregar 0,1 volúmenes de Acetato de amonio y 1000  $\mu$ l de alcohol absoluto frío. Invertir el tubo suavemente varias veces.
12. Incubar 30' a - 20° C.
13. Centrifugar en microcentrífuga 15' a 14.000 rpm

14. Descartar sobrenadante. Con golpes con el dedo despegar el pellet.
15. Agregar 50  $\mu$ l de alcohol 70 % frío
16. Centrifugar en microcentrífuga 10' a 14.000 rpm.
17. Descartar sobrenadante tratando de no remover el pellet
18. Colocar el tubo boca abajo sobre papel absorbente o en baño de 60° C para que se evapore totalmente el líquido.
19. Redisolver el pellet en 100  $\mu$ l de 1 X TE
20. Ensayar una pequeña alícuota sobre un minigel de agarosa al 2 % con un ADN patrón, para estimar concentración y guardar el resto a - 20° C hasta que se realicen los experimentos.

**PCR:**

Cada tubo de reacción contiene aproximadamente en un volúmen final de 50  $\mu$ l los siguientes elementos:

- 50 ng de ADN genómico de un individuo.
- 100  $\mu$ M de cada uno de los 4 dNTP.
- 60 ng de cada cebador.
- buffer 1X de la Taq polimerasa (10 mM Tris- HCl, pH 9, a 25°C, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100).
- 2 mM MgCl<sub>2</sub>.
- 2,5 unidades de Taq polimerasa (Promega Madison, Wi, USA).

Centrifugar y colocar en el termociclador

El termociclador (Techne Pogene Cambridge UK) se programó como se describe en McPheron et al (2000-a) de la siguiente forma:

- 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 1 min
- 40 ciclos de annealing, cada uno con un primer paso de desnaturalización a 93°C por 1 min, un segundo paso de annealing a 45°C por 2 min, y un tercer paso de extensión a 72°C por 2 min.
- 1 ciclo de extensión final de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 9 min.

Fragmento correspondiente al gen COII:

- 1 ciclo de desnaturalización a 94°C por 4 min
- 30 ciclos de annealing cada uno con un primer paso de desnaturalización a 94°C por 30 seg, un segundo paso de annealing a 50°C por 1 min, y un tercer paso de extensión a 72°C por 2 min.
- 1 ciclo de extensión final de 72°C por 10 min.

Realizar un ensayo en un gel de agarosa al 0,8 – 1 % para comprobar si hubo reacción.

### **Digestión:**

Preparar una mezcla de tampón (5µl por tubo + 1) según las instrucciones de cada enzima.

- Agregar 5µl de de BSA diluído por tubo + 1.
- Agregar H<sub>2</sub>O hasta completar 50µl de volumen final por tubo + 1
- Agregar a la mezcla anterior la enzima (1µl por tubo + 1). Aproximadamente 5 y 10 unidades de enzima por µl (dependiendo de la enzima).
- Colocar 20 µl de la mezcla en cada tubo sobre hielo.

- Agregar 30  $\mu$ l de ADN producto de la PCR en cada tubo.
- Centrifugar.
- Incubar al menos durante una hora a 38° C.

Realizar un ensayo en un gel de agarosa al 0,8 – 1 % para comprobar los resultados.

### Soluciones:

- Solución de BSA diluido:  
10 $\mu$ l de BSA + 90 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O
- Solución A. Preparar en frasco estéril y conservar a - 20° C:  
2 M Tris – ClH pH 8: 0,25 ml  
5 M ClNa;                      0,60 ml  
sacarosa 50 %:                      5 ml  
0,25 M EDTA pH 8:                      2 ml  
H<sub>2</sub>O autoclavada:                      42 ml
- Solución B. Preparar en frasco estéril y conservar a - 20° C:  
2 M Tris – ClH pH 8: 7,5 ml  
SDS 10 %:                      6,2 ml  
Sacarosa 50 %:                      5 ml  
0,25 M EDTA pH 8: 20 ml  
H<sub>2</sub>O autoclavada:                      11 ml
- 10 X TE. Autoclavar

2 M Tris: 20 ml  
0,25 M EDTA: 16 ml  
H<sub>2</sub>O autoclavada: 364 ml

- 1 X TE. Autoclavar

10 X TE: 10 ml  
H<sub>2</sub>O autoclavada: 90 ml

- TAE 50 X

Tris: 242 g  
Ac. Acético Glacial: 57,1 ml  
0,25 M EDTA pH 8: 200 ml  
Llevar a 1000 cc con H<sub>2</sub>O autoclavada

- Tampón loading. Conservar a 4° C.

Azul de bromophenol 0,25 %: 0,025 g  
Xylan cianol FF 0,25 %: 0,025 g  
Sacarosa 40 % en agua: 4 g  
H<sub>2</sub>O autoclavada: 10 ml

### Geles:

- Gel de agarosa al 0,8 – 1 %

Agarosa: 1,36 g  
TAE 10 X: 17 ml  
H<sub>2</sub>O: 153 ml

Llevar al microondas hasta que comience a hervir y dejar enfriar hasta que no queme al tacto.

Agregar 8,5  $\mu\text{l}$  de Bromuro de Etidio

En la policubeta colocar en la posición: 13  $\mu\text{l}$  del ADN patrón + 2  $\mu\text{l}$  de tampón loading + 6  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Y en las posiciones restantes : 8  $\mu\text{l}$  del producto (PCR o Digestión) + 2  $\mu\text{l}$  de tampón loading + 2  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Sembrar en el gel con micropipeta y realizar la corrida en el tampón TAE 10 X a 70 mA durante 30' – 1 h.