



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

EVOLUCIÓN GENÉTICA DE CUATRO ESPECIES DE *Anastrepha* spp. (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

CLAUDIA VERÓNICA DE TEODORO PARDO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2011

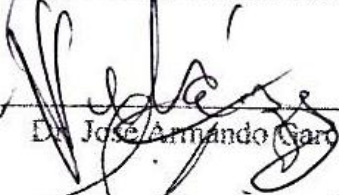
La presente tesis titulada: **EVOLUCIÓN GENÉTICA DE CUATRO ESPECIES DE *Anastrepha* spp. (DIPTERA: TEPHRITIDAE)** realizada por la alumna: **Claudia Verónica De Teodoro Pardo** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

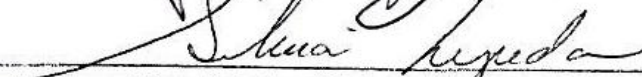
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. José Armando García Velázquez

ASESORA



Dra. Cristina Silyia Zepeda Cisneros

ASESOR



Dr. Narciso Corona Torres

ASESOR



Dr. Guillermo López Guillén

ASESORA



Dra. Celina Llanderal Cázares

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2011.

EVOLUCIÓN GENÉTICA DE CUATRO ESPECIES DE

Anastrepha spp. (DIPTERA: TEPHRITIDAE).

Claudia Verónica De Teodoro Pardo, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2011.

El objetivo de este estudio fue analizar la variabilidad genética en diferentes especies del género *Anastrepha* (*Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata*), estudiar el flujo genético en *A. ludens* entre diferentes poblaciones de México y de Guatemala mediante un análisis isoenzimático, cuantificar ADN del ganglio cerebral y glándulas salivales y explorar la hibridación genómica *in situ* (GISH) en cada una de las especies de moscas en condiciones de laboratorio. Se analizaron los sistemas isoenzimáticos 6PGDH, IDH, ME, MDH, GPI y GOT en las cuatro especies de moscas en condiciones de laboratorio y campo, y para el flujo genético sólo cuatro sistemas fueron estudiados. Se examinaron 30 individuos (15 hembras y 15 machos) de cada población. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa de cómputo Tools For Population Genetic Analyses (TFPGA) y Popgen. El contenido de ADN se hizo en *A. ludens* y *A. serpentina* mediante el uso del citómetro de flujo. Los resultados mostraron para la variabilidad genética ocho loci con un máximo de tres alelos. En promedio las especies desarrolladas en laboratorio presentaron mayor polimorfismo (64.58 %) que las recolectadas en campo (42.71 %). No se observaron diferencias significativas entre hembras y machos. Respecto al flujo genético entre las diferentes poblaciones se observaron 5 loci y 4 alelos. En las localidades muestreadas se observó 100 % de polimorfismo, se presentaron diferencias entre hembras y machos sobre todo en el locus 6PGDH-2 y la enzima ME presentó mayor polimorfismo que el resto de las enzimas. El estudio del contenido de ADN mostró que *Anastrepha serpentina* presentó mayor contenido de ADN, en ganglios cerebrales y glándulas salivales que *A. ludens*. Respecto a GISH, sólo se pudo ver claramente la tinción de los cromosomas con DAPI, la hibridación entre las especies de *Anastrepha* no fue clara.

Palabras clave: *Anastrepha*, contenido de ADN, citometría de flujo, electroforesis, GISH, isoenzimas, flujo genético, variabilidad genética.

GENETIC EVOLUTION OF FOUR SPECIES *Anastrepha* spp.

(DIPTERA: TEPHRITIDAE)

Claudia Verónica De Teodoro Pardo, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2011.

The aim of this study was to analyze the genetic variability in different species of *Anastrepha* (*Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* and *A. striata*), to study gene flow in *A. ludens* between different populations of Mexico and Guatemala by electrophoretic analysis to quantify DNA from cerebral ganglion and salivary glands and explore *in situ* hybridization (GISH) in each species of flies under laboratory conditions. Isozyme systems were analyzed 6PGDH, IDH, ME, MDH, GPI and GOT in the four species of flies under laboratory and field gene flow and only four systems were studied, examined 30 individuals (15 females and 15 males) each population. Statistical analysis was performed using the Population Genetic Analyses Tools For (TFPGA) and Popgene. The DNA content was done in *Anastrepha ludens* and *A. serpentina* using the flow cytometer. The results showed for the genetic variability in loci with three alleles eight maximum. On average, developed in laboratory species show higher polymorphism (64.58 %) than those collected in the field (42.71 %). There were no significant differences between females and males. With regard to gene flow were observed 5 loci and 4 alleles. In the locations of study observed 100% polymorphism, differences were found between females and males especially in the 6PGDH-2 locus and enzyme polymorphism had a higher ME than the other enzymes. The study of DNA content showed that *Anastrepha serpentina* had higher DNA content in cerebral ganglia and salivary glands than *A. ludens*. Regarding GISH, only it was clear staining of the chromosomes with DAPI, hybridization between species of *Anastrepha* was not clear.

Keywords: *Anastrepha*, DNA content, flow cytometry, electrophoresis, GISH, isozymes, gene flow, genetic variability.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para llevar a cabo mi proyecto de investigación.

Al Colegio de Postgraduados, Postgrado en Genética, Laboratorio de Citogenética que fue el lugar en donde desarrollé mi investigación.

Al Dr. José Armando García Velázquez por sugerirme el tema de investigación, por sus sugerencias y apoyo en la realización de la misma.

A la Campaña Nacional Moscas de la Fruta Programa MOSCAFRUT Acuerdo SAGARPA-IICA por el financiamiento de este trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Sexado Genético del Programa MOSCAFRUT y a MOSCAMED Metapa de Domínguez, Tapachula estado de Chiapas, por el apoyo brindado a la presente investigación.

Al personal del Laboratorio de Sexado Genético MOSCAFRUT: Jorge Ibáñez Palacios, Víctor García Martínez, Eneyda García Méndez, Héctor Santiago Flores García, José Salvador Meza Hernández, Angel Humberto De León Crisostomo e Hilda García Mendoza por toda la ayuda brindada durante mi estancia.

Al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) El Batán, México y en especial al Laboratorio de Citogenética. Al Dr. David Bonnett, por toda la ayuda brindada en mi trabajo de investigación y especialmente al Biol. J. Alejandro Cortés Velázquez y C. Víctor Rosas Ramos.

A los miembros de mi Consejo Particular: Dr. José Armando García Velázquez, Dra. Cristina Silvia Zepeda Cisneros, Dr. Tarsicio Corona Torres, Dra. Celina Llanderal

Cázares, Dr. Guillermo López Guillén y al Dr. F. Víctor Conde Martínez, por su apoyo para la realización de esta investigación y la revisión de la tesis.

Al Ing. Ramón Nieto Hernández por el acceso al Insectario del Colegio de Postgraduados y a los Señores Oscar A. Vega Ortíz y Oscar Moreno Cernas por su ayuda y capacitación sobre el manejo de la mosca de la fruta.

A la M. C. Farah Zamira Vera Maloof por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de los análisis isoenzimáticos.

A las Dras. Rocío Ortíz Muñiz y Edith Cortés Barbarena del Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I) por su gran disposición y la ayuda brindada en la utilización del citómetro de flujo.

Al Sr. Severo Ayala Rivero y Rosa María Olivares Romero por su amistad, compañía y ayuda brindada en el Laboratorio de Citogenética.

Al Biol. Jorge Ibáñez Palacios por proporcionarme larvas de las especies de *Anastrepha* spp.

Al Sr. Rogelio Malpica Pacheco por facilitarme larvas de *Drosophila melanogaster* utilizadas en la investigación.

A mis compañeros y amigos: Gabriel Santoyo Reséndiz y Yadira Cornejo Silva, por su apoyo y amistad, y a todas aquellas personas que colaboraron en las diversas etapas de esta investigación.

A todos quienes directa o indirectamente colaboraron con la realización de este trabajo.

A todos MUCHAS GRACIAS.....

DEDICATORIA

A mis padres

José Daniel De Teodoro García y María Concepción Pardo García

A mi esposo

Gabriel Téllez Román

A mi hijo

Santiago Téllez De Teodoro

A mi hermano

Juan Carlos De Teodoro Pardo

**GRACIAS POR SU APOYO Y ENTUSIASMO DURANTE LA REALIZACIÓN
DE MI INVESTIGACIÓN**

CONTENIDO

	PAG.
<u>RESUMEN GENERAL</u>	iii
<u>GENERAL ABSTRACT</u>	iv
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	v
<u>DEDICATORIA</u>	vii
<u>CONTENIDO</u>	viii
I. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
1.1 <u>Justificación</u>	3
1.2 <u>Objetivo</u>	4
1.3 <u>Hipótesis</u>	5
II. <u>ESTUDIO ISOENZIMÁTICO EN <i>Anastrepha ludens</i>, <i>A. obliqua</i>, <i>A. serpentina</i> Y <i>A. striata</i> (MOSCAS DE LA FRUTA) DE MÉXICO</u>	6
2.1 <u>Resumen</u>	6
2.2 <u>Summary</u>	7
2.3 <u>Introducción</u>	7
2.4 <u>Materiales y Métodos</u>	11
2.5 <u>Resultados y Discusión</u>	15
2.6 <u>Conclusiones</u>	28
2.7 <u>Literatura citada</u>	29
III. <u>CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA DE <i>Anastrepha ludens</i> (TEPHRITIDAE: DIPTERA)</u>	35
3.1 <u>Resumen</u>	35
3.2 <u>Summary</u>	36

	3.3 Introducción	36
	3.4 Materiales y Métodos	37
	3.5 Resultados y Discusión	39
	3.6 Conclusiones	51
	3.7 Literatura citada	51
IV.	CONTENIDO DE ADN EN <i>Anastrepha ludens</i> Y <i>A. serpentina</i>	57
	4.1 Resumen	57
	4.2 Summary	57
	4.3 Introducción	58
	4.4 Materiales y Métodos	61
	4.5 Resultados y Discusión	62
	4.6 Conclusiones	63
	4.7 Literatura citada	64
V.	HIBRIDACIÓN GENÓMICA <i>IN SITU</i> (GISH) EN <i>Anastrepha</i> spp.	66
	5.1 Resumen	66
	5.2 Summary	66
	5.3 Introducción	67
	5.4 Materiales y Métodos	71
	5.5 Resultados y Discusión	76
	5.6 Conclusiones	78
	5.7 Literatura citada	78

VI.	<u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	81
VII.	<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	83
VIII.	<u>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u>	84
IX.	<u>ANEXOS</u>	86
	9.1 <u>Anexo A</u>	86
	9.2 <u>Anexo B</u>	89

ÍNDICE DE CUADROS

II. ESTUDIO ISOENZIMÁTICO EN *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* Y *A. striata* (MOSCAS DE LA FRUTA) DE MÉXICO

- Cuadro 1. Localización geográfica de los sitios de colecta de las diferentes especies de *Anastrepha* y hospedero.....13
- Cuadro 2. Prueba de X^2 por locus para probar el equilibrio de Hardy-Weinberg, número promedio de individuos analizados por muestra (N), porcentaje de polimorfismo (%P), heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o) y número de alelos por locus (.....).....17
- Cuadro 3. Estadísticos de F de Wright para evaluar la diferenciación de *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* en laboratorio y campo.....23
- Cuadro 4. Prueba de X^2 (Hardy-Weinberg) en hembras (H) y machos (M) de *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* de laboratorio y de campo.....26

III. CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA DE *Anastrepha ludens* (TEPHRITIDAE: DIPTERA)

- Cuadro 1. Localización geográfica de los sitios de colecta de *Anastrepha ludens* y hospederos.....38
- Cuadro 2. Prueba de X^2 por locus para probar el equilibrio de H-W, número promedio de individuos por muestra (N), porcentaje de polimorfismo (%P), heterocigosidad esperada (H_e) y heterocigosidad observada (H_o) de las localidades en estudio de *Anastrepha ludens*.....41

Cuadro 3. Promedio de F's para evaluar la diferenciación de *Anastrepha ludens* en diferentes localidades.....45

Cuadro 4. Prueba de X^2 por locus, número promedio de individuos por muestra (N), porcentaje de polimorfismo (%P), heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o) en hembras y machos de *Anastrepha ludens*.....50

IV. CONTENIDO DE ADN EN *A. ludens* Y *A. serpentina*.

Cuadro 1. Valores de ADN de *A. ludens* y *A. serpentina* de los ganglios cerebrales y las glándulas salivales.....

ÍNDICE DE FIGURAS

II. ESTUDIO ISOENZIMÁTICO EN *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* Y *A. striata* (MOSCAS DE LA FRUTA) DE MÉXICO

- Figura 1. Acetatos de celulosa de *Anastrepha* spp. A) 6PGDH en *A. ludens* de campo (1-8 ♂); B) IDH en *A. ludens* de campo (9-15 ♂); C) ME en *A. obliqua* de laboratorio (9-15 ♂); D) GPI en *A. obliqua* de laboratorio (1-5 ♀); E) MDH en *A. serpentina* de laboratorio (1-5 ♀) y F) GOT en *A. striata* de campo (6-10 ♂). M= Marcador molecular.....18
- Figura 2. Dendrogramas obtenidos por agrupación UPGMA. A) *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* de laboratorio y de campo de México. B) hembras y machos de *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* de laboratorio y de campo en México.....24
- Figura 3. Actividad enzimática en hembras y machos de *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* en condiciones de laboratorio y de campo.....27

III. CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA DE *Anastrepha ludens* (TEPHRITIDAE: DIPTERA)

- Figura 1. Representación esquemática de los patrones de bandeo isoenzimáticos en *Anastrepha ludens*. A) 6PGDH-Guatemala (naranja dulce), B) 6PGDH-Michoacán (mango), C) IDH-Veracruz (naranja agria y toronja), D) IDH-Nuevo León (naranja dulce), E) ME-Guatemala (naranja dulce) y f) GOT-Michoacán (mango).....44
- Figura 2. A) Dendrogramas obtenidos por agrupación UPGMA de *Anastrepha ludens*: A) Por localidad, B) Por sexo.....49

IV. CONTENIDO DE ADN EN *A. ludens* y *A. serpentina*.

Figura 1. Histogramas de ADN observados en las moscas de la fruta. El índice de ADN es indicado por el pico de G_0/G_1 . ▲ Canales del detector del citómetro. A) Eritrocitos de pollo (CEN ←, testigo); B) timocitos de ternera (CTN, testigo); C) *Anastrepha ludens* ganglios cerebrales † + CEN; D) *Anastrepha serpentina* ganglios cerebrales + CTN; E) *Anastrepha ludens* glándulas salivales + CEN; F) *Anastrepha serpentina* glándulas salivales + CTN.....

V. HIBRIDACIÓN GENÓMICA *IN SITU* (GISH) EN *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* Y *A. striata*

Figura 1. Cromosomas somáticos de A) *Anastrepha ludens*, B) *A. obliqua*, C) *A. serpentina* y D) *A. striata*.....77

INTRODUCCIÓN GENERAL

En México se cultivan alrededor de 1 300,000 hectáreas de frutales de diferentes especies, de esta superficie, 70,000 hectáreas corresponden a las especies frutícolas que constituyen los hospederos más importantes para las moscas de la fruta (*Anastrepha* spp.), como son los cítricos, mango, manzana, durazno, guayaba y zapote, distribuidos en diferentes lugares y climas, cuyas pérdidas anuales están estimadas en 30,000 millones de pesos, equivalentes alrededor de 5,000 millones de dólares, lo que ha originado desde hace varios años la preocupación del gobierno mexicano y la de los mismos productores que se han visto afectados en la comercialización por los problemas fitosanitarios de sus productos, especialmente en el mercado internacional (Carreón, 2000), causándoles dicha mosca cuantiosas pérdidas económicas (Núñez, 2000).

El género *Anastrepha* spp. utilizan las frutas como substrato para la oviposición y desarrollo de las larvas que se alimentan de la pulpa como el mango, guayaba, naranja, durazno, y varios más, causando daños directos e indirectos en la fruticultura (Núñez, 2000).

La gran variedad de especies de este género y el tipo de daño que causan, constituyen uno de los factores que limitan en mayor grado la movilización y el comercio de fruta fresca por las restricciones que imponen los países que se encuentran libres de la plaga (Malavasi *et al.* 1980, citado por Martínez, 1998).

Actualmente se reconoce que los géneros de mayor importancia dentro de la familia Tephritidae son *Bactrocera* (parte *Dacus*), *Rhagoletis*, *Ceratitis* (McCleay), *Anastrepha* (Schiner) y *Toxotrypana* (Gerstaecker) (Aluja y Mangan, 2008).

De los géneros antes mencionados *Anastrepha* es considerado el más diverso de los Tephritidae nativos de América; de acuerdo con la información taxonómica basada en la morfología éste comprende un total de 216 especies clasificadas en 18 grupos. En estos grupos se concentra el 87 % de las especies conocidas, mientras que el 13 % restante permanecen sin una clasificación precisa (Hernández-Ortíz, 2008). En México se reportan 37 especies de *Anastrepha* (Hernández-Ortíz, 2007), de las cuales únicamente cuatro son de importancia económica: *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata*.

Además el género *Anastrepha* es reconocido por el patrón típico de sus alas y principalmente por la morfología del ovipositor (Norrbom *et al.*, 1999). Su origen es neotropical y se distribuye desde el norte de Argentina hasta el sur de los Estados Unidos, incluyendo Centroamérica y las islas del Caribe (Aluja, 1994).

Se han descrito alrededor de 4,257 especies de moscas de la fruta, agrupadas en tres subfamilias y 471 géneros. Existen estudios de taxonomía, biogeografía y aspectos de biología y comportamiento de estos insectos, en especial en adultos y en aquellas especies de importancia económica (Norrbom *et al.*, 1998; Aluja, 1994). Sin embargo, hay poca información sobre aspectos genéticos en el género *Anastrepha*.

Como se menciona anteriormente, aunque la biología de *Anastrepha* ha sido objeto de diversos estudios, los análisis citogenéticos son escasos, ya que solamente 23 especies tienen descritos sus cromosomas mitóticos (Selivon *et al.*, 2005a, 2005b). Estas descripciones cromosómicas en *Anastrepha* son necesarios para ayudar en problemas taxonómicos y comprender la evolución cariotípica en este grupo de moscas y las relaciones evolutivas entre las especies que hasta ahora son pobremente estudiadas (Smith-Caldas *et al.*, 2001).

De igual manera los estudios de genética de poblaciones en el género *Anastrepha* son escasos, pero de gran importancia dado que este conocimiento permitirá tomar decisiones adecuadas para la aplicación de métodos de control como la Técnica del Insecto Estéril (TIE) específicamente para el caso de *A. ludens* y *A. obliqua* o para el de *A. serpentina* y *A. striata* realizar la planeación más adecuada para su control. Por lo tanto y dada la importancia económica de estos insectos se planteó realizar diversos estudios isoenzimáticos, contenido de ADN y la hibridación genómica *in situ* con el objetivo de analizar la variación genética en *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* en Tapachula Chiapas, México.

Justificación

La aplicación de la genética de poblaciones ayuda a planear y evaluar los programas de control de plagas que aplican la Técnica del Insecto Estéril (TIE). Los estudios de genética de poblaciones juegan un papel importante en estimar los rangos de dispersión y por lo tanto el flujo de genes entre las poblaciones, determinando si existen especies hermanas o diferenciación entre poblaciones, estableciendo el origen de las reintroducciones, también constituye una herramienta útil para monitorear la variabilidad genética de las colonias criadas bajo un sistema masivo y de este manera apoyar el control de calidad.

Los métodos para la estimación de los niveles de variabilidad genética pueden evaluar las similitudes de las líneas de cría masiva con las poblaciones blanco de campo en términos de composición alélica y frecuencia de genes.

La erosión de la variabilidad genética en las colonias de laboratorio destinadas a la liberación puede examinarse en términos de endogamia y distancias genéticas de las poblaciones blanco y fundadoras. También ayudan a distinguir los insectos silvestres de los destinados a la liberación, determinando junto con las pruebas correspondientes la compatibilidad y competitividad de las colonias de la cría masiva con los insectos silvestres blanco.

1.2 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la variabilidad genética en cuatro especies de *Anastrepha* (*Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata*), aplicando la técnica de electroforesis de isoenzimas, contenido de ADN e hibridación genómica *in situ*.

1.2.1 Objetivos Particulares

- Analizar las frecuencias alélicas, con base en el patrón de bandeo e intensidad resultante de cada isoenzima en *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* desarrolladas en condiciones de laboratorio y/o colectadas en campo.
- Estimar el flujo genético de *Anastrepha ludens* colectadas en los estados de Michoacán, Nuevo León, Veracruz y Guatemala.
- Conocer el contenido de ADN de *Anastrepha ludens* y *A. serpentina* en condiciones de laboratorio.
- Explorar la identidad genómica entre cuatro especies de *Anastrepha* mantenidas en el laboratorio mediante la hibridación genómica *in situ* (GISH).

1.3 Hipótesis

Se supone que *Anastrepha serpentina* constituye la especie más ancestral del grupo de *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. striata*, éstas tienen diferentes sistemas sexuales XX-YY y además cambiaron sus hábitos alimenticios de las ciruelas (*Spondias* spp.) pasaron a cítricos, por lo que se realiza un estudio electroforético para conocer la variabilidad genética que presentan las cuatro especies de *Anastrepha* y tratar de explicar si éstos aspectos genéticos pueden diferenciar poblaciones de laboratorio, campo y entre sexos.

