

Variabilidad genética aloenzimática en *Dacus oleae* (Gmelin). (*Diptera: Tephritidae*). I. Análisis de dos poblaciones naturales del Sureste Español

M.^a D. OCHANDO, C. CALLEJAS, O. H. FERNÁNDEZ y A. REYES

En la mosca del olivo *Dacus oleae* se ha analizado la variabilidad genética en 12 loci enzimáticos, mediante electroforesis en gel de almidón. Fueron estudiadas dos poblaciones naturales procedentes del Sureste español.

Las poblaciones mostraron un alto nivel de variación genética. La heterocigosidad promedio fue 0,1339. La proporción de loci polimorficos fue 0,7725 ó 0,9545 (según el criterio del 95 % y del 99 %, respectivamente). Y el número medio de alelos por locus fue 2,6818.

Con respecto al patrón presentado por la variabilidad, la característica más remarkable fue la semejanza de la configuración de las frecuencias alélicas en ambas poblaciones.

Nuestras observaciones apoyan la conclusión de que la selección es muy probablemente el factor responsable de la variación observada en *Dacus oleae*.

M.^a D. OCHANDO, C. CALLEJAS, O. H. FERNÁNDEZ y A. REYES. Departamento de Genética, Facultad de C.C. Biológicas, Universidad Complutense. 28040, Madrid.

Palabras clave: *Dacus oleae*, electroforesis, variabilidad genética.

INTRODUCCION

El avance en las técnicas moleculares ha sido espectacular en los últimos 20 años y los genéticos evolutivos han sabido aprovechar bien estas herramientas. Los conocimientos acumulados sobre la estructura de las poblaciones y los procesos evolutivos que actúan sobre las mismas hoy son extraordinariamente amplios. No obstante, las especies de interés agronómico no se han utilizado, en términos generales, como material de estudio por parte de estos especialistas. Por otro lado, los biólogos aplicados, en su interés por aquellas especies que constituyen plagas en nuestra agricultura y bosques, no han sido conscientes de la relevancia que la biología evolutiva podía tener en relación con los problemas del control de esas espe-

cies. Sólo recientemente unos y otros han inferido el especial interés del estudio a nivel poblacional y con metodologías moleculares de las especies nocivas (MENKEN y ULENBERG, 1987; LOXDALE y HOLLANDER, 1989).

Entre las diversas actuales técnicas moleculares, la de electroforesis en gel es, posiblemente, la más antigua, la más sencilla y la más ampliamente utilizada. Desde su aplicación por primera vez a estudios poblacionales (HARRIS, 1966; HUBBY y LEWONTIN, 1966), ha proporcionado ingente información sobre las más diversas especies y se ha puesto de manifiesto la utilidad de su aplicación en la obtención de información básica, no solo sobre la estructura poblacional, sino que ha permitido la extracción de consecuencias sobre la dinámica de poblaciones.

Actualmente, la utilización de métodos electroforéticos en entomología agrícola, está permitiendo una nueva aproximación a cuestiones claves en la biología aplicada. Los caracteres bioquímicos (aloenzimáticos) han demostrado su utilidad en la resolución de problemas asociados con aspectos tales como la identificación de especies y razas-hospedador, la monitorización 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, etc... (MENKEN y ULENBERG, 1987; LOXDALE y HOLLANDER, 1989). La información básica sobre la variabilidad genética (estructura) de las poblaciones de especies que constituyen plagas en nuestra agricultura, permite, además, la inferencia de conocimientos sobre su dinámica, fundamentalmente en aspectos tales como la demografía (crecimiento, cuellos de botella...) y dispersión (flujo génico, efecto fundador, migración pasiva...), de primordial importancia en la lucha contra las especies nocivas.

Por otro lado, a pesar de ser España un país de enormes extensiones olivereras y sufrir la acción de *Dacus oleae* como una importante plaga, no existe ningún estudio genético específico de las poblaciones de este insecto en nuestro país (aunque hay una cita aislada, en la bibliografía, de una población madrileña, TSAKAS y ZOUROS, 1980) y son muy escasos en otros (ZOUROS y KRIMBAS, 1969; BUSH y KITTO, 1979; LOUKAS *et al.*, 1985; ZOUROS y LOUKAS, 1989; LOUKAS, 1989).