II. ESTUDIO ISOENZIMÁTICO EN *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* Y *A. striata* (MOSCAS DE LA FRUTA) DE MÉXICO

ISOZYME STUDY IN *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* AND *A. striata* (FRUIT FLY) OF MÉXICO

RESUMEN

Las moscas de la fruta del género *Anastrepha* son una de las plagas más importantes de la fruticultura nacional. Existen antecedentes acerca de taxonomía, biogeografía y aspectos biológicos y de comportamiento; sin embargo, hay poca información sobre aspectos genéticos en el género. Por ello, el objetivo de estudio fue analizar la variabilidad genética en *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata*, procedentes de poblaciones desarrolladas en laboratorio y campo. Se analizaron las isoenzimas 6PGDH, IDH, ME, GPI, MDH y GOT en 240 individuos, obteniendo ocho loci con un número máximo de tres alelos. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa de cómputo Tools For Population Genetic Analyses (TFPGA). En promedio se observó que las especies desarrolladas en laboratorio presentaron mayor polimorfismo (64.58 %) que las recolectadas en campo (42.71 %). Las frecuencias alélicas de hembras y machos, difieren en cada locus, pero no se observaron diferencias significativas entre ellos.

Palabras clave: *Anastrepha* spp., electroforesis, diversidad, variabilidad genética.

SUMMARY

The fruit flies of the genus *Anastrepha* is one of the most important pests of the national fruit crops. There are precedents on taxonomy, biogeography and biology and behavior, yet little is known about genetic aspects of the genus. Therefore, the objective was to analyze the genetic variability in *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* and *A. striata* from populations developed in laboratory and field. We analyzed the 6PGDH, IDH, ME, GPI, MDH and GOT isoenzymes, in 240 individuals, obtaining eight loci with a maximum of three alleles. Statistical analysis was performed using the computer program Tools For Population Genetic Analyses (TFPGA). On average it was found that the species developed in the laboratory had higher polymorphism (64.58 %) than those collected in the field (42.71 %). Allele frequencies of females and males differ in each locus, but no significant differences between them.

Keywords: *Anastrepha* spp., electrophoresis, diversity, genetic variability.

INTRODUCCIÓN

En México las cuatro especies de moscas de la fruta de mayor importancia económica y cuarentenaria son: *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata*, que causan daños por un monto de \$710 millones de USD por año. En adición a este costo, existen otros gastos relacionados con las acciones de control de la plaga y las pérdidas de mercados internacionales por restricciones cuarentenarias (Enkerlin, 2000; Reyes *et al.*, 2000). Las moscas de la fruta se distribuyen desde el sur de EE.UU., Centro y Sudamérica incluyendo casi todas las islas del Caribe (Hernández-Ortíz and Aluja, 1993; Aluja, 1994).

Los estudios con isoenzimas-aloenzimas han demostrado su utilidad en la resolución de problemas como la identificación de especies y razas hospedador, el monitoreo de los cambios que se producen en la adaptación de cepas a las condiciones de laboratorio, la detección de resistencia a insecticidas, la construcción de mapas de ligamiento, su uso como marcadores, variabilidad genética y otros (Loxdale y Hollander, 1989).

También existen estudios combinando isoenzimas, cariotipos, morfometría y cruzamientos. Por ejemplo, en 10 poblaciones brasileñas de dos entidades del complejo *Anastrepha fraterculus*, los sistemas enzimáticos mostraron diferencias en las frecuencias alélicas en cuatro loci, permitiendo reconocer dos grupos de poblaciones (Selivon *et al.*, 2005).

La variación genética puede conocerse con el análisis directo del ADN o mediante sus productos, es decir analizando cambios en las proteínas o enzimas. Esta técnica involucra la separación electroforética de isoenzimas en geles de almidón, poliacrilamida y celulosa, y en su caso, de la tinción para la detección de la enzima (Weising *et al.*, 1995). La información básica sobre la variabilidad genética de las poblaciones de especies que constituyen plagas agrícolas permite la inferencia de su dinámica, fundamentalmente en aspectos como la demografía (crecimiento, cuellos de botella, etc.) y dispersión (flujo génico, efecto fundador, migración pasiva, etc.), aspectos de primordial importancia en la lucha contra insectos que constituyen plagas de importancia económica (Ochando *et al.*, 1994).

Se ha documentado cuando se reproduce a *Ceratitis capitata* (Wiedmann) bajo cautiverio, tal como sucede en las crías masivas, se afectan diferentes características biológicas y conductuales. Por ejemplo, Liedo *et al.* (2007) que cuando se hacen ligeras modificaciones en las condiciones de la colonia de adultos de *C. capitata*, se reducen los efectos adversos de la cría masiva sobre el desempeño de apareamiento de los machos estériles. También se ha documentado que la ubicación geográfica de *A. serpentina* y *A. obliqua* pueden afectar algunos parámetros de comportamiento sexual, tal como la hora de llamado y cantidad y/o calidad de compuestos feromonales (Aluja *et al.*, 2000; Hening y Matiolo, 2006). Sin embargo, en las cuatro especies nativas de moscas de la fruta, que son plagas de importancia económica en México, no existen estudios relacionados sobre genética que permitan medir en qué grado la constitución genética puede variar de un lugar a otro, así como el efecto de la cría masiva. Por lo que se planteó como objetivo estudiar la variabilidad genética en *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* y comparar las criadas en laboratorio con las de campo, aplicando la técnica de electroforesis de isoenzimas en acetatos de celulosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

De cada una de las cuatro especies de moscas de la fruta (*Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata*) que se utilizaron en el análisis isoenzimático, fueron estudiados insectos de dos diferentes tipos de procedencia. Unos procedían de colonias mantenidas en el laboratorio y otros directamente de campo. Las moscas de laboratorio se criaron en el Laboratorio de Sexado Genético del Programa MOSCAFRUT, Metapa de Domínguez, Tapachula, Chiapas. Alimentando las larvas con una dieta elaborada en base a

polvo de olote mientras que los adultos fueron alimentados con proteína hidrolizada y azúcar (3:1p/p) y después de 12 días, cuando llegaron a su madurez sexual, fueron colocadas en un ultracongelador marca REVCO en donde fueron mantenidos a -80 °C hasta su análisis. Por su parte, las moscas de campo (silvestres) se obtuvieron en diferentes localidades de Chiapas (Cuadro 1), para lo cual se recolectaron frutos maduros directamente del suelo, y estos se depositaron en recipientes con vermiculita, y se mantuvieron a 24-25 °C hasta su descomposición.

Cuadro 1. Localización geográfica de los sitios de colecta de las diferentes especies de *Anastrepha* y hospedero.

Especie	Localidad	Hospedero	Ubicación geográfica		Altitud (msnm)
			LN	LO	
<i>A. ludens</i>	Comitán, Chiapas	Naranja (<i>Citrus aurentis</i>)	16°14'19.93"	92°08'2.76"	1693
<i>A. obliqua</i>	Talismán, Chiapas	Ciruela amarilla (<i>Spondia</i> spp)	14°55'5.64"	92°15'42.88"	52
<i>A. serpentina</i>	Tuxtla Chico, Chiapas	Mamey (<i>Pouteria zapota</i> Jacq.)	14°59'24.02"	92°09'21.35"	497
<i>A. striata</i>	Izapa, Chiapas	Guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	14°54'1.67"	92°09'59.91"	233

LN = Latitud Norte; LO = Longitud Oeste.

Posteriormente, los frutos podridos se disecaron para extraer las larvas de moscas de la fruta, las cuales se dejaron desarrollar hasta llegar a adultos maduros sexualmente y también fueron conservados a -80 °C hasta su análisis.

Análisis isoenzimático

Para el estudio isoenzimático, se utilizaron insectos de 15 días después de emergidos, usando la técnica de acetato de celulosa propuesto por Herbert y Beaton (1993) con algunas modificaciones. Se analizaron las isoenzimas 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH, EC 1.1.1.44), isocitrato deshidrogenasa (IDH, EC 1.1.1.42), malato deshidrogenasa (descarboxilante; NADP⁺) (ME, EC 1.1.1.40), glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI, EC 5.3.1.9), malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37) y glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT, EC 2.6.1.1). Se examinaron 240 individuos; 120 moscas de laboratorio y 120 de campo (15 hembras y 15 machos en cada especie).

Para extraer las enzimas se colocó cada individuo en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 250 µL de solución extractora de CAAMP (ácido cítrico y 4-3- aminopropil morfolina; pH 7.5). El macerado se centrifugó 4 min a 13000 rpm, se extrajo el sobrenadante y se colocaron 12 µL de cada individuo directamente en el acetato de celulosa (Titan III Membranas de acetato de celulosa, Marca Helena Laboratories Inc.).

Análisis estadístico

Para realizar la lectura de cada zimograma, se imprimió y cotejó la misma enzima en cada una de las especies en estudio para ir definiendo cuantos locus se presentaban y después se realizó una matriz de datos para analizarla en el programa de cómputo TFPGA.

La movilidad relativa de las bandas se midió desde el origen (que va desde el cero) hacia el centro de la primera banda que apareciera, tomando en cuenta la banda más común (tomo el valor de 100) y hacia arriba (105/100) y abajo (95/100). En algunas enzimas, se detectó más de un locus y el locus que migró más rápido fue llamado locus 1, el siguiente 2, y así sucesivamente. Se estimaron las frecuencias alélicas, el porcentaje de polimorfismo, la heterocigosidad observada y esperada y el equilibrio Hardy-Weinberg (EHW).

Para determinar el grado de similitud entre las poblaciones (laboratorio y campo) y subpoblaciones (sexo), se calculó una matriz de similitud de Nei (1978), con la cual se realizó un análisis de agrupamiento por el método UPGMA utilizando la distancia euclidiana como coeficiente de similitud. La diferencia entre las poblaciones se calculó con los estadísticos F de Wright (Weir y Cockerham, 1984). Los análisis se realizaron por especie, diferente procedencia (laboratorio y campo) y sexo (hembras y machos). Los parámetros descriptivos de la diversidad y la estructura genética se obtuvieron con el programa de cómputo Tools For Population Genetic Analyses (TFPGA) (Miller, 1997).

Se registró la actividad enzimática por individuo de acuerdo a la movilidad e intensidad visual de las bandas, en cuatro categorías: 1) débil, 2) moderada, 3) intensa y 4) muy intensa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variación genética entre especies

Número de alelos

En las cuatro especies de moscas de la fruta estudiadas, se presentaron ocho loci con un número máximo de tres alelos (Cuadro 2). La mayoría de las enzimas estudiadas

(6PGDH, IDH, ME, GOT y MDH) están involucradas directamente en el control de las vías básicas de importancia para el metabolismo de la energía de acuerdo a Andrei *et al.*, 2002.

En el Cuadro 2, se presenta la prueba de X^2 por locus para probar el equilibrio de Hardy-Weinberg en las cuatro especies de moscas. En el locus MDH-2 no hubo diferencias significativas entre especies. En GPI y MDH-1 no hubo diferencias entre *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina* de laboratorio, así como en *A. obliqua* de campo; estos alelos están fijos en estas especies. No se observaron diferentes alelos, lo que indica que son monomórficas (Figura 1D y E). En ME presentaron diferencias significativas en *A. ludens* y *A. striata* de campo y en *A. obliqua* de laboratorio, es decir, no están bajo equilibrio de Hardy-Weinberg quizás porque el apareamiento no es aleatorio. En *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* en laboratorio se presentaron diferencias significativas en los locus 6PGDH-1 y 6PGDH-2; es decir, tienen actividad debido quizás a que los adultos necesiten activar esta enzima para la formación de 5-fosfo-D-ribulosa en el momento que lo necesiten.

Cuadro 2. Prueba de X^2 por locus para probar el equilibrio de Hardy-Weinberg, número promedio de individuos analizados por muestra (N), porcentaje de polimorfismo (% P), heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o) y número de alelos por locus ().

Especie	Condición	Locus/ promedio de alelos por locus								% P	H_e	H_o
		6PGDH-1	6PGDH-2	IDH	ME-1	GOT	GPI	MDH-1	MDH-2			
<i>A. ludens</i>	L	0.20 ^{NS} (3)	40.00 ^{NS} (2)	32.11 ^{NS} (2)	2.91 ^{NS} (2)	3.22 ^{NS} (2)	FIJO(1)	39.00 ^{NS} (2)	FIJO(1)	75.00	0.30	0.16
	C	0.10 ^{NS} (3)	30.00 ^{NS} (2)	2.80 ^{NS} (3)	3.90 [*] (3)	0.27 ^{NS} (2)	ND(0)	ND(0)	FIJO(1)	83.33	0.32	0.20
<i>A. obliqua</i>	L	15.65 ^{***} (3)	18.00 ^{NS} (2)	30.00 ^{NS} (2)	6.37 ^{**} (2)	0.65 ^{NS} (2)	FIJO(1)	FIJO(1)	FIJO(1)	62.50	0.28	0.09
	C	FIJO(1)	35.00 ^{NS} (2)	35.00 ^{NS} (2)	2.14 ^{NS} (2)	1.76 ^{NS} (2)	FIJO(1)	FIJO(1)	FIJO(1)	37.50	0.18	0.08
<i>A. serpentina</i>	L	FIJO(1)	15.00 ^{***} (2)	28.00 ^{NS} (2)	FIJO(1)	2.94 ^{NS} (2)	FIJO(1)	FIJO(1)	FIJO(1)	37.50	0.08	0.01
	C	0.009 ^{NS} (2)	FIJO(1)	FIJO(1)	FIJO(1)	FIJO(1)	ND(0)	ND(0)	ND(0)	0.00	0.007	0.007
<i>A. striata</i>	L	13.33 ^{***} (3)	22.00 ^{NS} (3)	2.78 ^{NS} (2)	1.26 ^{NS} (3)	8.11 ^{NS} (2)	ND(0)	ND(0)	FIJO(1)	83.33	0.37	0.35
	C	0.93 ^{NS} (3)	FIJO(3)	FIJO(1)	4.00 [*] (3)	0.00 ^{NS} (2)	ND(0)	ND(0)	FIJO(1)	50.00	0.18	0.15

L = laboratorio; C = campo; ND = no disponible; NS = no significativo; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$.

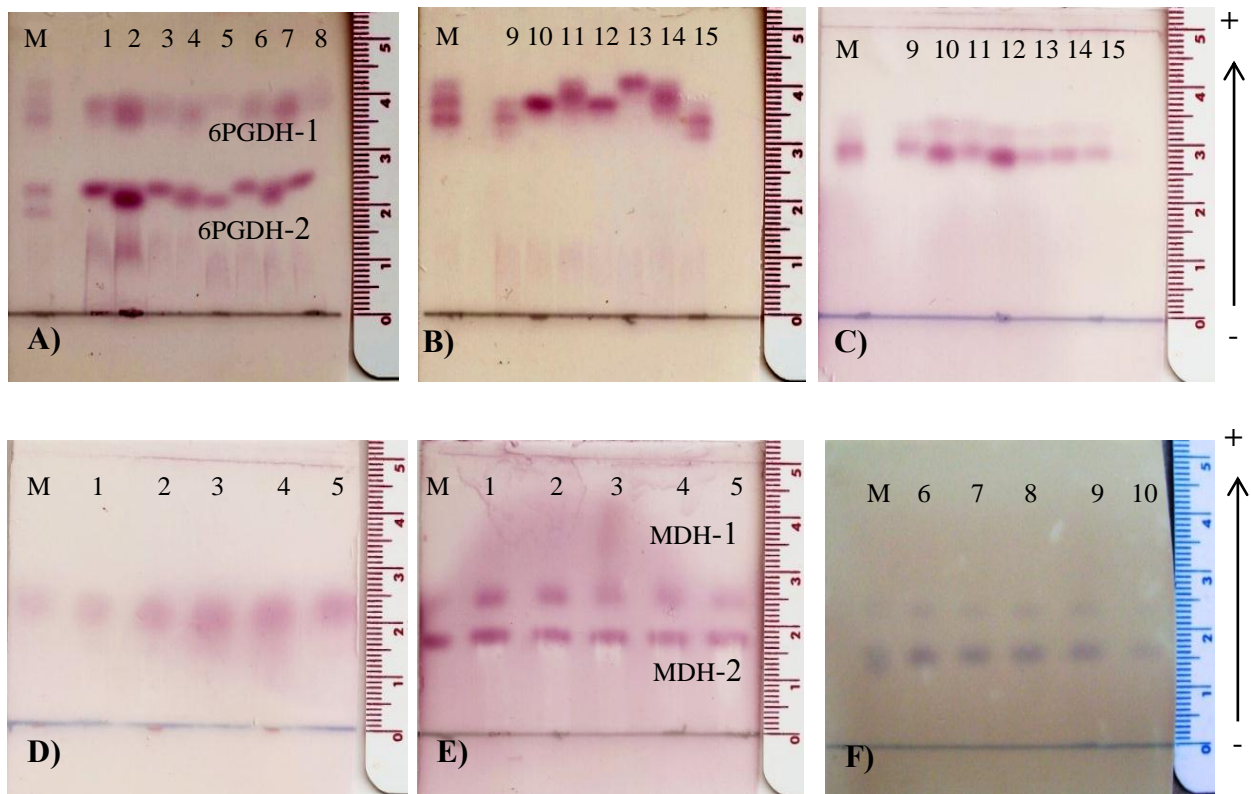


Figura 1. Acetatos de celulosa de *Anastrepha* spp. A) 6PGDH en *A. ludens* de campo (1-8 ♂); B) IDH en *A. ludens* de campo (9-15 ♂); C) ME *A. obliqua* de laboratorio (9-15 ♂); D) GPI en *A. obliqua* de laboratorio (1-5 ♀); E) MDH en *A. serpentina* de laboratorio (1-5 ♀); F) GOT en *A. striata* de campo (6-10 ♂). M = Marcador molecular.

Porcentaje de loci polimórficos y heterocigosidad

En el Cuadro 2 se puede apreciar el % de loci polimórficos (P), heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada y promedio de alelos por locus (paréntesis). Respecto al P se puede apreciar que este fluctúa entre 0.0 % para *A. serpentina* campo y 83.3 % para *A. ludens* campo y *A. striata* laboratorio. Esto difiere con lo encontrado por Mcpheron *et al.* (1988) en *Rhagoletis pomonella*; Ochando *et al.* (1994) en *Dacus* y *Ceratitis*; Vilardi *et al.* (1994) en *Ceratitis*; Pecina Quintero *et al.* (2009) en *Anastrepha ludens* y Boykin *et al.* (2010) en *A. suspensa*, quienes al estudiar dichas especies reportaron un menor P que va de 12.5-77 % de polimorfismo.

El P presenta una relación directa con el porcentaje de heterocigosidad observada, es decir, a porcentajes menores de P corresponden un promedio bajo de heterocigosidad (por ejemplo, *A. serpentina* campo presenta el P más bajo 0.0 %, así como el menor promedio de heterocigosidad observada (0.007), también presenta el promedio de alelos por locus de uno, en tanto que *A. ludens* campo y *A. striata* laboratorio cuyo P fue de 83.3 % presentaron los promedios más altos de heterocigosidad observada 0.20 y 0.35 respectivamente.

El alto % de heterocigosidad puede ser un indicador para *A. ludens* campo que al vivir en libertad presentan una mayor diversidad, debido a que las poblaciones puedan vivir en diferentes ambientes y cruzarse con poblaciones vecinas, mientras que en *A. serpentina* laboratorio el alto % de P puede deberse a que se haya introducido material nuevo y el cual tiene la oportunidad de cruzarse con la población existente.

En *A. striata* se encontró mayor polimorfismo en condiciones de cría que en campo, quizás porque se mantiene una colonia pequeña y no se ha podido adaptar en la dieta para su reproducción en laboratorio, por lo que se colecta material silvestre que constantemente se está incorporando al laboratorio.

Para *A. serpentina* se obtuvo 0 % polimorfismo en campo ya que se únicamente fue muestreada una pequeña región del Soconusco todas las moscas provenían del mamey y fueron pocos los frutos muestreados, esto son las que pudieran ser las causas del cero polimorfismo. También quizás porque su distribución geográfica es más restringida que la de *A. ludens*, ya que ésta tiene una distribución geográfica amplia si se compara con *A. serpentina*. De igual forma si se compara el número de hospederos, es de aproximadamente 50 especies de plantas en *A. ludens*, mientras que en *A. serpentina* es de alrededor de 20 hospederos en México en 9 familias botánicas distintas (Norrbom y Kim 1988; Hernández-Ortíz, 1992).

En México, el mango es atacado por *A. obliqua* y *A. ludens*; la primera especie presenta una dominancia de infestación en zonas bajas (< 500 msnm), mientras que *A. ludens* es más dominante en zonas elevadas (> 900 msnm) (Hernández-Ortíz, 1992). Algo similar sucede entre *A. fraterculus* y *A. striata*, a pesar de que es común encontrar ambas especies atacando frutos de guayabas en un mismo sitio, la primera especie es dominante en zonas altas mientras que la segunda domina en zonas bajas (Hernández-Ortíz y Aluja 1993).