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, hemos iniciado una línea de trabajo con la finalidad de conocer la estructura básica, a nivel de variabilidad genética, de las poblaciones españolas de *Dacus oleae*. En el presente trabajo (que constituye un estudio preliminar), se ha estudiado la variabilidad genética aloenzimática en 12 loci, en dos poblaciones malagueñas de *Dacus oleae* aplicando técnicas de electroforesis en gel de almidón.

MATERIAL Y METODOS

Se han estudiado dos poblaciones naturales de *Dacus oleae* procedentes del Sureste español, concretamente de la localidad malagueña de Atajate, a las que hemos designado *Pilarejos* y *Tomillito*.

Se obtuvieron las moscas salvajes de estas poblaciones recogiendo frutos (aceitunas) infestados, en el mes de noviembre, y llevándolos al laboratorio, donde se dejaban desarrollar las larvas en cámaras climáticas. Tras la pupación, emergían los adultos, que se recogían y congelaban a -20° C hasta su utilización. Las moscas analizadas fueron las obtenidas directamente de los frutos.

Aplicamos técnicas de electroforesis horizontal en gel de almidón de acuerdo con los procedimientos descritos por AYALA *et al.* (1972) con ligeras modificaciones. Se utilizó siempre el mismo sistema de taponnes: gel, 76mM Tris-5mM Acido cítrico pH = 8,65 y 300mM Acido bórico-60 mM Hidróxido sódico pH = 8,1 para el electrodo (POULIK, 1957; AYALA, 1972).

Los loci estudiados codifican para las siguientes enzimas: dos loci de estererasas (*Est*₁ y *Est*₂), dos loci de hexoquinasas (*Hk*₁ y *Hk*₂), y un locus para cada una de las siguientes enzimas: aldehído oxidasa (*Aox*), fosfatasa alcalina (*Aph*), α -glicerofosfato deshidrogenasa (α -*Gpdh*), leucinaminopeptidasa (*Lap*), málico deshidrogenasa (*Mdh*), enzima málico (*Me*), fructoquinasa (*Fk*) y fosfoglucomutasa (*Pgm*). Como control en los geles se utilizó una cepa monomórfica de *Drosophila melanogaster* (X₉_{SOD}, proporcionada por el Dr. Ayala). Cepa que se tomó como referencia «100» para la designación de alelos. En el caso del locus *Fk* no poseemos control de referencia, por lo que hemos designado como «100» al alelo más frecuente.

El tamaño muestral, fue superior a 50, en la mayoría de los casos, o incluso próximo o mayor de 100. En dos casos, sólo fue posible obtener información para una población (*Lap* sólo en *Tomillito* y *Hk*₂ sólo en *Pilarejos*) y en tres casos el tamaño muestral fue

inferior a 30 individuos (*Hk*₂ y *α-Gpdh* en *Pilarejos* y *Fk* en *Tomillito*).

RESULTADOS

De los doce loci analizados, tres o cuatro de ellos lo son por primera vez en esta especie: *α-Gpdh*, un locus de *Hk*, *Fk* y no sabemos si el locus *Mdh* que hemos analizado coincide con el analizado por otros autores. Los patrones de bandas muestran que la enzima codificada por *Mdh* es monomérica, y la codificada por *α-Gpdh* es dímera. Debemos, también, llamar la atención sobre el locus *Aph*, que presenta la característica de aparición de tres bandas en el caso de los homocigotos, posiblemente como consecuencia de alguna modificación postranscripcional; por esta razón, los alelos son designados como 1 y 2, sin referencia al control.