En promedio, las especies en laboratorio presentaron más polimorfismo (64.58 %) que las desarrolladas en campo (42.71 %). Generalmente se espera encontrar más polimorfismo en las especies de campo ya que las moscas se encuentran en condiciones naturales, tal como se observa en *A. ludens* de campo (83.33 %), mientras que en laboratorio es menor (75 %). Se debe tomar en cuenta que *A. ludens* tiene una amplia distribución geográfica, desde el estado de Tamaulipas hasta Centroamérica y el Caribe.

Otra razón para esperar polimorfismo en campo en *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* es que son polífagas (se alimentan de naranja, mango, mamey, guayaba), de acuerdo a Hernández-Ortíz, 1992, mientras que en el laboratorio se alimenta de una sola dieta artificial (Hernández *et al.*, 2010).

En cuanto al P intermedios (Cuadro 2) en general siguen la misma tendencia de que a P alto mayor heterocigosidad observada, a excepción de *A. obliqua* laboratorio y campo y *A. serpentina* laboratorio.

En cuanto al promedio general la heterocigosidad observada y esperada fue de 0.131 y 0.214 respectivamente.

La diversidad existente entre las diferentes especies muestreadas está determinada en función de la heterocigosidad posiblemente se deba a que las poblaciones presenten un alto porcentaje de cruzamiento o también puede ser debido a heterocigosidad de los individuos muestreados.

Se menciona que el cruzamiento puede ser más alto en las especies recolectadas en campo, mientras que las que se encuentran cautivas puedan tender a la deriva genética. También Joachim-Bravo *et al.* (2009) sugiere que el uso de colonias híbridas es más apropiado al uso de colonias a las que no se les incorporan ejemplares silvestres, sobre todo en estudios que involucran parámetros de comportamiento, ya que estudios anteriores se observó que las colonias híbridas se comportaron como las poblaciones silvestres (Joachim-Bravo y Zucoloto, 1998). No obstante, bajo condiciones de campo las cruza dependen de la localidad, ambiente y la distancia entre las poblaciones.

Por otro lado la heterocigosidad observada puede ser producto de la selección al momento de la recolecta de la población. Otra causa puede ser la influencia del tamaño de muestra durante el muestreo (como se mencionó anteriormente en *A. serpentina* de campo), ya que no se muestrean poblaciones sino individuos y quizás la diversidad observada correspondió a variaciones un tanto sesgadas respecto al nivel dentro de las poblaciones.

Los organismos considerados plagas se encuentran bajo presión constante debido a los métodos de control altamente selectivos por lo que se esperaba bajos niveles de diversidad genética (Benavides *et al.*, 2005). En *A. ludens* hubo menor diversidad en laboratorio que en

campo (H_e : 0.30-0.32) lo cual se debe quizás a la presión de los métodos de control, como la Técnica del Insecto Estéril (TIE).

La diversidad genética en las colonias de cría en laboratorio es el producto del número de individuos fundadores de la colonia y los cuellos de botella que generalmente se presentan en el laboratorio debido a que son pocos los individuos que presentan capacidad para adaptarse a condiciones específicas como el tipo de dieta artificial. Sin embargo, en algunos trabajos ha sido demostrado que no siempre ocurre de esta manera y que los sistemas de cría artificial también permiten que la diversidad genética se mantenga (Lopera-Barrero *et al.*, 2009).

Diferenciación genética entre poblaciones

Los valores de los estadísticos F fueron diferentes a cero, excepto para GPI y MDH-2 (Cuadro 3). El promedio de F_{st} de todos los loci fue 0.43. El locus 6PGDH-2 presentó valores altos en los tres estadísticos de F , es decir, hubo variación en las frecuencias alélicas entre las especies estudiadas. El valor promedio de F_{st} de los ocho loci fue 0.43. Los valores de F_{it} y F_{is} son positivos, lo que indica que hay una deficiencia de heterocigotos de los individuos con respecto a la población total (especie) y a las subpoblaciones (sexo). Lo cual significa que posiblemente ocurran apareamientos entre organismos emparentados o también esto puede ocurrir por el sistema de apareamiento en leks en el cual un solo macho se aparea con un número alto de hembras (Sivinski y Burk, 1989).

Cuadro 3. Estadísticos de F de Wright para evaluar la diferenciación de *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* en laboratorio y campo.

Locus	F_{it}	F_{st}	F_{is}
6PGDH-1	0.51	0.48	0.05
6PGDH-2	1.00	0.56	1.00
IDH	0.79	0.53	0.55
ME	0.43	0.34	0.13
GOT	0.32	0.18	0.16
GPI	-	-	-
MDH-1	1.00	-0.01	1.00
MDH-2	-	-	-
Promedio	0.64	0.43	0.36
Jackknife (media-error estándar)	0.64(0.12)	0.44(0.06)	0.35(0.17)
Bootstrap (intervalo de confianza al 95%)	0.87-0.43	0.53-0.30	0.74 -0.14

F_{it} = población total; F_{st} = subpoblación; F_{is} = individuo dentro de una población.

Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento mostró tres grupos, donde *A. obliqua* de campo forma un grupo por separado (Figura 2A), es decir, es la menos parecida con el resto de las especies. *A. serpentina* y *A. striata* de campo están más estrechamente relacionadas entre sí que con cualquier otra especie. El siguiente grupo engloba a las cuatro especies de laboratorio; sin embargo, *A. ludens* de campo se encuentra en este grupo, lo cual indica que no hay diferencias entre *A. ludens* de laboratorio y de campo.

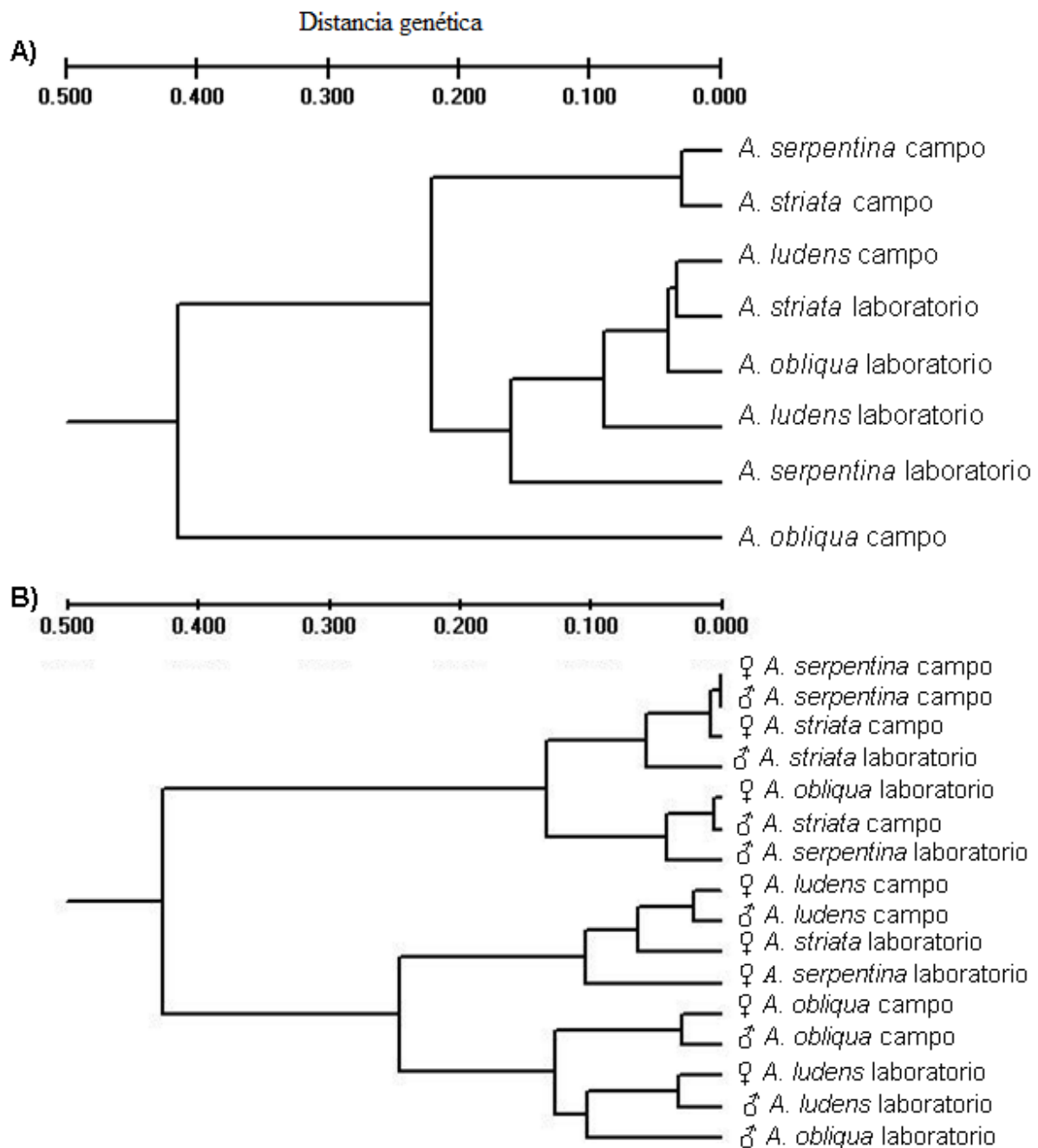


Figura 2. Dendrogramas obtenidos por agrupación UPGMA. A) *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* de laboratorio y de campo de México. B) hembras y machos de *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* de laboratorio y de campo en México.

Variación enzimática por sexo

Los resultados de la prueba de X^2 para probar el equilibrio de Hardy-Weinberg indican que no hay diferencias significativas entre sexos (Cuadro 4), excepto en 6PGDH-1 en hembras y machos de *A. striata* de laboratorio, en 6PGDH-2 en las hembras y machos de *A. ludens* de campo, en las hembras de *A. obliqua* de campo y en machos de *A. striata* de laboratorio; en IDH se aprecian las diferencias en *A. ludens* de laboratorio en ambos sexos, en machos de *A. obliqua* y *A. serpentina* de laboratorio y en hembras de *A. striata* de laboratorio. En ME en las hembras de *A. obliqua* de laboratorio y en machos de *A. striata* de campo. En GOT se observaron diferencias en machos de *A. obliqua* y *A. striata* de laboratorio. En virtud de que GPI y MDH en *A. ludens* y *A. obliqua* en ambas condiciones y sexo, además en *A. serpentina* de laboratorio, no presentaron actividad, es decir están fijos los alelos, se eliminaron y no fueron incluidas en el análisis.

Distancia genética

El análisis de la distancia genética y agrupación UPGMA mostró cuatro grupos (Figura 2B); el primer grupo está constituido por hembras y machos de *A. serpentina* de campo, hembras de *A. striata* de campo y machos de *A. striata* de laboratorio. En el grupo dos se encuentran emparentados las hembras de *A. obliqua* de laboratorio y los machos de *A. striata* de campo, debido a que tienen frecuencias alélicas parecidas. En los demás agrupamientos se relacionan hembras y machos de las especies de laboratorio y de campo. McPherson *et al.* (2000) mediante un estudio basado en ADN mitocondrial agrupa a *A. ludens* y *A. obliqua* en el grupo fraterculus, mientras que *A. serpentina* en el grupo serpentina y *A. striata* en el grupo striata. Analizando el dendrograma obtenido, se observa que *A. ludens* de laboratorio y de campo y *A. obliqua* de laboratorio sí se encuentran en un grupo, sin embargo se diferencian poco de *A. serpentina* y *A. striata*, ya que están en el mismo grupo.

Cuadro 4. Prueba de χ^2 (Hardy-Weinberg) en hembras (H) y machos (M) de *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* de laboratorio y de campo.

Locus/Sexo	<i>A. ludens</i>		<i>A. obliqua</i>		<i>A. serpentina</i>		<i>A. striata</i>		
	laboratorio	campo	laboratorio	campo	laboratorio	campo	laboratorio	campo	
6PGDH-1	H	19.00 ^{NS}	0.43 ^{NS}	0.18 ^{NS}	FIJO	FIJO	FIJO	11.48 ^{***}	0.35 ^{NS}
	M	12.80 ^{NS}	0.64 ^{NS}	11.27 ^{NS}	FIJO	FIJO	0.02 ^{NS}	3.75 [*]	0.02 ^{NS}
6PGDH-2	H	20.00 ^{NS}	15.00 ^{***}	FIJO	15.00 ^{***}	FIJO	FIJO	FIJO	FIJO
	M	20.00 ^{NS}	15.00 ^{***}	FIJO	20.00 ^{NS}	FIJO	FIJO	11.00 ^{***}	FIJO
IDH	H	16.00 ^{***}	2.96 ^{NS}	FIJO	FIJO	FIJO	FIJO	11.48 ^{***}	FIJO
	M	16.12 ^{***}	0.42 ^{NS}	15.00 ^{***}	20.00 ^{NS}	14.00 ^{***}	FIJO	FIJO	FIJO
ME	H	2.22 ^{NS}	1.11 ^{NS}	15.00 ^{***}	2.27 ^{NS}	FIJO	FIJO	8.77 ^{NS}	0.60 ^{NS}
	M	0.90 ^{NS}	2.81 ^{NS}	1.39 ^{NS}	8.66 ^{NS}	FIJO	FIJO	1.19 ^{NS}	11.27 ^{***}
GOT	H	2.22 ^{NS}	0.60 ^{NS}	1.98 ^{NS}	0.18 ^{NS}	FIJO	FIJO	0.08 ^{NS}	FIJO
	M	6.80 ^{NS}	FIJO	6.52 ^{**}	0.88 ^{NS}	0.70 ^{NS}	FIJO	6.52 ^{**}	1.28 ^{NS}

NS = no significativo; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$.

Actividad enzimática

En la actividad de las bandas para el alelo 6PGDH, se observó que los machos de *A. ludens* de laboratorio presentaron la mayor actividad enzimática, al contrario de *A. ludens* de campo donde las hembras fueron las más activas (Figura 3). En *A. obliqua* de laboratorio se presentó mayor actividad en comparación con las de campo. Las hembras de *A. serpentina* y *A. striata* de laboratorio presentaron mayor actividad enzimática, mientras que en campo fue mayor para los machos.

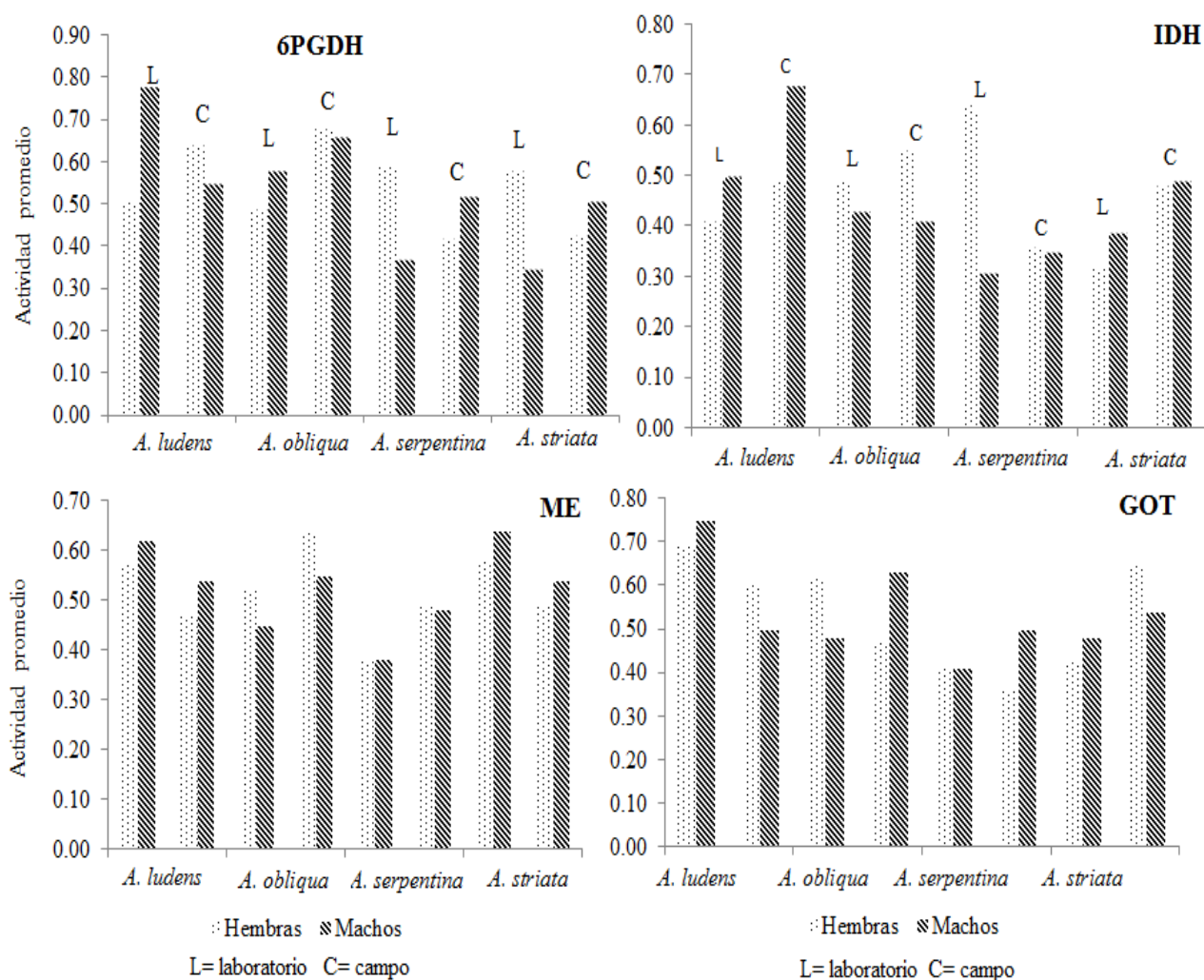


Figura 3. Actividad enzimática en hembras y machos de *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* en condiciones de laboratorio y de campo.

De manera general se observó que en 6PGDH es mayor la actividad enzimática en las moscas de laboratorio, excepto en *A. obliqua*. Esta enzima es importante porque cataliza la oxidación descarboxilante de 6-fosfo-D-gluconato en presencia de NADP⁺ a la formación de 5-fosfo-D-ribulosa. Además, es el principal generador de NADPH celular y desempeña una función crítica en la protección de las células del estrés oxidativo (Weiwei, 2007).

En la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH), los machos de *A. ludens* y *A. striata* presentaron mayor actividad en ambas condiciones, mientras que en hembras de *A. obliqua* y *A. serpentina* se observó en ambas condiciones. La IDH es importante en el metabolismo de los carbohidratos participantes en el ciclo de Krebs que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato en 2-oxoglutarato.

En ME los machos de *A. ludens* y *A. striata* presentaron la mayor actividad enzimática en el laboratorio, mientras que en *A. obliqua* y *A. serpentina* fue mayor la actividad en las hembras de campo. Esta enzima cataliza la oxidación reversible de L-malato a oxalacetato en presencia de NAD⁺.

Finalmente, para GOT en *A. ludens* se observó mayor actividad enzimática en los machos de laboratorio. Mientras que en *A. obliqua* y *A. serpentina* de campo fue mayor en los machos y en *A. striata* se presentó en hembras.

De manera general, incluyendo las condiciones de laboratorio o campo y el sexo, se apreció que el locus 6PGDH presentó la mayor actividad de las enzimas en estudio, tal vez porque las moscas tienen activados genes para generar NADPH celular y formar 5-fosfo-D-ribulosa; le sigue GOT en actividad y con poca diferencia ME. La mayor diferencia se apreció entre 6PGDH e IDH.

CONCLUSIONES

A. obliqua, *A. serpentina* y *A. striata* de laboratorio presentaron mayor polimorfismo.

No hubo diferencias significativas en ambos sexos, excepto en los locus 6PGDH-2, IDH y ME.

En la actividad enzimática promedio (laboratorio, campo y sexo), hubo diferencias entre 6PGDH e IDH.

Las enzimas son muy valiosas para el control de calidad y el monitoreo de condiciones de cría, así como para la identificación y caracterización de colonias de moscas en laboratorio.

LITERATURA CITADA

- Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 155-178.
- Aluja, M., J. Piñero, I. Jácome, F. Díaz-Fleischer, and J. Sivinski. 2000. Behavior of flies in the genus: *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini). *In: Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior.* M. Aluja y A. L. Norrbom (eds). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA, pp: 375-406.
- Andrei, L. K., H. Ji-Biao, C. Tinnakorn, M. F. Ryan, M. K. Yeon, R. Roberto, and R. P. Howard. 2002. Pregnancy alters glucose-6-phosphate dehydrogenase trafficking, cell metabolism and oxidant release of maternal neutrophils. *J. Clin. Invest.* 110: 1801-1811.
- Benavides, P., F. Vega, J. Romero-Severson, A. Bustillo, and J. J. Stuart. 2005. Biodiversity and biogeography of an important inbred pest of Coffee, *Coffee Berry Borer* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98: 359-366.
- Boykin, M. L., G. R. Shatters, G. D. Hall, D. Dean, and P. Beerli. 2010. Genetic variation of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) in Florida and the Caribbean using microsatellite DNA markers. *J. Econ. Entomol.* 103: 2214-2222.
- Enkerlin, H. W. 2000. Factibilidad técnica y económica de programas regionales de control y/o erradicación de moscas de la fruta: Procedimientos para la elaboración de estudios. *In: Memorias del XIII Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta.* Centro Internacional de Capacitación en Moscas de la Fruta. Complejo Bioindustrial

- MOSCAMED-MOSCAFRUT SAGAR-CONASAG-DGSV. Metapa de Domínguez, Chiapas, México. pp: 35-62.
- Henning, F., and S. R. Matioli. 2006. Mating time of the West Indian fruit flies *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *Neotrop. Entomol.* 35:145-148.
- Herbert, P. D. N., and M. J. Beaton. 1993. Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis. Department of Zoology. University of Guelph, Ontario. Helena Laboratories, Inc. 30 p.
- Hernández-Ortíz, V. 1992. El género *Anastrepha* Schiner en México (Diptera: Tephritidae): Taxonomía, distribución y plantas hospederas. Instituto de Ecología, A. C. y Sociedad Mexicana de Entomología. Publ. No. 33. Xalapa, Veracruz, México, pp: 162.
- Hernández-Ortíz V., and 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.
- Hernández, E., J. P. Rivera, D. Orozco-Dávila, M. Salvador, and J. Toledo. 2010. An artificial larval diet for rearing of *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.* 93: 167-174.
- Joachim-Bravo, I. S., A. M. da Silva Neto, and V. S. Dias. 2009. Biological and behavioral aspects of two laboratory strains of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): The influence of periodic introduction of wild flies in the colony. *Acta Zool. Mex.* (n. s.), 25: 359-374.
- Joachim-Bravo, I.S., and F. S. Zucoloto. 1998. Performance and feeding behavior of *Ceratitis capitata*: comparison of a wild population and a laboratory population. *Entomol. Exp. Appl.* 87: 67-72.

- Liedo, P., S. Salgado, A. Oropeza, and J. Toledo. 2007. Improving mating performance of mass-reared sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) through changes in adult holding conditions: demography and mating competitiveness. *Fla. Entomol.* 90: 33-40.
- Loxdale, H. D., and J. Den Hollander. 1989. *Electrophoretic studies on agricultural pest*. Syst. Ass. Clarendon Press. Oxford, 497 p.
- Lopera-Barrero, N. M., R. Pereira-Ribeir, A. J Povh., L. Vargas, B. C. Jacometo, and P. C. Gomes. 2009. Diversidad genética de lotes de *Piaractus mesopotamicus* usados en programas de repoblamiento y sus implicaciones en la conservación. *Agrociencia* 43: 249-256.
- Mcpheron, B. A., D. C. Smith, and S. H. Berlocher. 1988. Microgeographic genetic variation in the apple maggot *Rhagoletis pomonella*. *Genetics* 119: 445-451.
- Mcpheron, B. A., H.-Y. Han, J. G. Silva, and A. L. Norrbom. 2000. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based upon 16S rRNA mitochondrial DNA sequences. *In*: M. Aluja and A. L. Norrbom (eds), *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. CRC, Boca Raton, FL. pp. 505-533.
- Miller, M. P. 1997. TFPGA 1.3. Tools for population genetics analysis: A Windows program for the analysis of allozymes and molecular population genetic data. Northern Arizona University, USA. <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm> (Consultado: enero, 2008).
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Norrbom, A. L., and K. C. Kim. 1988. A list of the reported host plants of the species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). United States Department of Agriculture (APHIS 81-52), Washington, D. C. USA. 114 p.

- Ochando, M. D., C. Callejas, H. O. Fernández, and A. Reyes. 1994. Variabilidad genética aloenzimática en *Dacus oleae* (Gmelin). (Diptera: Tephritidae). I. Análisis de dos poblaciones naturales del Sureste Español. Bol. San. Veg. Plagas 20: 35-44.
- Pecina Quintero, V., J. López Arroyo, J. Loera Gallardo, J. Rull, E. Rosales Robles, E. Cortez Mondaca, S. Hernández Delgado, N. Mayek Pérez, and M. Aluja. 2009. Genetic differences between *Anastrepha ludens* (Loew) populations stemming from a native and an exotic host in NE México. Agric. Téc. Méx. 35: 323-331.
- Reyes, F. J., G. Santiago, and P. Hernández. 2000. The Mexican fruit fly eradication programme. In: Area-Wide Control of Fruit Flies and other Insect Pests. Keng-Hong Pests (ed). Penerbit University Sains Malaysia, Penang, Malaysia, pp: 377-380.
- Selivon, D., A. L. P. Perondini, and J. S. Morgante. 2005. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 98: 367-381.
- Sivinski, J., and T. Burk. 1989. Reproductive and mating behavior. In: A. S. Robinson and G. Hooper (eds). World Crop Pests, Volume 3A, Fruit flies, their biology, natural enemies and control. Elsevier, NY, pp: 343-351.
- Vilardi, J. C., B. O. Saidman, A. C. Alberti, G. E. Calcagno, A. Basso, F. Manso, and J. Cladera. 1994. Isoenzymatic and chromosomal analyses in three argentine populations of *Anastrepha fraterculus*. In: Proceedings, IV International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, VIII-14, Sand Key, FL.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC, Press. USA. 500 p.
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.
- Weiwei He, Yi Wang, Wei Liu, and Zhou Cong-Zhao. 2007. Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* 6-phosphogluconate dehydrogenase Gnd1. BMC Structural Biol. 7:38.

III. CARACTERIZACIÓN ISOENZIMÁTICA DE *Anastrepha ludens*
(TEPHRITIDAE: DIPTERA)

ISOENZYME CHARACTERIZATION OF *Anastrepha ludens*
(TEPHRITIDAE: DIPTERA)

RESUMEN

La mosca mexicana de la fruta, *A. ludens*, es la plaga más importante dentro del género *Anastrepha* que afecta la fruticultura en México. Se conoce información sobre su taxonomía, demografía, biogeografía, comportamiento y cría artificial, pero existe poca información sobre estudios de genética poblacional. El objetivo de este trabajo fue analizar la estructura genética de *A. ludens* en diferentes entidades de México y de Guatemala. Se analizaron las isoenzimas 6PGDH, IDH, ME y GOT, obteniendo cinco loci con un número máximo de cuatro alelos. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa de cómputo Tools For Population Genetic Analyses (TFPGA) y POPGEN. Se encontró que *A. ludens* presentó 100 % de polimorfismo en las localidades en estudio. El flujo genético fue alto (15.19) entre Michoacán (mango) y Nuevo León (toronja). Se observaron diferencias significativas entre hembras y machos sobre todo en el locus 6PGDH-2. La enzima málica (ME) presentó mayor polimorfismo que las enzimas 6PGDH, IDH y GOT.

Palabras clave: *Anastrepha ludens*, electroforesis, flujo genético, polimorfismo.

SUMMARY

The Mexican fruit fly, *A. ludens*, is the most important pest in the genus *Anastrepha* affecting fruit growing in Mexico. Is known about their taxonomy, demography, biogeography and behavior, but little information exists on population genetics studies in the genus *Anastrepha*. So, the aim of this study was to analyze the gene flow of *A. ludens* of different entities in Mexico and Guatemala. We analyzed the 6PGDH isoenzymes, IDH, ME and GOT, getting five loci with a maximum of four alleles. Statistical analysis was performed using the computer program Tools For Population Genetic Analyses (TFPGA) and POPGEN. It was found that *A. ludens* introduced 100 % polymorphism in the localities under study. Gene flow was high (15.19) from Michoacán (mango) and Nuevo León (grapefruit). Significant differences between females and males especially in the 6PGDH-2 locus. Malic enzyme (ME) had higher polymorphism of enzymes 6PGDH, IDH and GOT.

Keywords: *Anastrepha ludens*, electrophoresis, gene flow, polymorphism.

INTRODUCCIÓN

La mosca Mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens* (Loew) (Tephritidae: Diptera), es la plaga más importante del género *Anastrepha* que afecta a la fruticultura en México debido a que ataca varias especies de frutales (Aluja, 1994; Enkerlin, 2000; Valencia-Botín, 2004).

A. ludens se distribuye en México excepto en los estados de Baja California Norte, Campeche, Hidalgo y Yucatán (Hernández-Ortiz, 1992). Su distribución mundial esta reportada desde el sur de Estados Unidos (Texas) hasta Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua (Hernández-Ortíz, 1992). La mosca mexicana de la fruta, se alimenta de alrededor de 50 especies de plantas, entre ellas el aguacate, café, manzana, pera, chirimoya, papaya, frijol y granadilla; además de las siguientes familias: *Eriobotrya*

japonica (níspero) (Rosaceae), *Citrus aurantium* (naranja agria), *Citrus maxima* (pomelo), *Citrus paradisi* (toronja), *Citrus sinensis* (naranja dulce) (Rutaceae), *Mangifera indica* (mango) (Anacardiaceae) y *Alchornea latifolia* (caimito) (Hernández-Ortíz, 1992).

Una de las características que presentan las poblaciones de *A. ludens*, es que no han sido identificados marcadores para diferenciarlas genéticamente, debido a la alta variabilidad intrapoblacional (Mangan y Moreno, 2003).

Actualmente, son pocos los estudios de genética de poblaciones en esta especie, la información que existe se ha enfocado a *Anastrepha fraterculus* y *Ceratitis capitata* (Malacrida *et al.*, 1998; Alberti *et al.*, 1999; Alberti *et al.*, 2002), a pesar de que constituyen un componente importante para el éxito en el manejo de esta plaga y especialmente en la aplicación de la Técnica del Insecto Estéril (TIE) en México (Krafsur, 2005). Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue llevar a cabo el análisis isoenzimático para conocer la estructura genética entre diferentes poblaciones y hospederos de México (Michoacán, Nuevo León y Veracruz) y Guatemala.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se recolectaron frutos infestados con *A. ludens* en tres localidades de México (Michoacán, Nuevo León y Veracruz) y una de Guatemala (Cuadro 1). Las larvas maduras de Michoacán, Nuevo León y Guatemala se disecaron y colocaron en recipientes con un sustrato de arena o aserrín. Después los recipientes fueron enviados al Laboratorio de Sexado Genético del Programa MOSCAFRUT, Metapa de Domínguez, Chiapas. Por su parte, el material proveniente de Veracruz se llevó directamente al laboratorio y se mantuvo en recipientes con vermiculita hasta que las larvas maduras salieron del fruto.

En todos los casos el período de pupación se llevó a cabo en condiciones de laboratorio a 26 °C y humedad relativa controlada al 85 %. Cuando emergieron los adultos se colocaron en jaulas y alimentados con proteína hidrolizada y azúcar (3:1p/p) y después de 12 días, cuando llegaron a su madurez sexual, fueron conservados a -80 °C en un ultracongelador marca REVCO.

Cuadro 1. Localización geográfica de los sitios de colecta de *Anastrepha ludens* y hospederos.

Localidad	Hospedero	Ubicación geográfica		Altitud (msnm)
		LN	LO	
Guatemala	Naranja dulce (<i>Citrus sinensis</i>)	14°36' 46.18''	90°32'11.70''	1523
Michoacán	Mango (<i>Mangifera indica</i>)	19°24'21.44''	102°02'48.59''	1625
Nuevo León	Naranja dulce (<i>Citrus sinensis</i>)	25°11'00.59''	99°49'46.84''	430
Nuevo León	Toronja (<i>Citrus paradisi</i>)			
Veracruz	Naranja agria y toronja (<i>Citrus aurantium</i> y <i>C. paradisi</i>)	21°04'10.26''	97°38'25.81''	180

LN = Latitud Norte; LO = Longitud Oeste.

Análisis isoenzimático

El trabajo isoenzimático se realizó en el Laboratorio de Sexado Genético del Programa MOSCAFRUT en Metapa de Domínguez, Chiapas, México.

Se analizaron los sistemas isoenzimáticos 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH, EC 1.1.1.44), isocitrato deshidrogenasa (IDH, EC 1.1.1.42), malato deshidrogenasa NADP⁺ (ME, EC 1.1.1.40) y glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT, EC 2.6.1.1), siguiendo el protocolo de electroforesis en acetato de celulosa descrito por Herbert y Beaton (1993). Se

examinaron 30 individuos (15 hembras y 15 machos) por población. Cada individuo se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 250 μ L de la solución extractora de CAAMP (ácido cítrico y 4-3-aminopropil morfolina, pH 7.5) para su maceración; posteriormente, se centrifugó por cuatro min a 13,000 rpm, se extrajo el sobrenadante y se colocó directamente en el acetato de celulosa. La electroforesis se corrió durante 2:30 h a 55 V y 25 °C.

Análisis de la diversidad genética

Se estimaron las frecuencias alélicas, el porcentaje de polimorfismo (% P), la heterocigosidad observada y esperada (H_o , H_e) y el equilibrio Hardy-Weinberg (EHW). Para determinar el grado de similitud entre poblaciones y subpoblaciones se calculó una matriz de similitud de acuerdo a Nei (1978) con la cual se realizó un análisis de agrupación por UPGMA utilizando la distancia euclidiana como coeficiente de similitud. La diferenciación entre las poblaciones (estados) y subpoblaciones (sexo) se estimó a través de los estadísticos F de Wright (Weir y Cockerham, 1984). Los parámetros descriptivos de la diversidad y estructura genética se obtuvieron a través del programa de cómputo Tools For Population Genetic Analyses (Miller, 1997). El flujo génico entre poblaciones se estimó de acuerdo a Yeh *et al.* (1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variación genética entre poblaciones de diferentes estados

En el Cuadro 2 se presenta la prueba de X^2 por locus para probar el equilibrio de Hardy-Weinberg de las localidades de *A. ludens* y se observa que los alelos 6PGDH-1 y 6PGDH-2 no mostraron diferencias significativas en frecuencias alélicas en las localidades, excepto en Michoacán cuyo hospedero fue el mango. Para IDH se observaron diferencias tanto en Michoacán como en Nuevo León en toronja. La ME mostró diferencias altamente significativas en las localidades de Nuevo León (en ambos hospederos) y Veracruz, mientras que para GOT presentó diferencias en Veracruz en naranja agria y toronja y Guatemala en

naranja dulce. En la Figura 1 se muestra una representación gráfica de los alelos observados en cada enzima.

Guatemala y Nuevo León (naranja dulce) presentan un mayor número de loci (cuatro de cinco) en equilibrio Hardy-Weinberg, mientras que Michoacán, Nuevo León (toronja) y Veracruz presentan tres loci en equilibrio. La falta de equilibrio indica que las poblaciones están bajo algún factor de cambio genético derivado de condiciones ambientales y/o de la biología de la especie.

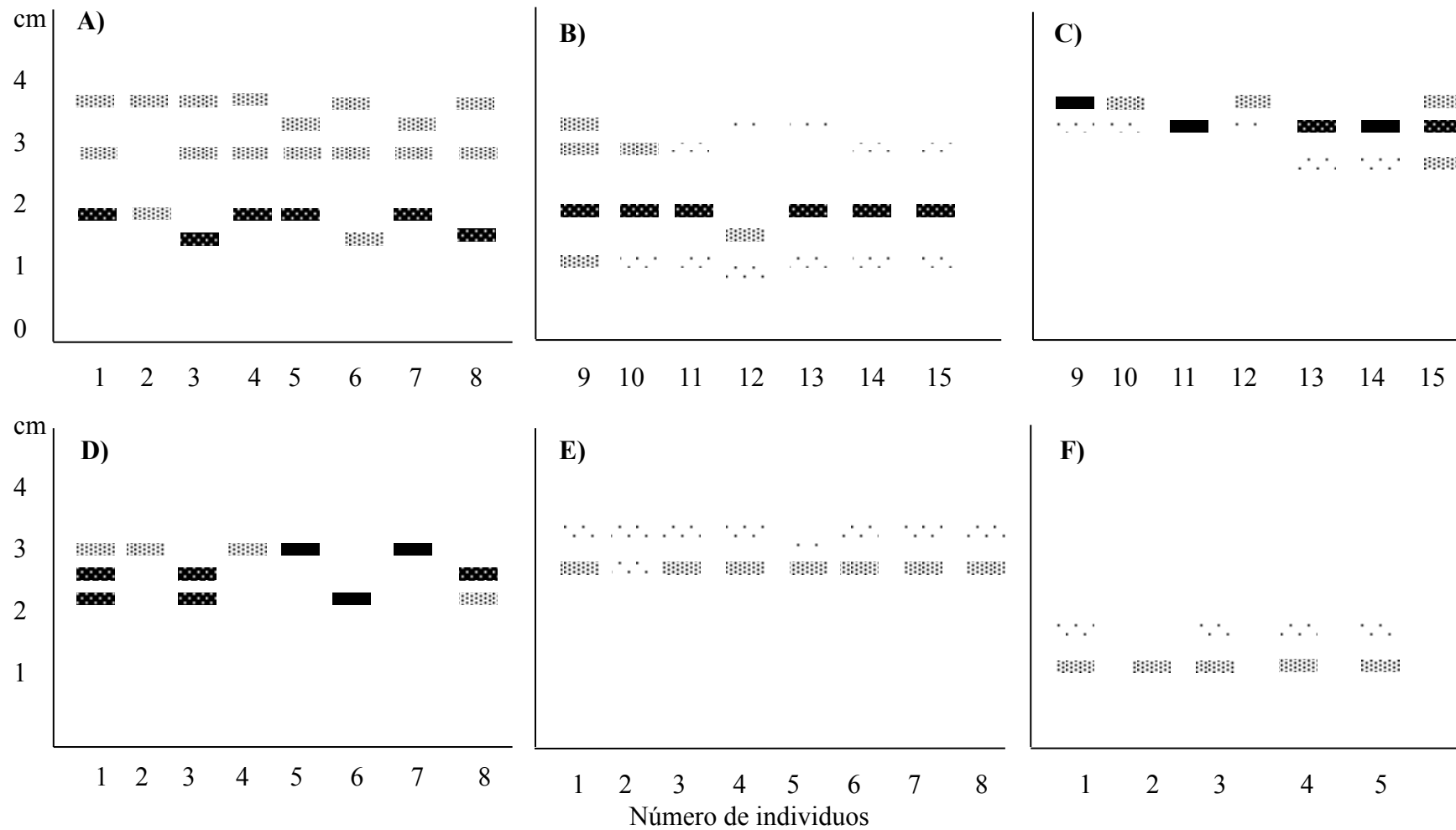
Anastrepha ludens fue 100 % polimórfica en las entidades bajo estudio (Cuadro 2). La heterocigosidad observada osciló entre 0.19 y 0.52. El valor más alto se presentó en *A. ludens* de Guatemala (naranja dulce) y la más baja se registró en Nuevo León (toronja). La heterocigosidad esperada fue mayor en ambos hospederos de Nuevo León (0.54) y la menor en Guatemala (0.47).

En este estudio el porcentaje de polimorfismo obtenido es mayor si se compara con *Rhagoletis pomonella* (Walsh) donde McPherson *et al.* (1988) registraron un 23 %, en *Dacus oleae* (Gmelin) Ochando *et al.* (1994) observaron 77 % y en *C. capitata* de 29 %; en esta última Gasperi *et al.* (1991) registraron 57 % en Kenia, Malacrida *et al.* (1996) señalan 42 % y Malacrida *et al.* (1998) mostraron 50 % de polimorfismo en Kenia. Sin embargo, Vilardi *et al.* (1994) observaron 12.5 % de polimorfismo en *C. capitata* mientras que Malacrida *et al.* (1998) reportó de 27 a 11 %, lo cual es muy bajo. Malacrida *et al.* (1996) registraron 40 % en *Ceratitidis rosa* Karsch y 29 % en *Bactrocera oleae* (Gmelin). Mientras que Ochando y Reyes (2000) reportaron 83 % de polimorfismo en cinco poblaciones españolas de *B. oleae*. En los trabajos mencionados utilizaron electroforesis horizontal en gel de almidón y de poliacrilamida, otros autores usaron acetatos de celulosa lo cual es importante para tener punto de comparación.

Cuadro 2. Prueba de X^2 por locus para probar el equilibrio de H-W, número promedio de individuos por muestra (N), porcentaje de polimorfismo (%P), heterocigosidad esperada (H_e) y heterocigosidad observada (H_o) de las localidades en estudio de *Anastrepha ludens*.

Localidad	Locus					N	% P	H_e	H_o
	6PGDH-1	6PGDH-2	IDH	ME	GOT				
Guatemala (naranja dulce)	25.26 ^{NS}	29 ^{NS}	30 ^{NS}	30 ^{NS}	6.44 ^{**}	29.60	100	0.47	0.52
Michoacán (mango)	0.12 ^{NS}	10.73 ^{***}	8.38 ^{***}	0.46 ^{NS}	0.27 ^{NS}	27.40	100	0.49	0.35
Nuevo León (naranja dulce)	2.25 ^{NS}	30 ^{NS}	2.42 ^{NS}	7.50 ^{***}	0.63 ^{NS}	28.00	100	0.54	0.42
Nuevo León (toronja)	0.83 ^{NS}	30 ^{NS}	6.47 ^{**}	9.81 ^{***}	30 ^{NS}	29.80	100	0.54	0.19
Veracruz (naranja agria y toronja)	1.28 ^{NS}	30 ^{NS}	30 ^{NS}	12.25 ^{***}	7.12 ^{***}	22.80	100	0.50	0.33

NS = no significativo; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$.



Actividad enzimática: ···· débil; □□□□ moderada; ■■■■ intensa; ■■■■ muy intensa.