En el Cuadro 1 se presenta la variabilidad encontrada para los 12 loci estudiados en las dos poblaciones analizadas. Para cada locus el Cuadro 1 muestra las frecuencias alélicas, la proporción de individuos heterocigotos observados y los esperados (cuando el cálculo era estadísticamente posible) de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg y el número de individuos analizados. Podemos advertir en el mencionado cuadro que existen dos clases de loci, los claramente polimórficos en ambas poblaciones, en los que se presentan al menos dos alelos en una cierta frecuencia y aquellos otros «casi» monomórficos con un alelo en muy alta frecuencia y algún otro alelo raro, o que son polimórficos solo con el criterio más distendido (del 99 %). Como puede observarse, siempre es el mismo alelo, en ambas poblaciones, el que representa la máxima frecuencia. Sin embargo, también se detecta cierta heterogeneidad en las frecuencias, es decir, diferencias locales cuantitativas, muy evidentes en el caso de los loci *Est*₂, *α-Gpdh* y *Mdh*.

También en el Cuadro 1 se presentan las frecuencias de heterocigotos observados, así como los esperados (cuando los datos han permitido la aplicación estadística) bajo la

asunción de equilibrio de Hardy-Weinberg. El ajuste a las frecuencias de equilibrio sólo se da en el locus *Pgm* en ambas poblaciones y en el locus *Aox* para la población *Pilarejos*. En todos los casos, el alejamiento de las frecuencias de equilibrio es debido a un defecto de heterocigotos.

El Cuadro 2 muestra los tres estadísticos usuales en la cuantificación de la variabilidad genética: Heterocigosidad (H), frecuencia media de individuos heterocigotos; Polimorfismo (P), proporción de loci polimórficos y Número medio de alelos por locus (n). En el caso del Polimorfismo, se han utilizado los dos criterios, del 95 % (en que un locus se considera polimórfico cuando la frecuencia de su alelo más frecuente no es superior a 0,95) y del 99 % (en que se considera polimórfico un locus cuando la frecuencia del alelo más frecuente no es superior a 0,99). La media de Heterocigosidad, considerando ambas poblaciones, es de 0,13215; el número medio de alelos por locus es 2,6218, y la proporción de loci polimórficos es del 77,27 % ó 95,45 %, respectivamente, según el criterio del 95 % y del 99 %. Ambas poblaciones presentan valores algo diferentes para los tres parámetros, la de *Pilarejos* es ligeramente más variable.

También hemos calculado la Identidad y Distancia genética entre ambas poblaciones (NEI, 1972, 1978) que nos dan unos valores de 0,9679 y 0,0326 ± 0,0576, respectivamente.

DISCUSION

La mosca de la aceituna, *Dacus oleae* es una de las varias especies de Tephritidae de enorme importancia agroeconómica. El presente trabajo constituye uno de los pocos, a nivel poblacional, sobre la variabilidad aloenzimática en *D. oleae* (BUSH y KITTO, 1979; TSAKAS y ZOUROS, 1980; LOUKAS *et al.*, 1985; ZOUROS y LOUKAS, 1989; LOUKAS, 1989). Con ello pretendemos una primera aproximación a varias cuestiones importantes y básicas relacionadas con la estructura genética de las poblaciones de *D. oleae*. En primer

lugar, definir la cantidad de variación genética presente en las mencionadas poblaciones; en segundo lugar, tratar de conocer los patrones de dicha variabilidad, y en tercer lugar, aproximarnos al conocimiento de los posibles procesos implicados en su mantenimiento.

Cantidad de variabilidad

Los resultados de nuestro estudio sobre la variabilidad aloenzimática en dos poblaciones naturales de *D. oleae* se presentan en el Cuadro 1. El Cuadro 2 resume los valores

Cuadro 1.—Frecuencias alélicas, número de heterocigotos observados (Ho), heterocigotos esperados en condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg (He) y número de individuos analizados en 12 loci aloenzimáticos en dos poblaciones españolas de *Dacus oleae*

Locus	Alelo	Poblaciones	
		Pilarejos	Tomillito
<i>Aox</i>	98	0,1610	0,0444
	99	0,4491	0,5611
	101	0,3136	0,3167
	102	0,0763	0,0778
	Ho	38	69***
	He	39,42	51,91
	N	59	90
<i>Aph</i>	1	0,2323	0,3131
	2	0,7677	0,6869
	Ho	2***	2***
	He	37,26	44,52
	N	99	99
<i>Est₁</i>	103	0,0484	0
	105	0,2581	0,2097
	107	0,6935	0,7742
	109	0	0,0161
	Ho	4***	2***
	He	13,95	11,33
	N	31	31
<i>Est₂</i>	100	0,4071	0,1726
	102	0,5857	0,8274
	104	0,0072	0
	Ho	18***	11***
	He	34,38	23,99
	N	70	84
<i>Fk</i>	99	0,0196	0
	100	0,9804	1
	Ho	0	0
	He	1,55	0
	N	51	14
α Gpdh	F	0,9167	0,7027
	S	0,0833	0,2973
	Ho	3	6***
	He	2,75	15,46
	N	18	37

Locus	Alelo	Poblaciones	
		Pilarejos	Tomillito
<i>Hk₁</i>	101	0,0299	0,0172
	102	0,9701	0,9828
	Ho	0	0
	He	3,87	1,96
	N	67	58
<i>Hk₂</i>	85	0,0556	—
	86	0,9444	—
	Ho	0	—
	He	1,89	—
	N	18	—
<i>Lap</i>	105	—	0,0312
	106	—	0,9688
	Ho	—	0
	He	—	1,93
	N	—	32
<i>Mdh</i>	98	0,0410	0
	100	0,4016	0,1078
	102	0,5574	0,8922
	Ho	5***	3***
	He	32,10	22,31
N	61	116	
<i>Me</i>	99	0	0,0090
	101	0,0455	0,0631
	102	0,8939	0,9189
	103	0,0606	0,0090
	Ho	0***	0***
	He	12,88	16,81
N	66	111	
<i>Pgm</i>	103	0	0,0053
	105	0,0185	0,0106
	107	0,8889	0,8617
	109	0,0926	0,1224
	Ho	12	24
	He	10,85	22,78
N	54	94	

(* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Cuadro 2.-Parámetros de variabilidad genética en dos poblaciones de *Dacus oleae*

Poblaciones	H	n	P	
			95 %	99 %
Pillarejos	0,1383	2,7273	0,8182	1,0000
Tomillito	0,1278	2,6364	0,7273	0,9091
\bar{x}	0,13215	2,6218	0,7727	0,9545

H = Heterocigosidad.

n = Número medio de alelos por locus.

P = Polimorfismo, para el criterio del 95 % y para el criterio del 99 %.

de los tres clásicos estadísticos usados en esta clase de trabajos.

Aunque sólo se han estudiado 12 loci, podemos considerar que estos constituyen una muestra al azar del genoma de *D. oleae*. SINGH y RHOMBERG (1987) recogen gran cantidad de datos sobre la variabilidad aloenzimática en diversas especies y concluyen que, a grandes rasgos, doblando el número de loci estudiados no se observan efectos significativos sobre la proporción de loci polimórficos o sobre la media de heterocigosidad (aunque ellos se refieren a números más altos de loci). Sin embargo, tomando esto en consideración y el hecho de que en la mayoría de los casos hemos utilizado un amplio tamaño muestral, creemos que nuestros datos pueden ser representativos de la variación real existente en las poblaciones de *D. oleae*.

La característica más destacable de los Cuadros 1 y 2 es la alta variabilidad genética observada, fundamentalmente en lo referente a polimorfismo y número de alelos por locus (Cuadro 2). Observación especialmente notable si tenemos en cuenta que *D. oleae* es una especie absolutamente monófaga, totalmente dependiente del fruto del olivo.

Según algunos autores (POWELL 1971; LEVINTON 1973; GILLESPIE y LANGLEY 1974; YONG 1992) debería esperarse una correlación positiva entre la cantidad de variación genética presente en una especie y el grado de su diversidad ambiental. Sin embargo, la comparación de los niveles de variabilidad genética presentes en nuestras po-