Figura 1. Representación esquemática de los patrones de bandeo isoenzimáticos en *Anastrepha ludens*. A) 6PGDH-Guatemala (naranja dulce), B) 6PGDH-Michoacán (mango), C) IDH-Veracruz (naranja agria y toronja), D) IDH-Nuevo León (naranja dulce), E) ME-Guatemala (naranja dulce) y f) GOT-Michoacán (mango).

Utilizando otro tipo de técnicas como microsatélites, Augustinos *et al.* (2008) reportaron 93 % de polimorfismo en *Anastrepha ludens*, con AFLP Pecina-Quintero *et al.* (2009) reportaron 67 % y Boykin *et al.* (2010) caracterizaron genéticamente a *Anastrepha suspensa* Loew e identificaron siete loci con cinco a 19 alelos, al analizar la diversidad usando F_{st} y el análisis de varianza molecular reveló baja diversidad genética entre las muestras de Florida y el Caribe y también entre cítricos y no cítricos. El análisis usando migración reveló que hay un flujo genético continuo entre las muestras de Florida y el Caribe, y entre diferentes hospederos.

El 100 % de polimorfismo en *A. ludens* indica que se observaron diferentes alelos en cada uno de los loci estudiados, lo cual quiere decir que presenta una alta variabilidad genética, que les permite un alto grado de adaptabilidad a las diferentes condiciones climáticas que se presentan en las localidades de estudio.

Otro fenómeno que probablemente este contribuyendo en *Anastrepha ludens* es su polifagia (teniendo como hospederos al mango, naranja, níspero y otros), lo cual le permite tener un mayor potencial para responder a los cambios ambientales ya sea que estos sean naturales o inducidos por el hombre, lo cual es importante para desarrollar las estrategias de control para esta plaga. Además, *A. ludens* tiene una amplia distribución geográfica, ya que ha sido registrada desde el sur de Texas hasta Costa Rica (Hernández-Ortíz y Aluja 1993). La migración constante de individuos favorece la introducción de alelos nuevos que incrementan la diversidad de las poblaciones (Hartl y Clark, 1997).

Cabe mencionar que los estados bajo estudio están catalogados como zonas bajo control de esta especie (DOF, 2011), lo que indica que hay flujo libre de frutos entre ellos y esto puede ser la causa del alto grado de polimorfismo que se presenta en estas especies.

Los valores promedio de F_{st} para las poblaciones fueron distintos de cero, lo cual indica un nivel de diferenciación entre ellas (Cuadro 3). El promedio de F_{st} más bajo fue 0.15 entre Guatemala (naranja dulce) y Nuevo León (toronja), mientras que el valor más alto (0.67) se observó entre Nuevo León (naranja dulce) y Veracruz (naranja agria y toronja).

Respecto a los valores F_{it} y F_{st} , Nuevo León (naranja dulce) y Veracruz (naranja agria y toronja) presentaron los valores más altos. Los valores positivos de F_{it} y F_{is} indican que hay una deficiencia de heterocigotos de los individuos con respecto a la población total y a las subpoblaciones.

El flujo genético (Nm) más alto fue 15.19 entre Michoacán (mango) y Nuevo León (toronja) y el menor flujo (1.89) se presentó entre Guatemala (naranja dulce) y Veracruz (naranja agria y toronja).

El Nm es considerado bajo y no significativo si $Nm < 1$, es decir si hay menos de un migrante por generación (Gasperi *et al.*, 1991). El mayor Nm estimado fue 15.19 entre Michoacán (mango) y Nuevo León (toronja) lo que significa que hay 15 individuos migrantes por generación entre esos estados y, podría explicar el alto grado de diferenciación entre estas poblaciones. Este flujo entre *A. ludens* de Michoacán (mango) y Nuevo León (toronja) quizás es facilitado por las condiciones climáticas y altitudinales, y por la alta disponibilidad de estos hospederos en cada estado. Además de que Nuevo León es exportador de naranjas de buena calidad y cuando se llevan a Michoacán, durante el tránsito de las frutas facilita que las moscas lleguen a otros estados, por lo que es importante tener medidas cuarentenarias más estrictas que limiten el flujo genético de estas moscas.

El análisis de agrupamiento mostró que el grupo formado por *A. ludens* de Nuevo León (toronja) y Veracruz (naranja agria y toronja), están más estrechamente relacionadas que con cualquier otra localidad. El siguiente grupo lo conforman las poblaciones de *A. ludens* de Guatemala (naranja dulce) y Michoacán (mango), mientras que la población de Nuevo León

(naranja dulce) forma un grupo por separado, es decir, es la que muestra una diferenciación genética mayor con el resto de las poblaciones (Figura 2A).

Cuadro 3. Promedio de F's para evaluar la diferenciación de *Anastrepha ludens* en diferentes localidades.

Localidad	F_{it}	F_{st}	F_{is}	Nm
Guatemala (naranja dulce) vs Michoacán (mango)	0.21	0.03	0.18	8.75
Guatemala vs Nuevo León (naranja dulce)	0.31	0.37	0.03	9.17
Guatemala vs Nuevo León (toronja)	0.12	0.15	0.03	6.97
Guatemala vs Veracruz (naranja agria y toronja)	0.27	0.35	0.12	1.89
Michoacán vs Nuevo León (naranja dulce)	0.54	0.55	0.04	6.64
Michoacán vs Nuevo León (toronja)	0.36	0.37	0.02	15.19
Michoacán vs Veracruz	0.51	0.54	0.06	3.75
Nuevo León (naranja dulce) vs Nuevo León (toronja)	0.47	0.48	0.02	9.54
Nuevo León (naranja dulce) vs Veracruz	0.63	0.67	0.11	2.05
Nuevo León (toronja) vs Veracruz	0.44	0.47	0.06	4.07

F_{it} = población total, F_{st} = subpoblación, F_{is} = individuo dentro de una población, Nm = flujo genético.

En la Figura 2, se muestra un dendrograma de relación de similitud entre entidades. Nuevo León (toronja) y Veracruz son más similares entre sí. Guatemala y Michoacán fueron similares con un coeficiente de identidad de 0.27 y Nuevo León (naranja dulce) se relaciona con un valor de 0.52.

Variación enzimática por sexo

Se observaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas en el locus 6PGDH-1 en hembras y machos de Guatemala, tal como se aprecia en el Cuadro 4. En el locus 6PGDH-2 se observaron en ambos sexos en las localidades bajo estudio, excepto en machos de Michoacán. En IDH de Guatemala se presentó en ambos sexos, mientras que en

Michoacán y Nuevo León (naranja dulce) sólo los machos, y en Nuevo León (toronja) las hembras.

En ME se observaron en ambos sexos de Guatemala y en machos de Michoacán, y machos y hembras de Nuevo León (naranja dulce). Finalmente en GOT se observaron en hembras de Guatemala (naranja dulce), hembras y machos de Nuevo León (tanto naranja dulce como toronja) y en hembras de Veracruz y machos de Michoacán.

Se observaron diferentes niveles de diversidad entre hembras y machos de *A. ludens* en las localidades en estudio (Cuadro 4). Se presentó 100 % de polimorfismo en las localidades, excepto en las hembras de Veracruz (naranja agria y toronja).

En el alelo 6PGDH-1 no se observaron diferencias significativas en las localidades, excepto en ambos sexos de Guatemala (naranja dulce). La enzima 6PGDH es importante porque cataliza la oxidación descarboxilante de 6-fosfo-D-gluconato en presencia de NADP⁺ a la formación de 5-fosfo-D-ribulosa. Además es el principal generador de NADPH celular y desempeña un papel crítico en la protección de las células al estrés oxidativo (Weiwei, 2007).

Se ve claramente mayor diversidad en *A. ludens* de Nuevo León (naranja) y Nuevo León (toronja), seguido de Veracruz (naranja agria y toronja), Michoacán (mango) y Guatemala (naranja dulce), lo cual se debe a que Nuevo León (en particular Montemorelos) posiblemente sea el centro de origen de esta especie y conforme migra fue colonizando otras entidades.

Con respecto a esto, *A. ludens* tiene registrados alrededor de 22 huéspedes naturales en México, de los cuales más de tres cuartas partes son introducidos, destacando *Citrus* (Rutacea), mientras que solamente cuatro especies son plantas nativas, entre las que se asocia frecuentemente con *Sargentia gregii* (Rutaceae) considerada como su hospedero original (Plummer *et al.*, 1941).

Hay diferencias en la enzima málica o malato deshidrogenasa NADP (ME) en Nuevo León con naranja dulce y toronja, y Veracruz. Esta enzima cataliza la oxidación reversible de L-malato a oxalacetato en presencia de NAD⁺. En la mayoría de los organismos, la reducción del cofactor nicotinamida adenina dinucleotido fosfato, o NADP, a NADPH es principalmente la función de cuatro enzimas, entre ellas la enzima málica del citosol (Merritt *et al.*, 2009). En animales se encuentra en el citoplasma y está asociada al NADP⁺. Si la concentración del malato es elevada éste es transportado por medio de una proteína transportadora específica al citosol donde sufre la descarboxilación oxidativa a piruvato.

La ME y la citrato liasa dependiente de ATP están asociadas a la síntesis de ácidos grasos. El contenido de ácidos grasos y el metabolismo de las enzimas de estos fueron estudiados en hibernación en larvas en dos insectos resistentes al frío, la mosca tolerante a la helada *Eurosta solidaginis* y la polilla *Epiblema scudderian*. En ambas especies se encontró que incrementaron la proporción de ácidos grasos durante el invierno para evitar la congelación (Joanisse y Storey, 1996).

Otra función de la enzima málica puede ser su contribución al mantenimiento del equilibrio iónico en la hemolinfa. En algunos insectos se ha demostrado que los ácidos dicarboxílicos hacen una importante contribución a la fuerza aniónica total. También puede participar en el control del potencial redox de la hemolinfa y puede afectar indirectamente el grado de pigmentación y endurecimiento de la cutícula del insecto (Faulkner, 1956).

La enzima málica se encuentra en el citosol de *Drosophila melanogaster* (Geer *et al.*, 1979b). La actividad del tejido de ME-NADP es muy alto en las larvas del tercer instar de temprana edad, proporcionando alrededor del 33 % de la NADPH en esta etapa de la vida. La actividad de los tejidos disminuye durante el desarrollo pupal, pero aumenta en la edad adulta. Se cree que NADPH, IDH, G6PD y 6PGD interactúan para mantener el equilibrio NADP / NADPH y suministro de energía para reducir la lipogénesis y antioxidación (Singh *et al.*,

2007; Ying, 2008). Estudios de las dietas y las observaciones de la variación genética natural han encontrado conexiones de la actividad entre ME y las actividades de las enzimas derivadas de pentosas.

La variación encontrada de ME en *A. ludens* se debe quizás a que esta enzima participa en varios procesos, como se vio anteriormente, y es importante durante el metabolismo y desarrollo de las larvas de tercer instar. También ME está asociado con el ciclo de ácido cítrico (Chapman, 1998) y posiblemente tiene que ver con la madurez de la fruta (Alayón *et al.*, 2005).

De manera general, en machos se apreció mayor polimorfismo que en hembras. Los valores de heterocigosidad observada oscilaron entre 0.14-0.60. El valor más alto se presentó en las hembras de *A. ludens* de Guatemala (naranja dulce) y el menor valor en machos de Michoacán (mango). La heterocigosidad esperada estuvo por arriba de la heterocigosidad observada, excepto en las hembras de *A. ludens* de Guatemala y Michoacán. La heterocigosidad esperada mayor (0.55) correspondió a machos de Nuevo León (toronja) y la menor (0.33) a hembras de Veracruz (naranja agria y toronja) (Cuadro 4).

El análisis de la distancia genética y agrupación UPGMA mostró dos grupos (Figura 2B), el primero constituido por ambos sexos de Michoacán (mango) y Guatemala (naranja dulce), que a su vez se unen con las hembras de Nuevo León (naranja dulce) y los machos de Nuevo León (toronja). El grupo siguiente está formado por machos de Nuevo León (naranja dulce), hembras de Nuevo León (toronja) y machos de Veracruz (naranja agria y toronja), las hembras de Veracruz forman un grupo aislado, es decir son las que presentan menor similitud con el resto de los materiales estudiados.

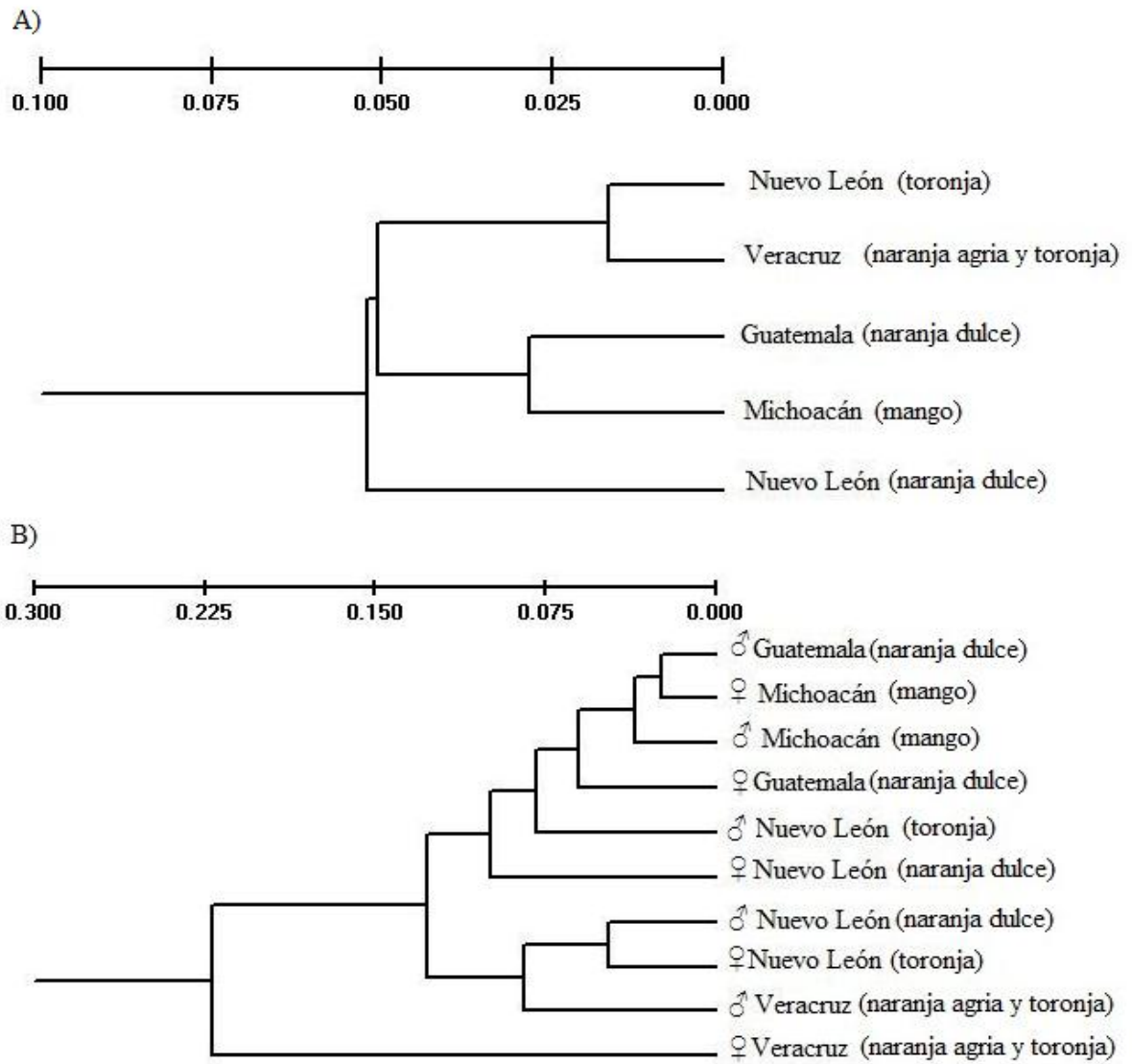


Figura 2. Dendrogramas obtenidos por agrupación UPGMA de *Anastrepha ludens*: A) Por localidad, B) Por sexo.

Cuadro 4. Prueba de X^2 por locus, número promedio de individuos por muestra (N), porcentaje de polimorfismo (% P), heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o) en hembras (H) y machos (M) de *Anastrepha ludens*.

Localidad	Sexo	Locus								
		6PGDH-1	6PGDH-2	IDH	ME	GOT	N	H_e	H_o	%P
Guatemala	H	14.0***	14.0***	15.0***	15.0***	15.0***	14.6	0.48	0.60	100
	M	11.48***	15.0***	15.0***	15.0***	0.35 ^{NS}	15.0	0.44	0.44	100
Michoacán	H	2.39 ^{NS}	15.0***	0.0003 ^{NS}	8.77 ^{NS}	2.75 ^{NS}	14.2	0.49	0.53	100
	M	1.74 ^{NS}	0.07 ^{NS}	15.0***	15.0***	13.0***	13.2	0.49	0.14	100
Nuevo León ¹	H	0.07 ^{NS}	15.0***	0.04 ^{NS}	5.40*	15.0***	13.0	0.49	0.38	100
	M	0.04 ^{NS}	15.0***	15.0***	4.25*	15.0***	15.0	0.52	0.43	100
Nuevo León ²	H	2.59 ^{NS}	15.0***	14.0***	1.98 ^{NS}	11.48***	15.0	0.50	0.23	100
	M	0.0003 ^{NS}	15.0***	2.27 ^{NS}	6.67 ^{NS}	5.27*	14.08	0.55	0.15	100
Veracruz	H	1.44 ^{NS}	15.0***	0.94 ^{NS}	FIJO	15.0***	10.2	0.33	0.23	80
	M	3.0 ^{NS}	15.0***	0.58 ^{NS}	8.66 ^{NS}	0.07 ^{NS}	12.6	0.54	0.43	100

¹Naranja dulce; ²Toronja; NS= No significativo; * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$;

CONCLUSIONES

A. ludens presentó polimorfismo en las localidades en estudio. El flujo genético es facilitado a su vez por la alta disponibilidad de hospederos en la zona de estudio. Se supone que hay un flujo de moscas de sus hospederos nativos a plantaciones de cítricos, aunque, no hay evidencias basadas en la estructura genética de las poblaciones que demuestren lo anterior.

LITERATURA CITADA

- Alayón L. P., V. A. Rodríguez, and G. C. 2005. Evaluación y caracterización de la calidad de fruta de diferentes combinaciones cultivar-portainjerto de manzanos (*Malus domestica* Borkh) producidos en Corrientes. Universidad Nacional del Nordeste; Comunicaciones científicas y tecnológicas 2005. Facultad de Ciencias Agrarias UNNE; Cátedra de Fruticultura; Cátedra de Química Analítica y Agrícola. <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/5-Agrarias/A-021.pdf>.
- Alberti, A. C., G. Calcagno, B. O. Daidman, and J. C. Vilardi. 1999. Analysis of the genetic structure of a natural population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92: 731-736.
- Alberti, A. C., M. S. Rodriguero, P. G. Cendra, B. O. Saidman, and J. C. Vilardi. 2002. Evidence indicating that the Argentine populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) belong to a single biological species. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95: 505-512.
- Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 155-178.

- Augustinos A. A., E. Stratikopoulos, E. Drosopoulou, E. G. Kakani, P. Mavragani-Tsipidou, A. Zacharopoulou, and K. as D. Mathiopoulos. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. *BMC Genomics* 9: 618. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/618>.
- Boykin, M. L., G. R. Shatters, G. D. Hall, D. Dean, and P. Beerli. 2010. Genetic variation of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) in Florida and the Caribbean using microsatellite DNA markers. *J. Econ. Entomol.* 103: 2214-2222.
- Chapman, R. F. 1998. *The insects. Structure and Funtion.* 4th edition. Cambridge University Press. United Kingdom. 770 p.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2011. Estatus de la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta (Enero 2011). SENASICA. <http://www.senasica.gob.mx/?id=1002&contenido=7637> (Consultado: enero, 2011).
- Enkerlin, H. W. 2000. Factibilidad técnica y económica de programas regionales de control y/o erradicación de moscas de la fruta: Procedimientos para la elaboración de estudios. En: *Memorias del XIII Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta.* Centro Internacional de Capacitación en Moscas de la Fruta. Complejo Bioindustrial MOSCAMED-MOSCAFRUT SAGAR-CONASAG-DGSV. Metapa de Domínguez, Chiapas, México. pp: 35-62.
- Faulkner, P. 1956. The 'malic' enzyme in insect blood. *Biochem. J.* 64: 430-436.
- Gasperi, G., R. C. Guglielmino, R. A. Malacrida, and R. Milani. 1991. Genetic variability and gene flow in geographical populations of *Ceratitis capitata* (Wied.) (medfly). *Heredity* 67: 347-356.

- Geer, W. B., L. D. Lindel, and M. D. Lindel. 1979b. Relationship of the oxidative pentose shunt pathway to lipid synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* 17: 881-895.
- Hartl, D. L., and A. G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3a ed. Sinauer Associates Inc. U.S.A. 682 p.
- Hebert, P. D. N., and M. J. Beaton. 1993. Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. Department of Zoology. University of Guelph, Ontario. Helena Laboratories, Inc. 30 p.
- Hernández-Ortíz, V. 1992. El género *Anastrepha* Schiner en México (Diptera: Tephritidae): Taxonomía, distribución y plantas hospederas. Instituto de Ecología, A. C. y Sociedad Mexicana de Entomología. Publ. No. 33. Xalapa, Veracruz, México, pp: 162.
- Hernández-Ortiz, V., and 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.
- Joanisse, R. D., and B. K. Storey. 1996. Fatty acid content and enzymes of fatty acid metabolism in overwintering cold-hardy gall insects. *Physiol. Zool.* 69:1079-1095.
- Krafsur, E. S. 2005. Role of population genetics in the sterile insect technique. *In*: Dyck V. A., J. Hendrichs, and A. S. Robinson (eds). *Sterile Insect Technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Springer, Dordrech, The Netherlands, pp: 389-406.

- Malacrida, A. R., C. R. Guglielmino, P. D'Adamo, C. Torti, F. Marinoni, and G. Gasperi. 1996. Allozyme divergence and phylogenetic relationships among species of tephritid flies. *Heredity* 76: 592-602.
- Malacrida, A.R., C. F. Marioni, L. C. Torti, F. M. Gomulski, F. Sebastiani, G. C. Bonvicini, G. Gasperi, and C. R. Guglielmino. 1998. Genetic aspects of the worldwide colonization process of *Ceratitidis capitata*. *J. Hered.* 89: 501-507.
- Mangan, R. L., and D. S. Moreno DS. 2003. Molecular analysis of *Anastrepha ludens* genetic variation. <http://www.tard.state.tx.us/listingt.php?id=3d6d01c202fe8>. (Consultado: enero, 2010).
- Miller, M. P. 1997. TFPGA 1.3. Tools for Population Genetic Analyses: A Windows program for the analysis of allozymes and molecular population genetic data. Northern Arizona University, USA. <http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm> (Consultado: febrero, 2009).
- Mcpherson, B. A, D. C. Smith, and S. H. Berlocher. 1988. Microgeographic genetic variation in the apple maggot *Rhagoletis pomonella*. *Genetics* 119: 445-451.
- Merritt, J. S. T., C. Kuczynski, E. Sezgin, Ch. TsehZ, S. Kumagai, and F. W. Eanes. 2009. Quantifying interactions within the NADP (H) enzyme network in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 182: 565-574.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Ochando, M. D., C. Callejas, H. Fernández, and A. Reyes. 1994. Variabilidad genética aloenzimática en *Dacus oleae* (Gmelin). (Diptera: Tephritidae). I. Análisis de dos poblaciones naturales del Sureste Español. *Bol. Sanid. Veg., Plagas* 20: 35-44.

- Ochando, M. D., and A. Reyes. 2000. Genetic populations structure in olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin): gene flow and patterns of geographic differentiation. *J. Appl. Entomol.* 124: 177-183.
- Pecina-Quintero, V., J. López Arroyo, J. Loera Gallardo, J. Rull, E. Rosales Robles, E. Cortéz Mondaca, S. Hernández Delgado, N. Mayek Pérez, and M. Aluja. 2009. Genetic differences between *Anastrepha ludens* (Loew) populations stemming from a native and an exotic host in NE México. *Agric. Téc. Méx.* 35: 323-331.
- Plummer, C. C., M. Mcphail, and J. W. Monk. 1941. The yellow chapote, a native host of the Mexican fruit fly. *U.S. Dept. Agr. Tech. Bull* 775: 1-12.
- Singh, R., R. J. Mailloux, S. Puiseux-Dao, and V. D. Appanna. 2007. Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 189: 6665-6675.
- Valencia-Botín, A. J., A. J. Bautista, M. N. Bautista, and J. A. López-Buenfil. 2004. Efecto de extractos acuosos de nim, *Azadirachta indica* A. Juss, en la oviposición de la mosca mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) en naranja valencia. *Fitosanidad* 8: 57-59.
- Vilardi, J. C., B. O. Saidman, A. C. Alberti, G. E. Calcagno, A. Basso, F. Manso, and J. Cladera. 1994. Isoenzymatic and chromosomal analyses in three argentine populations of *Anastrepha fraterculus*. *In: Proceedings, IV International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, 5-10 June, VIII-14, Sand Key, FL.*
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

- Weiwei, H., Y. Wang, W. Liu, and Z. Cong-Zhao. 2007. Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* 6-phosphogluconate dehydrogenase Gnd1. *BMC Struct. Biol.* 7:38.
- Yeh, C. F., R. Yang, and T. Boyle. 1999. POPGENE V. 1.31. Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis. Quick User Guide. University of Alberta and Center for International Forestry Research, Edmonton, AB. Canadá. 29 pp. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf> (Consultado: octubre, 2010).
- Ying, W. 2008. NAD1/NADH and NADP1/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid. Redox Signal.* 10: 1-28.

IV. CONTENIDO DE ADN EN *Anastrepha ludens* Y *A. serpentina*

CONTENT OF ADN IN *Anastrepha ludens* AND *A. serpentina*

RESUMEN

El contenido de ADN de *Anastrepha ludens* y *A. serpentina* fue determinado por citometría de flujo con tinción de núcleos con yoduro de propidio. Como testigo se utilizaron eritrocitos de pollo y timocitos de ternera. El contenido de ADN de los ganglios cerebrales de *A. ludens* fue de 1.59 pg y el de glándulas salivales 1.55 pg, mientras que en *A. serpentina* fue de 4.96 pg en ganglios cerebrales y 3.91 pg en glándulas salivales; ambas especies fueron diploides.

Palabras clave: *Anastrepha* spp., citometría de flujo, diploide.

SUMMARY

The DNA content of *Anastrepha ludens* and *A. serpentina* was determined by flow cytometry with staining of nuclei with propidium iodide. Chicken erythrocytes and calf thymocytes we used as a control. The DNA content of the cerebral ganglia of *A. ludens* was 1.59 pg and 1.55 pg of salivary gland, whereas in *A. serpentina* was 4.96 pg in cerebral ganglia and 3.91 pg in salivary glands, both species were diploid.

Keywords: *Anastrepha* spp., flow cytometry, diploid.

INTRODUCCIÓN

Los estudios de los cromosomas y las técnicas citogenéticas como bandeo C permiten comprender las relaciones genómicas, la acción génica y el comportamiento nuclear en mitosis y meiosis. Sin embargo, el análisis cromosómico puede ser combinado con datos moleculares de secuencia para avanzar en el conocimiento del genoma o de los genomas de una especie. El análisis genético molecular es una herramienta valiosa para el análisis filogenético (Haslop- Harrison, 1992).

En 1975 Gray y colaboradores mostraron que los cromosomas pueden ser clasificados mediante citometría de flujo de acuerdo a su contenido de colorante el que a su vez refleja el contenido de ADN (tiñendo células de hámster chino con fluorocromos para ADN) así mismo, demostraron que la citometría de flujo podría emplearse para separar cromosomas de un solo tipo.

De esta manera la citometría de flujo ha probado ser una herramienta útil para la detección rápida, precisa y cuantitativa en: la clasificación de cromosomas, la detección de aberraciones estructurales y numéricas, aislamiento de un solo tipo de cromosomas, etc.

Para la cuantificación del ADN que hay en una célula se emplea el citómetro de flujo. Desde entonces el número de aplicaciones de este se han incrementado, ya que actualmente se usa tanto en investigación básica como biología molecular, genética, y en el ámbito clínico se utiliza en microbiología, oncología, parasitología, farmacología y toxicología, así como también en la industria (Doležel, 1991, 1995). También ha encontrado su aplicación en otras áreas como la botánica, zoología, ecología, embriología e inmunología.

Citometría de flujo de un parámetro de análisis de ADN y dos parámetros de análisis de ADN / proteínas han sido realizados con material de las células de dípteros

Chironomus thummi, *Drosophila melanogaster*, *Calliphora vicina* y *Musca domestica* utilizando un impulso citofotométrico con objetivo de cuarzo, que ha sido fabricado especialmente para las investigaciones citofluorométricas. La presencia de poblaciones celulares heterogéneas con el contenido de ADN aneuploide y poliploides en el material celular de diferentes etapas de desarrollo de dípteros han sido determinados, por lo que en las poblaciones de larvas predominan células poliploides y en imagos células aneuploides.

El empleo de la citometría de flujo en dípteros podría ser una nueva herramienta para las investigaciones citológicas y citogenéticas, como se muestra con el trabajo clásico genético de *Chironomus* y *Drosophila* (Ulrich, 1990).

El uso de la citometría de flujo ofrece alternativas para determinar el tamaño, composición y niveles de poliploidía de genomas de especies con interés taxonómico y para el mejoramiento de plantas con importancia comercial (Doležel, 1997, Bennett *et al.*, 2000).

Mediante esta técnica se ha estimado el tamaño del genoma de 12 especies de *Drosophila* secuenciadas así como de 91 diferentes variedades de 38 especies de Drosophilidae y se ha determinado que existen diferencias significativas en valores del genoma 2C intra e interespecíficos (Bosco *et al.*, 2007).

En todos los organismos vivientes, el tamaño del genoma es marcadamente variable. Basado en estimaciones, el valor C varía por un factor de ~100,000x, de 0.007 pg en levadura a 700 pg en *Amoeba dubia* (Cavalier-Smith, 1985; Gregory *et al.*, 2007). También hay una amplia heterogeneidad entre plantas (0.065 a 127.4 pg; Leitch y Bennett, 2007), animales (0.03 a 132.8 pg) y hongos (~0.007 a 0.81 pg) (Gregory *et al.*, 2007).

Los genomas de animales difieren considerablemente de tamaño, que van desde 20 millones a 100 billones de pares de bases, con importante variación entre las especies estrechamente relacionadas. Esta diversidad se refleja en los genomas secuenciados de animales, que van desde el nematodo *Meloidogyna incognita* en alrededor de 80 Mb (megabases) y para los humanos en alrededor de 3,2 Gb (gigabase), con una diferencia marcada en el tamaño de los genomas secuenciados de los invertebrados (la mayoría son menores de 250 Mb) y los vertebrados (son más grandes de 1 Gb) (Peterson *et al.*, 2009).

Bennett *et al.*, 2003 compararon con *Caenorhabditis* y *Drosophila* usando citometría de flujo el tamaño del genoma de *Arabidopsis* resultando en 157 Mb.

Por su parte Gregory y Johnston (2008) reportaron el tamaño del genoma, por medio de citometría de flujo, de hembras y machos de 67 especies de seis géneros en la familia Drosophilidae, incluyendo 55 especies del género *Drosophila*.

Brown *et al.* (2005) cuantificaron el contenido de ADN de la mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) por medio de citometría de flujo. Los investigadores utilizaron eritrocitos de pollo y *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae) como testigo. Los resultados corroboran reportes previos basados en el conteo cromosómico, mostrando que los machos de *B. tabaci* son haploides y las hembras son diploides. Estos resultados proporcionan una base importante que facilitará la investigación genómica para el biotipo *B. tabaci*.

Las diferencias en el tamaño del genoma es atribuido usualmente a la amplificación y delección de varias secuencias de ADN repetidas, incluyendo a elementos transposables (TEs). Los cambios ambientales pueden promover modificaciones en la cantidad de esas secuencias repetidas, por lo que se ha postulado que cuando una especie coloniza nuevos ambientes esto podría ser seguido por un

aumento en el tamaño del genoma. Nardon *et al.* (2005) probaron esta hipótesis estimando el tamaño del genoma de distintas poblaciones de *Drosophila* y encontraron que las poblaciones de *D. melanogaster* del este de África presentan genomas más pequeños que las poblaciones más recientes. Para las especies en la cual la colonización es un evento reciente, las diferencias encontradas en el tamaño del genoma no parece entonces ser relacionado con la historia de colonización.

Aunque la biología de *Anastrepha* ha sido objeto de diversos estudios (taxonómicos, biológicos, de comportamiento, etc.), solamente 23 especies tienen descritos sus cromosomas mitóticos (Selivon *et al.*, 2005a, 2005b).

El número cromosómico más frecuente en el género *Anastrepha* es $2n = 12$ (Selivon *et al.*, 2005), aunque se presentan diferencias en el número de brazos mayores o nombre fundamental (Bush, 1962) así como en el mecanismo de determinación sexual; hay especies con mecanismo XY/XX, y otras como *A. bistrigata* y *A. serpentina* que exhiben heteromorfismo de los heterocromosomas que involucran X1X2Y/X1X1X2X2 (Solferini y Morgante, 1987; Selivon *et al.*, 2005).

Ibáñez *et al.* (2010) caracterizaron cromosómicamente a *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* y *A. serpentina*, encontrando la presencia de sistemas Robertsonianos de fusiones-fisiones que tuvieron efecto en el número cromosómico ($2n$) y el nombre fundamental (n.f.) en autosomas y heterocromosomas, por lo que consideraron que *A. serpentina* dio lugar a los restantes cariotipos de *Anastrepha*: *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. striata*.

El objetivo de este estudio es conocer el contenido de ADN de *Anastrepha ludens* y *Anastrepha serpentina* en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 100 larvas por especie de *Anastrepha ludens* y *A. serpentina* de tercer instar en condiciones de laboratorio. Se sumergieron en agua para quitar el exceso de dieta y se colocaron en buffer PARTEC frío (200 mM Tris-HCl pH 7.4, 4 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100) para disecar ganglios cerebrales y glándulas salivales de cada especie. Los órganos se colocaron en una caja de petri con buffer PARTEC y se homogenizaron con un bisturí y alfileres entomológicos, se lavó la caja de petri con 0.7 mL de buffer PARTEC frío y se filtró dos veces en una malla fina.

La muestra se colectó en un tubo para citómetro de flujo y se almacenó a 8 °C. Posteriormente, se agregaron 100 µL de RNAsa (Ribonuclease A, MP Biomedicals, Inc.) y se incubó a 37 °C en una estufa (Lab-Line Instruments Inc. Imperial II Incubator) durante 1 hr; se agregaron 100 µL de yoduro de propidio (Becton Dickinson), se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad y se procedió a cuantificar el contenido de ADN de cada especie (Bosco *et al.*, 2007) en el citómetro de flujo (Becton Dickinson FACScan).

Se prepararon 2 L de PBS (PBS-DULBECCO sin Ca⁻¹ Mg⁺², Laboratorios Microlab S. A. de C. V.) con ácido de sodio para utilizar el citómetro.

Como testigo se utilizaron ganglios cerebrales y glándulas salivales de larvas de *Drosophila melanogaster* y se les hizo el mismo procedimiento que a las moscas de la fruta. También se ocuparon los eritrocitos de pollo (CEN, Becton Dickinson; contenido de ADN = 2.33 pg) y timocitos de ternera (CTN, Becton Dickinson; contenido de ADN = 3.7 pg).

En un tubo para citometría se colocó 1 mL de yoduro de propidio y 40 µL de cada testigo y se dejó reposar a temperatura ambiente y en oscuridad. Mediante la ecuación 1 se calculó el contenido de ADN de cada especie. El software utilizado para

analizar el contenido de ADN de cada especie fue ModFit LT Version 2.0. Verify Software House.

$$\text{pg de ADN de la muestra} = \left[\frac{\text{pico } G_1/G_0 \text{ muestra}}{\text{Pico } G_1/G_0 \text{ estándar}} \right] (\text{pg del estándar})$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la cuantificación del ADN, en los ganglios cerebrales y glándulas salivales, de la mosca de la fruta, se empleó el protocolo usado para linfocitos de sangre. Se observó que este método dañaba mucho a las células por lo que se optó por el método de Bosco *et al.* (2007) utilizado en *Drosophila* spp., el cual resulto no ser tan agresivo y así obtener el mayor número de células intactas y menor cantidad de restos celulares que impidieran la cuantificación del ADN.

Los histogramas mostrados en la Figura 1 para *A. ludens* y *A. serpentina*, se obtuvieron de la cuantificación de $\pm 20,000$ núcleos celulares. Sin embargo, el testigo de *Drosophila melanogaster* no se pudo ver con claridad. No obstante que el método fue sugerido para *Drosophila* los núcleos de estas no se cuantificaron con precisión debido a la gran cantidad de restos celulares en la muestra; mientras que los núcleos de *Anastrepha* se cuantificaron mejor. Debido a esto se buscaron alternativas que permitieran la determinación del contenido de ADN de estas especies, para lo cual se encontró que el uso de eritrocitos de pollo y timocitos de ternera con un contenido de ADN conocido sirvieran como testigos. Los eritrocitos de pollo fueron utilizados en ambas especies de mosca, sin embargo al cuantificar el contenido de ADN se observó que daban mejor resolución con *A. ludens*, por el contrario se utilizaron timocitos de ternera en *A. serpentina*. Con el uso del testigo de eritrocitos de pollo en *A. ludens* se observó un contenido de ADN en los ganglios cerebrales de 1.59 pg y de 1.55 pg en las

glándulas salivales; mientras que en *A. serpentina* presento en los ganglios cerebrales 4.96 pg y de 3.91 pg en las glándulas salivales (Cuadro 1), sin embargo, ambas especies mostraron un número cromosómico diploide $2n = 12$.

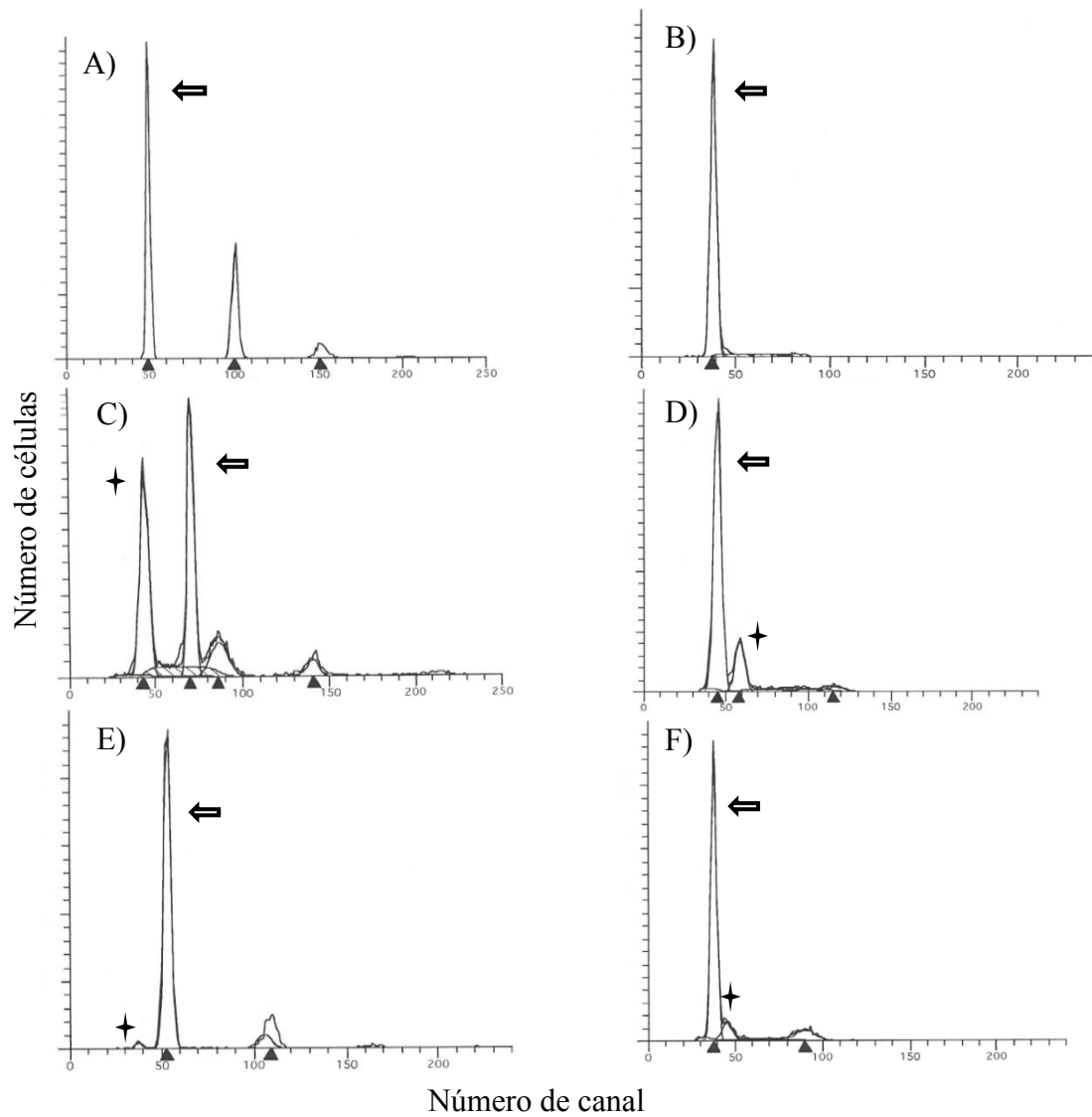


Figura 1. Histogramas de ADN observados en las moscas de la fruta. El índice de ADN es indicado por el pico de G_0/G_1 . ▲ Canales del detector del citómetro. A) Eritrocitos de pollo (CEN \leftarrow , testigo); B) timocitos de ternera (CTN, testigo); C) *Anastrepha ludens* ganglios cerebrales \leftarrow + CEN; D) *Anastrepha serpentina* ganglios cerebrales \leftarrow + CTN; E) *Anastrepha*

***ludens* glándulas salivales + CEN; F) *Anastrepha serpentina* glándulas salivales + CTN.**

Cuadro 1. Valores de ADN de *A. ludens* y *A. serpentina* de los ganglios cerebrales y las glándulas salivales.