blaciones de moscas del olivo, especie completamente monófaga, con los presentes en otras especies de moscas de las frutas (de Dípteros, de Tephritidae) nos evidencia que la variación genética en *D. oleae* no sigue estas expectativas. Así, los datos disponibles sobre *Ceratitidis capitata* (HUETTEL *et al.*, 1980; LOUKAS 1989; MALACRIDA *et al.*, 1992; REYES y OCHANDO, en prensa), una especie extremadamente polífaga, evidencian unos valores de heterocigosidad, polimorfismo y alelos por locus, en general bastante más bajos que los obtenidos por nosotros para *Dacus oleae*. En concreto, datos propios (REYES y OCHANDO, en prensa) sobre 3 poblaciones españolas de *C. capitata*, mostraban valores de heterocigosidad de 0,055, de polimorfismo de 29 % ó 56 % (según el criterio de polimorfismo utilizado, 95 % ó 99 % respectivamente), y de alelos por locus de 1,95. Todos ellos, valores por debajo de los obtenidos para *D. oleae*. Podría objetarse, quizá, que *C. capitata* constituye un caso excepcional en ambos sentidos: como ampliamente polífaga y como estrechamente variable. Sin embargo, la comparación de nuestros datos con los de otras diferentes especies de Tephritidae, de nuevo viene a apoyar la idea del alto grado de variación mostrado por las poblaciones analizadas. Así, *Anastrepha fraterculus* presenta un valor de heterocigosidad de 0,05 (MALAVASI y MORGANTE, 1983). BERLOCHER y BUSH (1982) en su completa filogenia del género *Rhagoletis*, incluyen apéndices con frecuencias alélicas de varios loci, y aún

cuando no dan datos directos sobre heterocigosidad, número de alelos por locus y polimorfismo, parece deducirse de la información proporcionada, un más bajo nivel de variabilidad para las especies de *Rhagoletis* que el que nosotros encontramos en *Dacus*. En el caso de *R. pomonella* los trabajos de MCPHERON y cols. (1988) incluyen los 3 estadísticos con valores promedio de $H = 0,095 - 0,189$, $P = 23,5 - 58,8 \%$ y $n = 1,5 - 2,8$, según el área geográfica de procedencia de las poblaciones.

La comparación con otras especies de *Dacus*, como *D. umbrosus* y *D. albistrigata*, ambas con un rango hospedador, aunque restringido, superior al de *D. oleae*, muestra también un más alto grado de variabilidad en nuestra especie. Así, para *D. umbrosus* los valores de heterocigosidad varían entre 0 y 0,05, y los de loci polimórficos entre 0 y 0,17 (YONG, 1988) y en el caso de *Dacus* (o *Bactrocera*) *albistrigata* esos valores son de $H = 0,02 - 0,04$ y $P = 0,06 - 0,17$ (YONG, 1990). Incluso en el caso de *D. cucurbitae*, que cubre un amplio rango de hospedadores y cuyo grado de variación es superior, sus valores oscilan en el caso de H entre $0,09 - 0,23$, y en el de P entre $0,21 - 0,57$.

En concreto, los valores obtenidos por nosotros ($H = 0,13215$, $n = 2,6218$, $P = 0,7727 - 0,9545$, según el criterio utilizado) son superiores a los observados en otras especies de Tephritidae, incluso superiores a los de especies con amplio rango de hospedadores. Y casi duplican la estima de heterocigosidad para insectos en general, que se calcula en 0,074 (NEVO, 1978), o para el género *Drosophila* en particular que se estima en 0,06 (SINGH y RHOMBERG, 1987).

¿Son estos altos valores típicos de la especie o constituyen nuestras poblaciones un caso excepcional? Desafortunadamente no disponemos de muchos datos sobre la variabilidad genética de poblaciones naturales de *D. oleae*. Sólo se encuentran en la bibliografía especializada tres trabajos que podríamos considerar «poblacionales», en los que se hayan estudiado al menos dos poblacio-

nes o varios loci (aparte de los recopilaciones de LOUKAS, 1989 y ZOUROS y LOUKAS, 1989). BUSH y KITTO (1979) analizan dos poblaciones griegas y 23 loci, sólo dan valores de polimorfismo que son más bajos que los nuestros (48 %). TSAKAS y ZOUROS (1980) analizan 12 poblaciones, incluyendo cinco no griegas, una de ellas española, pero sus datos se refieren sólo a esterasas (A y B), con lo que los cálculos tienen un valor muy limitado, e incluso los autores no utilizan los estadísticos habituales. LOUKAS y colaboradores (1985) incluyen en el análisis 10 loci, pero sólo una población griega. También su valor es limitado (en la generación 0, $H = 0,247$ y $n = 3,2$). En definitiva, los valores promedios que da LOUKAS (1989) en su recopilación, son $n = 3,467$ y $H = 0,188$, valores que quedan reducidos a $n = 2,538$ y $H = 0,153$, si eliminamos la sesgadamente alta información obtenida para los loci *Est-A* y *Est-B*. (El autor no da información sobre polimorfismo). Estos valores son claramente similares a los obtenidos por nosotros en las analizadas poblaciones malagueñas.