Muestra/Especie	<i>A. ludens</i>						<i>A. serpentina</i>					
	Cer		CEN		ADN		Glánd		CEN		ADN	
1	33.76	50.00	1.57 pg	31.63	50.27	1.47 pg	50.75	35.78	5.25 pg	45.53	38.08	4.42 pg
2	41.15	54.77	1.75 pg	37.66	53.61	1.64 pg	43.67	31.22	5.18 pg	45.41	49.21	3.41 pg
3	44.02	71.00	1.44 pg	-	-	-	58.86	45.38	4.80 pg	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	70.43	56.46	4.61 pg	-	-	-
Promedio			1.59 pg			1.55 pg			4.96 pg			3.91 pg

Cer = ganglios cerebrales; glánd = glándulas salivales; CEN = eritrocitos de pollo; CTN = timocitos de ternera.

El mayor contenido de ADN de *A. serpentina* se relaciona con la longitud de sus cromosomas que en promedio es de 44.4 μm ; mientras que *A. ludens* presenta 37.2 μm . La diferencia en longitud de los cromosomas entre *A. serpentina* con las especies de *A. ludens*, *A. striata* y *A. obliqua* puede ser debido a que la primera se le considera como la forma ancestral y posiblemente al dar origen a las segundas, el proceso evolutivo de este género haya pérdida de material genético (Barr *et al.*, 2005; Ibáñez *et al.*, 2010).

El conocimiento de los resultados de la citometría de flujo, más los obtenidos por medio de citogenética, permiten tener información básica de cada una de las especies de moscas de fruta, que será de utilidad para cuando se realicen estudios moleculares.

Los estudios de citometría de flujo podrían permitir entender las relaciones filogenéticas de las moscas. También estos resultados servirían para comparar el tamaño del genoma de diferentes especies de moscas como lo realizado por Bosco *et al.*, 2007.

CONCLUSIÓN

Tanto *Anastrepha ludens* como *A. serpentina* presentaron un número cromosómico de $2n = 12$, estas mostraron diferencias significativas entre ellas en cuanto al contenido de ADN.

LITERATURA CITADA

- Bennett, M. D., P. Bhandol, and I. J. Leitch. 2000a. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses- 807 new estimates. *Ann Bot* 86: 859-909.
- Bennett, M. D., J. L. Leitch, P. H. James, and J. J. Spencer. 2003. Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry

- show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of ~125 Mb. *Ann Bot* 91: 547-557.
- Bosco, G., P. Campbell, T. J. Leiva-Neto, and A. T. Markow. 2007. DNA content reveals significant differences among strains as well as between species. *Genetics* 177: 1277-1290.
- Brown, J. K., G. M. Lambert, M. Ghanim, H. Czosnek, and D. W. Galbraith. 2005. Nuclear DNA content of the whitefly *Bemisia tabaci* (Aleyrodidae: Hemiptera) estimated by flow cytometry. *Bull. Entomol. Res.* 95: 309-312.
- Bush, G. L. 1962. The cytotaxonomy of the larvae of some Mexican fruit flies in the genus *Anastrepha* (Tephritidae, Diptera). *Psyche* 69: 87-101.
- Cavalier-Smith, T. 1985. The evolution of genome size. Chichester: John Wiley and sons Ltd.
- Doležel, J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochem Anal* 2:143-154.
- Doležel, J. 1995. Flow cytometry- principles and applications in mutation breeding. Practical exercises in flow cytometry. 14th IAEA/FAO Interregional Training Course on Advances in plant mutation techniques. Vienna Austria. 25p.
- Doležel, J. 1997. Applications of flow cytometry for study of plant genomes. *J. Appl. Gen.* 38: 285-302.
- Gregory, T. R., J. A. Nicol, H. Tamm, B. Kullman, and K. Kullman. 2007. Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Res.* 35:D332-38.
- Gregory, T. R., and J. S. Johnston. 2008. Genome size diversity in the family Drosophilidae. *Heredity* 101: 228-238.
- Heslop-Harrison, J. S. 1992. Book review: electron microscopy of plant cells by hall and hawes. *Ann Bot* 70: 388-389.

- Ibáñez, P. J., A. García Velázquez, C. S. Zepeda Cisneros y T. Corona T. 2010. Análisis cariotípico y diferenciación de cromosomas sexuales en cuatro especies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Agrociencia* 44: 691-700.
- Leitch I. J., and M. D. Bennett. 2007. Genome size and its uses: The impact of flow cytometry. *In: Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes*. J. Doležal, J. Greilhuber and J. Suda (eds). Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, Germany. pp: 153-76.
- Nardon, C., G. Deceliere, C., C. Loevenbruck, M. Weiss, C. Vieira and C. Biémont. 2005. Is genome size influenced by colonization of new environments in dipteran species?. *Mol Ecol* 14: 869-878.
- Peterson, B. K., E. E. Hare, V. N. Iyer, S. Storage, and L. Conner. 2009. Big Genomes Facilitate the Comparative Identification of Regulatory Elements. *PLoS ONE* 4(3): e4688. doi:10.1371/journal.pone.0004688.
- Selivon, D., A. L. P. Perondini, and L. S. Rocha. 2005. Karyotype characterization of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 273-279.
- Selivon, D., Perondini A. L. P., and Morgante, J. S. 2005a. A genetic- morphological characterization of two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Ann Entomol Soc Amer* 98:367-381.
- Selivon, D., Perondini, A. L. P., and Rocha, L. S. 2005b. The mitotic chromosomes of eighth species of *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae). *Neotrop Entomol* 34:273-279.
- Solferini, V. N., and Morgante, J. S. 1987. Karyotype study of eight species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Caryologia* 40: 229-241.
- Ulrich W. 1990. Aneuploid and polyploid cellular DNA heterogeneity in insect cell material of diptera species analyzed by flow cytometry. *J Biosci* 45:1027-30.

**V. HIBRIDACIÓN GEMÓMICA *IN SITU* (GISH) EN *Anastrepha* spp.
GENOMICA SITU HYBRIDIZATION (GISH) IN *Anastrepha* spp.**

RESUMEN

Se realizó hibridación genómica *in situ* (GISH) en *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* todas ellas de procedencia de cría de laboratorio, con el fin de conocer cuáles especies tienen un genoma parecido. Se llevó a cabo la técnica de GISH en el Laboratorio de Citogenética del Centro Internacional de Maíz y Trigo (CIMMYT), sin embargo, no se pudo observar con claridad la hibridación entre las especies del género *Anastrepha*. Se necesita seguir trabajando en esta técnica para continuar probando más parámetros con la finalidad de obtener resultados satisfactorios. El conocer aspectos genéticos aportará elementos que permitirán conocer las relaciones entre estas especies y tener información que quizás después se pueda utilizar en problemas del control de estas plagas.

Palabras clave: *Anastrepha* spp., ADN, genoma, heterosis, sonda.

SUMMARY

We performed genomic *in situ* hybridization (GISH) on *Anastrepha ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* and *A. striata* conditions of laboratory in order to know which species have a similar genome. Was performed GISH technique in the Cytogenetic Laboratory International Centre for Maize and Wheat, but could not clearly observe the hybridization between species of the genus *Anastrepha*. More work is needed in this technique to adjust some parts of the protocol and obtain satisfactory results. Knowing

these genetic aspects of these species will have more information that may later be used in problems of control of these pests.

Keywords: *Anastrepha* spp., DNA, genome, heterosis, probe.

INTRODUCCIÓN

Antes de los avances en técnicas moleculares para estudiar genomas eucariotas, la citogenética ha proporcionado la primera información sobre la organización del genoma y ubicación de distintos tipos de cromatina en los cromosomas. Durante varias décadas esa información se obtuvo mediante métodos citogenéticos clásicos que habían permitido solamente la descripción de características cromosómicas generales. Además del uso de técnicas clásicas, algunos estudios se llevaron a cabo mediante el uso de tinción diferencial, tal como bandeo C, nitrato de plata y tinción con fluorocromos, que condujo a una mejor caracterización de los cromosomas y de su contenido. A pesar de estos avances, la estructura genómica del enfoque del análisis genómico sigue siendo limitada (Schwarzacher, 2003; Jiang y Gill, 2006).

En las últimas décadas, la aplicación de hibridación *in situ* con sondas de DNA en los cromosomas causó una revolución citogenética, lo que llevó a la transición entre la era de la citogenética clásica a la era de la citogenética molecular. Esta metodología ha permitido la localización precisa de secuencias específicas de ADN, generando más información detallada sobre la organización cromosómica y genómica en varios grupos de plantas y animales. Utilizando el ensayo en hibridación *in situ* es posible integrar la información molecular de secuencias de ADN para su ubicación física a lo largo de los cromosomas de todos los representantes eucariotas (Schwarzacher, 2003; Jiang y Gill, 2006).

La citogenética molecular y los métodos de hibridación *in situ* han revolucionado nuestro conocimiento de la estructura, función, organización y evolución de genes y del genoma. Estos han permitido vincular datos moleculares acerca de las secuencias de ADN con información cromosómica y expresión en el tejido, a nivel celular y subcelular y han cambiado el sentido y aplicabilidad de la citogenética.

Los métodos moleculares incluyen hibridación *in situ*, microscopía electrónica e inmunofluorescencia usando anticuerpos. De éstos, la hibridación *in situ* es la técnica más valiosa para localizar secuencias de ácidos nucleicos (ADN o ARN) en el citoplasma, organelos, cromosomas o núcleos (Leitch *et al.*, 1994). Si bien la primera hibridación *in situ* de una sonda marcada a los cromosomas fue realizada hace muchos años (Gall y Pardue, 1969; John *et al.*, 1969), actualmente las sondas de ADN marcadas con sustancias fluorescentes son muy utilizadas para localizar los lugares físicos de las secuencias homólogas en los cromosomas y en núcleos interfásicos (Haslop- Harrison, 1992).

La hibridación *in situ* de ADN permite la localización y abundancia de secuencias de ADN para determinar por hibridación ADN etiquetado marcándolo en una preparación de cromosomas mitóticos, núcleo o fibras de ADN. Puede ser usado para mapeo físico de secuencias, para su localización cromosómica, la identificación y caracterización de cromosomas o segmentos de cromosomas y para proporcionar indicadores o rearrreglos evolutivos en el genoma (Schwarzacher y Heslop-Harrison, 2000).

La hibridación *in situ* tiene distintas aplicaciones genómicas y está siendo utilizada para facilitar el mapeo cromosómico, integrando mapas genéticos y físicos (Cheng *et al.*, 2001), asociar bandas cromosómicas con datos de secuencias (Jiang y Gill, 1994), medir *gaps* de los mapas existentes (Jackson *et al.*, 1998), detección de

secuencias de ADN ribosomal, ADN altamente y poco repetitivo (Moscone *et al.*, 1996), detección de secuencias de bajo número de copias o de copia única o (Wang y Chen, 2005), detección de transgenes.

La técnica de FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) comenzó en plantas de petunia (Hoopen *et al.*, 1996) y luego se extendió a muchos cereales (Carlson *et al.*, 2001; Salvo-Garrido *et al.*, 2001), consiste en el apareamiento de un determinado segmento de ADN o ARN a una secuencia de nucleótidos complementarios dentro de la célula, permitiendo verificar si la célula contiene esa secuencia y observar su exacta localización. El ADN se encuentra fijado en un soporte sólido, en forma condensada o descondensada. Se desnaturaliza *in situ*, y se hibrida con la sonda de interés. Se pueden usar distintos tipos de sondas: sondas locus específicas, sondas de secuencias repetitivas (centroméricas o teloméricas), sondas de pintado cromosómico (brazos o cromosomas enteros) y sondas de ADN genómico total.

La sensibilidad de la técnica de FISH en plantas es baja, comparada con la observada en animales, incluyendo humanos. Esta diferencia se debe a la presencia de pared celular y citoplasma en los preparados cromosómicos, lo cual inhibe la penetración de la sonda y genera ruido de fondo (*background*) (Jiang y Gill, 1994).

En humanos, la técnica de FISH permite detectar o confirmar anomalías génicas o cromosómicas que, en general, están más allá de la capacidad de resolución de la citogenética de rutina. La técnica puede usarse sobre células en metafase para detectar microdeleciones específicas, para identificar material de origen desconocido, o bien, para determinar si un cromosoma tiene una deleción simple o si está implicado en una reorganización sutil o compleja. Esta estrategia de diagnóstico también puede realizarse sobre células en interfase para determinar el número de copias de uno o varios cromosomas. La ventaja principal del FISH es que al no requerir de crecimiento de las

células, puede obtenerse el diagnóstico en tan sólo 24 horas (Muhlman *et al.*, 1986; Pinkel *et al.*, 1986).

La técnica de GISH (Genomic *in situ* Hybridization) se basa en el mismo principio que la técnica de FISH, sólo que en este caso la sonda consiste de ADN genómico total de una especie diferente a la que es objeto de estudio. Esta técnica ha sido usada exitosamente en diversas especies de plantas para evaluar la introgresión de especies silvestres en plantas cultivadas (Benabdelmouna *et al.*, 2003; Shigyo *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2003), así como en estudios evolutivos usando poliploides silvestres (Bennett, 1995; Poggio *et al.*, 1999).

Aunque los insectos corresponden al grupo de animales más diversos y tienen una gran diversidad de cariotipos que incluye la presencia de diversos números diploides en especies relacionadas, la ausencia o presencia de diferentes sistemas de cromosomas sexuales, la presencia de elementos parasitarios y la aparición de los cromosomas monocéntricos y holocéntricos, los estudios citogenéticos en este grupo son todavía escasos y por mucho tiempo se han concentrado en el análisis clásico, con descripción de las características básicas de los cariotipos. Algunos estudios llevados a cabo en las últimas décadas aplicando FISH en los insectos han contribuido en el análisis de la organización del genoma y la evolución cromosómica. Entre las secuencias repetidas que se han asignado en los cromosomas de los animales, las secuencias más aplicadas en los insectos son las familias multigénicas seguidas por satDNAs y, en menor medida, los transposones y los microsatélites (Cabral de Mello and Martins, 2010). Estos estudios se concentran en los representantes de los órdenes Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Lepidoptera y Orthoptera.

El objetivo del trabajo fue aplicar la hibridación genómica *in situ* (GISH) en *Anastrepha ludens* y *A. serpentina* de laboratorio e identificar similitudes en sus genomas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.3. PREPARACIONES CROMOSÓMICAS

3.3.1. Material Biológico. Se utilizaron larvas en tercer estadio, las cuales fueron obtenidas de colonias que se reprodujeron en condiciones del Laboratorio de Sexado Genético del Programa MOSCAFRUT Metapa de Domínguez, Chiapas.

3.3.2. Preparaciones citológicas. De larvas en tercer estadio se disecó el ganglio cerebral, las preparaciones se realizaron con la técnica en seco (Air-drying), la cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

1) Disección. La larva se introdujo en un recipiente con agua para quitarle exceso de dieta. En un vidrio de reloj se colocó citrato de sodio 1 % (p/v) y se colocó la larva para obtener el ganglio cerebral con agujas y pinzas de disección utilizando un microscopio estereoscópico (Stemi SV6 marca Zeiss).

2) Pretratamiento. Una vez disecado el ganglio cerebral, éste se depositó en citrato de sodio 1 % (p/v), por un lapso de 20-25 min.

3) Fijación. Después se colocó el ganglio en fijador (metanol: ácido acético 3:1 v/v) durante 2-3 min.

4) Maceración. Se colocó el ganglio en ácido acético 60 % y se maceró un poco con una aguja de insulina.

5) Elaboración de preparación. Del macerado realizado se tomó con una micropipeta (Transferpette marca BRAND de 2-20) una gota y se esparció en un portaobjetos limpio, el cual se colocó en la plancha térmica a 40-45 °C para secar la preparación.

6) Observación. La preparación se observó al microscopio (Axioskop 40 marca Zeiss) de contraste de fase para elegir los mejores campos de cada una de las especies en estudio e identificar el sexo.

3.4. EXTRACCIÓN DE ADN

Para la cuantificación de ADN se utilizaron moscas congeladas a -80 °C. En un tubo eppendorf de 1.5 mL, se colocaron cinco moscas y se agregaron 500 µL de DNAzol (Molecular Research Center) en cada uno. Se maceraron, agitaron los tubos y se adicionaron 500 µL de DNAzol.

Se colocaron 0.5 µL de RNAsa y se dejó reposar 10 min. Transcurrido el tiempo se centrifugaron 10 min a 16.1 rpm (velocidad máxima) en una centrífuga (Pendorf de Brinkmann Instrument, Cantiague Road Westbury, N. Y.). El sobrenadante se pasó a un eppendorf de 1.5 mL limpio y se agregaron 500 µL de etanol absoluto frío (almacenado a -20 °C) y se agitaron los eppendorf para después colocarlos a -80 °C por 30 min.

A continuación, los tubos se centrifugaron 10 min a 16.1 rpm, para obtener la pastilla de ADN, enseguida se desechó el etanol 100 % (Sigma). Después se agregaron 500 µL de etanol 70 % frío y se agitaron 10 veces, se centrifugaron 5 min a la misma velocidad y se tiró el etanol 70 %.

Se agregaron 500 µL de etanol 70 % frío y se agitaron los tubos (pastilla se despegó, es muy estable). Los tubos se volvieron a centrifugar 5 min a velocidad máxima. Después se agregaron 1200 µL de etanol 70 % frío y se almacenaron a -20°C.

Posteriormente se corrió un gel de agarosa para verificar la presencia del ADN.

El gel de agarosa se realizó de la siguiente forma:

- 1) Se preparó un gel de agarosa al 0.8 ó 1 %, con un número suficiente de pozos. (dependiendo del número de muestras).
- 2) Se colocó en la cámara de electroforesis y se le agregó Buffer TAE 1X hasta cubrirlo por completo.
- 3) Se preparó una mezcla aparte que consistió en 2 mL de buffer de tinción de carga + 2 mL de muestra (ADN) + 6 mL de TAE y se colocó en los pozos.
- 4) En el primer pozo se colocó una muestra de un marcador de tamaño de 1 Kb (DNA ladder). La misma cantidad que se usó en las muestras (2 mL).
- 5) Se corrió el gel a 110 volts, durante 30 min.
- 6) Se observaron las bandas usando un transiluminador con luz ultravioleta.

3.5. HIBRIDACIÓN GENÓMICA *IN SITU*

Para llevar a cabo la técnica de hibridación genómica *in situ* (GISH) en las moscas en estudio, primero se realizó la preparación de la sonda y posteriormente se llevó a cabo dicha técnica.

3.5.1. PREPARACIÓN DE LA SONDA

Las muestras de ADN se tenían en alcohol 70 %, éste se desechó y se agregaron 500 µL de TE pH 8 (10mM de Tris HCl y 1mM de EDTA, Sigma lab.) (a temperatura ambiente) para disolver la pastilla. Después se cuantificó la cantidad de ADN en el nanodrop.

En un tubo eppendorf se agregaron 28 μL de agua esterilizada en una autoclave y 12 μL de ADN (es el ADN de *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. striata* de hembras y machos) y se centrifugó rápidamente para mezclarlos. Después se colocaron en el multiblok a 95 °C durante 5 min, y posteriormente en hielo el mismo tiempo. A continuación se agregaron 5 μL de buffer 10X M, 2 μL de dNTP mix, 5 μL de hexanucléotidos, 1 μL de rodamina o FITC y 3 μL de enzima klenow (Roche diagnostics GmbH, Roche applied Science Nonnenwald 2 82372 penzberg Alemania). Se centrifugó rápidamente para mezclar todos los reactivos y cada eppendorf se tapó con papel aluminio y se dejaron incubar a 37 °C durante 24 hrs.

Transcurrido ese tiempo se agregaron a cada eppendorf 50 μL de TE, 10 μL de esperma de salmón (Sigma lab), 10 μL de acetato de sodio y 250 μL de etanol 100 % (Laboratorios Merck). Se mezclaron bien y se colocaron a -20 °C por 30 min. Después se centrifugaron durante 10 min a 1400 rpm. Se retiró el sobrenadante y se colocaron los eppendorf en papel adsorbente para secarlos. Enseguida se agregaron 400 μL de etanol 70 % (almacenado a -20 °C) y se centrifugaron durante 10 min a 1400 rpm, se tiró el sobrenadante y se colocaron los eppendorf en papel adsorbente para secarlos. Después se colocaron en la estufa (Dry type bacteriological incubator Blue M de Electric company IL. USA.) a 35 °C durante 30 min, se agregaron 25 μL de TE pH 8, se etiquetaron los eppendorf y se envolvieron en papel aluminio para colocarlos a -20 °C, con lo cual quedó lista la sonda.

3.5.2. TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN GENÓMICA *IN SITU*

Para llevar a cabo la técnica de hibridación *in situ* se deben acondicionar las preparaciones cromosómicas de la siguiente manera:

En una caja copplin se colocaron 50 mL de etanol 70 % y 750 μ L de NaOH 0.15 N, se mezclaron bien y se introdujeron las preparaciones cromosómicas durante 5 min. Después se escurrieron en papel absorbente y posteriormente se hicieron lavados en alcohol de la siguiente forma:

Primero se colocaron en etanol 70 % (almacenado a -20 °C), después en 95 % y finalmente a 100 %, durante 5 min a -20 °C. Se escurrieron las laminillas en papel absorbente y se colocaron en una canastilla para secarlas con un ventilador (mientras se secan las laminillas se preparó la mezcla de hibridación).

3.5.2.1. PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE HIBRIDACIÓN

En un tubo eppendorf se colocaron 5 μ L de formamida, 2 μ L de 50 % dextransulfato (Sigma lab), 1 μ L de 20 X SSC, 2 μ L de sonda y 2 μ L de block (es el ADN de *A. serpentina* de hembras y machos), se mezclaron y colocaron en el multiblok (Lab-line instruments, Helrose Park IL, USA.) a 95 °C durante 5 min y después en hielo 5 min. Se preparó una caja de Petri con papel filtro humedecido con 2XSSC para mantener húmedo el ambiente y evitar que se secan las preparaciones cromosómicas.

Posteriormente se agregaron 10 μ L de la mezcla de hibridación a cada preparación, se colocó un cubreobjetos, se selló con cemento y se colocó en la cámara húmeda para evitar que se deshidratara. Finalmente, se introdujeron a la estufa a 37 °C para hibridar durante toda la noche.

3.5.2.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE MONTAJE

Se sacaron las preparaciones cromosómicas de la estufa, se les quitó el cemento y el cubreobjetos. Las preparaciones se colocaron en una caja copplin con 2X SSC

durante 5 min en oscuridad. Después se escurrieron y secaron bien para colocarles 10 μL de la mezcla vectashield-DAPI (0.25 $\mu\text{g/mL}$; Vector laboratories. 30 Ingold Road. Burlingame, CA, USA) a cada preparación cromosómica.

Enseguida a cada preparación cromosómica se le colocó un cubreobjetos y se le quitó el exceso de mezcla de vectashield-DAPI con un papel absorbente presionando la preparación. Finalmente se revisó en el microscopio de fluorescencia si hubo o no hibridación. En el anexo B se muestran todos los reactivos utilizados en esta técnica de hibridación *in situ*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la técnica de hibridación genómica *in situ* (Heslop-Harrison *et al.*, 1991) por ambos métodos (directo-indirecto), en general esta técnica resulta sumamente complicada y por ello de inicio fue necesario realizar varios y diferentes ajustes. Posteriormente, y ya familiarizada con todos y cada uno de los tratamientos, la técnica se realizó por el método directo resultando claramente observables los cromosomas con DAPI, sin embargo la hibridación de *Anastrepha serpentina* con otra especie de *Anastrepha* no se observó claramente, bajo las temperaturas de hibridación aplicadas. Por lo que se propone realizar otros tratamientos térmicos.

Los resultados que se obtuvieron en las cuatro especies de *Anastrepha* se pueden observar en la Figura 1, donde se observa un esbozo de la hibridación obtenida, sin embargo, no se puede afirmar con precisión si éstos son producto de la hibridación.

Estos son resultados parciales. Los aspectos que limitaron la conclusión del mismo fueron la obtención de preparaciones cromosómicas adecuadas para visualizar claramente los cromosomas e identificar cuáles eran hembras y machos, otra puede ser la extracción del ADN, ya que la mayoría de la extracción se realizó en el Laboratorio

de Sexado Genético, y a pesar de que las muestras se trasladaron en congelación, al momento de utilizarlas fue difícil disolver el botón de ADN, lo cual quizás impidió tener una cantidad suficiente de ADN para la hibridación.

Sí la hibridación fuera evidente se esperaba ver algunas zonas de los cromosomas con una intensidad clara, indicando que esa parte hay similitud en sus genomas.

En la técnica quizás hizo falta ajustar las temperaturas de choque (frío) y la de hibridación (caliente), dado que en los resultados obtenidos únicamente de manera superficial se alcanza a observar un poco de la hibridación que esperábamos encontrar.

Es necesario continuar con este trabajo de investigación citogenética-molecular en las especies de este género, para determinar la presencia o ausencia de la hibridación, en estas moscas y tener elementos probatorios de la similitud de sus genomas.

CONCLUSIÓN

Se logró ver un poco la hibridación en las especies de moscas estudiadas, sin embargo, se necesita seguir trabajando en la técnica de GISH, para obtener con seguridad la hibridación e identificar si existe alguna similitud entre sus genomas.

LITERATURA CITADA

- Benabdelmouna, A., G. Gueritain, M. Abirached-Darmency, and H. Darmency. 2003. Genome discrimination in progeny of interspecific hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus raphanistrum*. *Genome* 46: 469-472.
- Bennett, M. D. 1995. The development and use of genomic *in situ* hybridization (GISH) as a new tool in plant biosystematics. Bransham, P. E., Bennett, M. D. (eds). Kew Chromosome Conference IV, Royal Botanical Gardens, Kew, UK: 167-183.

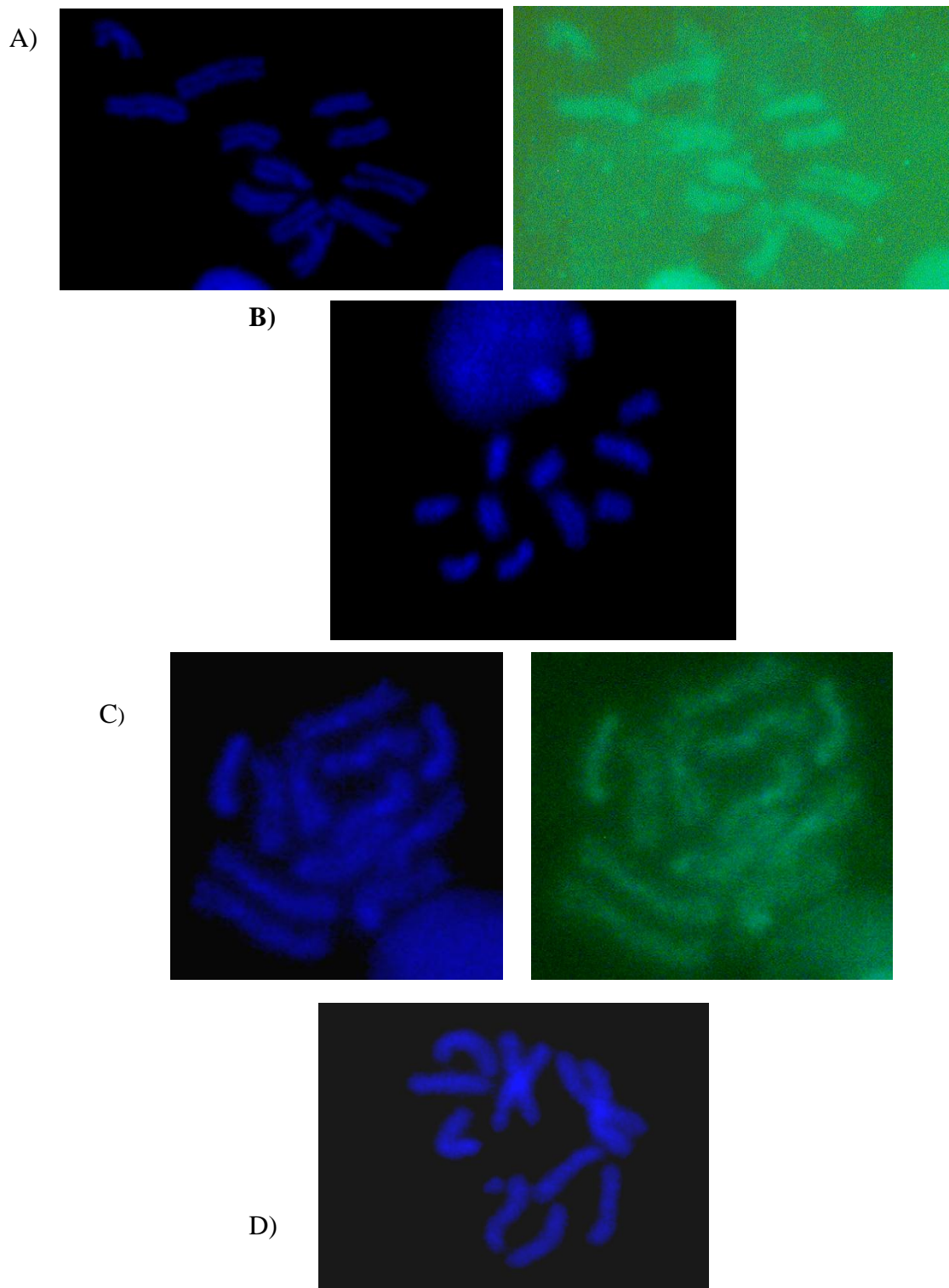


Figura 1. Cromosomas somáticos de A) *A. ludens*, B) *A. obliqua*, C) *A. serpentina* y D) *A. striata*.

- Cabral-de-Mello, D. C., and C. Martins. 2010. Breaking down the genome organization and karyotype differentiation through the epifluorescence microscope lens: insects and fishes as models. *In: Microscopy: Science, Technology, Application and Education*. Formatex Microscopy No. 4, Vol. 1. A. Méndez-Vilas; J. Díaz. (eds.). Formatex Research Center, Badajoz, Spain, pp 658-669.
- Carlson, A. R., J. Letarte, J. Chen, and K. J. Kasha. 2001. Visual screening of microspore-derived transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) with green-fluorescent protein. *Plant Cell Rep* 20: 331-337.
- Cheng, Z., G. Presting, C. Robin Buell, R. A. Wing, and J. Jiang. 2001. High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics* 157: 1749-1757.
- Gall, J. G., and L. Pardue. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 63: 378.
- Heslop-Harrison, J. S. 1992. Book review: electron microscopy of plant cells by Hall and Hawes. *Ann Bot* 70: 388-389.
- Hoopen, R.T., T. P. Robbins, P. F. Fransz, B. M. Montijn, O. Oud, A. G. M. Gerats, and N. Nanninga. 1996. Localization of T-DNA insertions in *Petunia* by fluorescence *in situ* hybridization: physical evidence for suppression of recombination. *Plant Cell* 8: 823-830.
- Jackson, S. A., M. L. Wang, H. M. Goodman and J. Jiang. 1998. Application of fiber FISH in physical mapping of *Arabidopsis thaliana*. *Genome* 41:566-572.
- Jiang, J., and B. S. Gill. 1994. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. *Genome* 37: 717-725.

- Jiang, J., and B. S. Gill. 2006. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057-1068.
- John H. A., M. L. Birnstiel, and K. W. Jones. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223, 582-587.
- Leitch, A. R., T. Schwarzacher, D. Jackson, and I. J. Leitch. 1994. *In situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford. pp. 1-33.
- Schwarzacher, T., and P. Heslop-Harrison. 2000. Practical *in situ* hybridization BIOS Scientific Publishers, Oxford. pp: 203.
- Schwarzacher, T. 2003. DNA, chromosomes, and *in situ* hybridization. *Genome* 46: 953-962.
- Moscone, E. A., M. A. Matzke, and A. J. M. Matzke. 1996. The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105: 231-236.
- Pinkel, D., T. Straume, and J. W. Gray. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *PNAS* 83: 2934-2938.
- Poggio, L., V. Confalonieri, C. Comas, González C., and C. Naranjo. 1999. Genomics affinities of *Zea luxurians*, *Z. diploperennis* and *Z. perennies*: meiotic behavior of their hybrids and genomic "*in situ*" hybridization (GISH). *Genome* 42: 993-1000.
- Salvo-Garrido, H., S. Travell, T. Schwarzacher, W. A. Harwood, and J. W. Snape. 2001. An efficient method for physical mapping of transgenes in barley using *in situ* hybridization. *Genome* 44: 104-110.
- Shigyo, M., T. Wako, A. Kojima, N. Yamauchi, and Y. Tashiro. 2003. Transmission of alien chromosomes from selfed progenies of a complete set of *Allium*

monosomic additions: the development of a reliable method for the maintenance of a monosomic addition set. *Genome* 46:1098-1103.

Wang, C. J., and C. C. Chen. 2005. Cytogenetic mapping in maize. *Cytogenet Genome Reshen* 109: 63-69.

Wei, W. H., W. P. Zhao, Y. C. Song, L. H. Liu, L. Guo, and M. G. Gu. 2003. Genomic *in situ* hybridization analysis for identification of introgressed segments in alloplasmic lines from *Zea mays* × *Zea diploperennis*. *Hereditas* 138: 21-26.

VI. DISCUSIÓN GENERAL

Las especies del género *Anastrepha* (*A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata*) son importantes económicamente en México. Este es el primer trabajo que estudia aspectos genéticos, ya que se ha documentado aspectos ecológicos, de comportamiento, taxonómicos, biogeográficos y biológicos.

La caracterización isoenzimática, mostró diferentes patrones de bandeo e intensidad en cada una de las enzimas estudiada. Se muestra en la comparación realizada entre especies de campo y laboratorio, que las especies de laboratorio fueron más polimórficas que las de campo.

En cuanto al análisis isoenzimático realizado en *Anastrepha ludens* en diferentes estados de México y Guatemala, se observa que existe un flujo genético alto entre los estados, de Michoacán vs Nuevo León (toronja), debido quizás al tráfico de frutas infestadas entre las diferentes localidades. Además cabe mencionar que la capacidad de vuelo de estas plagas debido a la capacidad de vuelo y su gran plasticidad les permite adaptarse a diferentes ambientes, lo que es facilitado por las condiciones climáticas y altitudinales, así como por la alta disponibilidad de hospederos en cada estado.

La cuantificación de ADN nos permitió conocer en *Anastrepha ludens* y *A. serpentina* el contenido genómico de cada especie. Utilizando como testigo eritrocitos de pollo y timocitos de ternera, se observó que *A. ludens* y *A. serpentina* presentaron en ganglios cerebrales 1.59 pg y 4.96 pg, respectivamente, mientras que en las glándulas salivales 1.55 pg y 3.91 pg.

Es conveniente continuar con este trabajo citogenético y genético, tanto a nivel mitótico como meiótico, para conocer con detalle el número básico de las especies y la forma de los cromosomas lo cual es de interés cuando se quieran realizar trabajos moleculares.

Los estudios genéticos realizados en este estudio, como fueron la caracterización isoenzimática, el contenido de ADN y la hibridación *in situ* de las cuatro especies de *Anastrepha* permiten conocer más información de cada una de las especies y que será de utilidad en el control de esta plaga.

Dichos estudios se podrán utilizar en aspectos relacionados con la Técnica del Insecto Estéril, por ejemplo, para detectar posibles cambios en las moscas de laboratorio cuando se introducen insectos de campo para mantener la heterogeneidad en la población.

Además de los descriptores morfológicos utilizados para describir cada una de las especies de moscas, los estudios isoenzimáticos, podrían conformar algún patrón electroforético para cada una de las enzimas utilizadas en su momento, que quizás serviría para poder diferenciarlas entre ellas.

VII. CONCLUSIONES GENERALES

A. obliqua, *A. serpentina* y *A. striata* de laboratorio presentaron mayor polimorfismo, en comparación con las de campo.

No hubo diferencias significativas en ambos sexos, excepto en los locus 6PGDH-2, IDH y ME.

En la actividad enzimática promedio (laboratorio, campo y sexo), hubo diferencias entre 6PGDH e IDH.

A. ludens presentó polimorfismo en las localidades en estudio. El flujo genético es facilitado a su vez por la alta disponibilidad de hospederos en la zona de estudio.

El contenido de ADN, obtenido por medio de citometría de flujo, en *A. serpentina*, tanto en ganglios cerebrales como en glándulas salivales fue mayor en comparación con *A. ludens*. Ambas especies presentaron un número cromosómico de $2n = 12$.

Se logró ver un poco la hibridación en las especies de moscas estudiadas, sin embargo, se necesita seguir trabajando en la técnica de GISH, para obtener con seguridad la hibridación y poder ver si existe alguna similitud entre sus genomas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 155-178.
- Aluja, M., and R. L. Mangan. 2008. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. *Annu. Rev. Entomol.* 53: 473-502.
- Carreón, Z. M. A. 2000. Organización de los productores en campañas contra las moscas de la fruta. En: *Memorias del XIII Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta*. Centro Internacional de Capacitación en Moscas de la Fruta. Complejo Bioindustrial MOSCAMED-MOSCAFRUT SAGAR-CONASAG-DGSV. Metapa de Domínguez, Chipas, México. pp: 27-30.
- Hernández-Ortiz, V. 2007. Diversidad y Biogeografía del género *Anastrepha* en México. En: V. Hernández-Ortiz (ed.). *Moscas de la Fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, biología y manejo*. S y G editores, D. F. México. pp: 53-76.
- Hernández-Ortiz V. 2008. Estado actual de la taxonomía del género *Anastrepha* Schiner, pp: 23-27. En: *Memorias 7ª Reunión del Grupo de Trabajo en Moscas de la Fruta del Hemisferio Occidental*. SAGARPA, SENASICA, México.
- Norrbom, A. L., L. E. Carroll, F. C. Thompson, I. M. White, and A. Freidberg. 1998. Systematic databases of names. *In*: F. C. Thompson (ed), *Fruit fly expert identification system and systematic information database*. Backhuys Publ., Leiden, Netherlands, pp. 65-251.
- Norrbom, A. L., R. A Zucchi, and V. Hernández-Ortiz. 1999. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology.

- In: Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior.* Aluja M., and A. L. Norrbom (eds). CRC Press, Boca Raton, pp: 299-342.
- Núñez B, L. 2000. Las Moscas de las Frutas: Importancia económica, aspectos taxonómicos, distribución mundial de los géneros de importancia económica. <http://www.pronatta.gov.com> (Consultado: febrero, 2008).
- Selivon, D., A. L. P. Perondini, and L. S. Rocha. 2005. Karyotype characterization of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Neotrop. Entomol.* 34: 273-279.
- Selivon, D., A. L. P. Perondini, and J. S. Morgante. 2005a. A genetic- morphological characterization of two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Ann Entomol Soc Amer* 98:367-381.
- Selivon, D., A. L. P. Perondini, and L. S. Rocha. 2005b. The mitotic chromosomes of eight species of *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae). *Neotrop Entomol* 34:273-279.
- Smith-Caldas, M. R. B., B. A. McPheron, J. G. Silva, and R. A. Zucchi. 2001. Phylogenetic relationships among species of the *fraterculus* group (*Anastrepha*: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. *Neotropical Entomol* 30: 565-573.

IX. ANEXOS

ANEXO A

Procedimientos para los seis sistemas enzimáticos estandarizados utilizados en las cuatro especies de moscas de la fruta en estudio.

6PGDH (6-Phosphogluconato Deshidrogenasa)

0.6 mL Tris HCl, pH 8

1.5 mL NADP (β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)

10 gotas de 6-Phosphogluconic acid

10 gotas $MgCl_2$

7 gotas de MTT (Thiazolyl blue)

7 gotas de PMS (Phenazine Methosulfate)

2 mL de una mezcla de agar y agua destilada

IDH (Isocitrato Deshidrogenasa)

1 mL Tris HCl, pH 7

1.5 mL NADP

20 gotas DL-Isocitric acid

10 gotas $MgCl_2$

7 gotas MTT

7 gotas PMS

2 mL de una mezcla de agar y agua destilada

ME (Enzima Mállica)

0.6 mL Tris HCl, pH 8

1.5 mL NADP

14 gotas de Sustrato mállico

4 gotas de MgCl₂

6 gotas de MTT 6 gotas de PMS

2 mL de una mezcla de agar y agua destilada

GPI (Glucosa-6-Fosfato Isomerasa)

1 mL Tris HCl, pH 8

1.5 mL NAD (β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide)

5 gotas Fructose-6-phosphate

5 gotas MTT

5 gotas PMS

8 uL G6PDH

2 mL de una mezcla de agar y agua destilada

MDH (Malato Deshidrogenasa)

1 mL Tris HCl, pH 8

1.5 mL NAD

14 gotas Sustrato mállico

7 gotas MTT

7 gotas PMS

2 mL de una mezcla de agar y agua destilada

GOT (Glutamato Oxaloacetato Tansaminasa)

4 mL de Solución #1 de GOT

9 gotas Fast Blue BB (solución saturada)

2 mL de una mezcla de agar y agua destilada

La solución #1de GOT se prepara con los siguientes reactivos: 20 mL de sodium phosphate 0.1 M (pH 7), 2 mg de pyridoxal-5-phosphate, 92 mg de L-aspartic acid, 52 mg de ketoglutanic acid, esto se debe mezclar bien y ajustar a pH 7.

ANEXO B

Reactivos utilizados para llevar a cabo la hibridación genómica *in situ*:

- TE pH 8
- Buffer 10 X M
- dNTP mix *
- Hexanucléotidos*
- Rodamina- FITC*
- Enzima klenow*
- Esperma de salmón*
- Acetato de sodio
- Etanol 100 %
- Etanol 70 % 50 ml: 50 mL----- 100 %

X ----- 70 % X= 35 mL de etanol y 15 mL de
agua
- Formamida
- 50 % dextransulfate: Viene en polvo, pesar y disolver en agua destilada
(calentar a 70 ° C para disolver).
- 20X SSC (Solución salina) Para un litro: Se pesan 88.22 g de citrato de sodio
y 175.32 g de cloruro de sodio y se disuelven en agua destilada.
- NaOH 0.15 N
- Etanol 95 %
- 2 X SSC. Se toman 100 mL de 20 X SSC y 900 mL de agua para un litro
- Vectashield-DAPI 300 µL de vectashield y 10 µL de de DAPI → 0.25 µg/ mL

Hielo

Aire comprimido

Cemento

*Estos reactivos se utilizan sin modificación.