Por tanto, la alta tasa de variabilidad genética observada parece ser típica de la especie, no representando nuestras poblaciones un caso excepcional al respecto. Aún cuando esta afirmación debe ser matizada considerando la escasa información disponible y lo limitado del área biogeográfica analizada (fundamentalmente poblaciones griegas).

Así pues, la hipótesis apuntada sobre la posible correlación entre grado de variabilidad genética en una especie y grado de diversidad ambiental, claramente no se cumple en nuestra estricta monófaga *D. oleae*. Habrá que buscar otras explicaciones a la elevada variación genética observada, pero para ello necesitamos información a todo lo largo del rango de distribución de la especie.

Patrones de variabilidad

Por otra parte, el análisis de los patrones seguidos por la variabilidad encontrada,

tanto respecto a los loci, como a las poblaciones, nos permite la discusión de los posibles procesos implicados en el mantenimiento de esa variación genética.

Que algunos loci son más variables que otros era algo esperable. Sin embargo lo que resulta llamativo es que todos los loci son extraordinariamente semejantes en su patrón de variación (Cuadro 1). Básicamente podemos establecer las siguientes generalizaciones:

1. En todos los loci, el mismo concreto alelo es el más común (o el único en el caso de la *Fk* en la población *Tomillito*) y el mismo específico alelo es el segundo más común (o el único segundo, excepto en el caso *Me*) en ambas poblaciones. También coinciden ambas poblaciones con respecto a las combinaciones genotípicas, siendo el genotipo más común el mismo en las dos poblaciones.

2. A pesar de lo expuesto en el párrafo anterior, las frecuencias génicas no son uniformes en ambas poblaciones. Hay diferenciación «geográfica», existen diferencias cuantitativas en las distribuciones de las frecuencias génicas especialmente en los loci *Est₂*, *α-Gpdh* y *Mdh*. Es más, los valores de Identidad genética ($I = 0,9679$) y de Distancia Genética ($D = 0,0326 \pm 0,0576$) entre ambas poblaciones son muy llamativos, por extremos, entre poblaciones tan extraordinariamente próximas, indicando una alta diferenciación intraespecífica (AYALA y TRACEY, 1974; BERLOCHER y BUSH, 1982).

3. Las frecuencias observadas de heterocigotos no se ajustan a las frecuencias esperadas en situación de equilibrio de Hardy-Weinberg con solo dos excepciones (en el caso del locus *Aox* en la población *Pilarejos* y en el caso del locus *Pgm* en ambas poblaciones).

Algunos autores opinan que la mayor parte de la variabilidad genética existente en las poblaciones naturales, y especialmente la observada a nivel molecular, es adaptativamente neutra (KING y JUKES, 1963; KIMURA, 1983; NEI y KOEHN, 1983). Las frecuencias de los alelos neutros no estarían

gobernadas por la selección natural sino por un proceso de azar debido a los errores de muestreo que se dan en cada generación en toda población de tamaño finito. Si la Teoría Neutralista está en lo cierto y las frecuencias alélicas son el resultado de errores de muestreo, tales frecuencias deberían presentarse en las diferentes poblaciones en forma absolutamente no correlacionada. Es decir, en distintas poblaciones deberíamos encontrar distintos alelos, o los deberíamos encontrar en frecuencias sin correlación alguna. Nuestros resultados marcan un claro contraste con los esperados según los neutralistas.

Como vemos en el Cuadro 1, en todos y cada uno de los loci estudiados existe una marcada similitud en la configuración de las frecuencias alélicas en las dos poblaciones estudiadas. En los 10 loci de los que se dispone de información para ambas poblaciones, el mismo alelo es el más frecuente y el mismo alelo es el segundo más frecuente (excepto en *Me*). Y aunque los datos se refieren a solo dos poblaciones, debemos remarcar que la similitud se da en los 10 loci.

Podría alegarse que si se da cierta cantidad de migración entre nuestras poblaciones, estas poblaciones locales podrían representar muestras de una única más amplia población. En este caso, las frecuencias serían similares al actuar los migrantes como «uniformizadores» genéticos entre ambas poblaciones. Considerando que las poblaciones analizadas provienen de dos fincas que distan únicamente dos kilómetros entre sí, la existencia de migración no es sólo posible, sino muy probable.

Pero también en este caso encontramos una seria dificultad para explicar satisfactoriamente nuestros resultados: a pesar de la similitud general entre ambas poblaciones, existe una clara diferenciación geográfica especialmente en varios loci: *Est₂*, *α-Gpdh* y *Mdh*. Las diferencias cuantitativas en las frecuencias génicas de ambas poblaciones son superiores al 20 % para los dos primeros loci y al 30 % para *Mdh*.

Otra característica destacable en nuestros resultados es la presencia generalizada de alelos raros. Si consideramos la distribución de las frecuencias alélicas de los distintos loci (Cuadro 1) conjuntamente, observamos que la clase más frecuente corresponde al grupo de alelos con frecuencias inferiores a 0,05. Y el número medio de alelos por locus en nuestras poblaciones (2,7273 y 2,6364) ya hemos dicho que puede considerarse alto. Estos resultados son propios de poblaciones de tamaño grande, puesto que los cuellos de botella afectan profundamente al número de alelos (NEI *et al.*, 1975).

Una última interesante característica a destacar en nuestros resultados es la deficiencia de heterocigotos con respecto a una situación de equilibrio de Hardy-Weinberg (Cuadro 1). Como hemos comentado con anterioridad, en todos aquellos casos en que el valor de los datos permitía el cálculo estadístico, se ha observado un desajuste con respecto a la situación de equilibrio de Hardy-Weinberg (con dos excepciones: *Pgm* en ambas poblaciones y *Aox* en *Pilarejos*) debida, en todos los casos, a un defecto de heterocigotos.

¿Cuál puede ser la causa de este defecto de heterocigotos?, debemos, en primer lugar, eliminar la posibilidad de que ese defecto se deba a una deficiente resolución de la técnica electroforética empleada. La metodología, tampones y tinciones utilizadas han sido ya contrastadas en múltiples especies de Dípteros, lo que permite un alto grado de fiabilidad. Podríamos pensar, no obstante, que, en nuestro caso, aloenzimas con capacidad migratoria semejante se visualizarían tan próximas que sería imposible diferenciar la presencia de una sola banda de la de dos bandas muy próximas, y por tanto, podrían cuantificarse como homocigotos casos de heterocigotos. Esta dificultad podría aplicarse, quizás, al caso de la *Me*, pero en todos los demás loci, donde existen al menos dos alelos con una cierta frecuencia, se pueden distinguir heterocigotos. Por tanto, en términos generales, podemos aceptar la fiabilidad técnica, lo que obliga a bus-

car otras explicaciones al defecto de heterocigotos detectado.

Si las poblaciones hubiesen pasado recientemente por un cuello de botella, aun cuando en el momento de la colección ya se hubiese restaurado un amplio tamaño poblacional, y se hubiesen «recuperado» un alto número de alelos por locus; la heterocigosidad, que se ve afectada y reducida por los cuellos de botella, se recupera más lentamente que el número de alelos por locus al restablecerse los tamaños poblacionales amplios (NEI *et al.*, 1975). En nuestro caso, las colecciones se realizaron en noviembre, momento en el que, según el ciclo habitual de *Dacus oleae* en nuestras latitudes, han pasado varias generaciones de expansión poblacional tras el cuello de botella invernal. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de un tratamiento químico en la zona poco antes de las colectas, que hubiera provocado un cuello de botella reciente. Desafortunadamente, no poseemos datos al respecto.

Otra posibilidad para explicar la escasez de heterocigotos es el Efecto Wahlund. Se considera que el Efecto Wahlund de defecto de heterocigotos es provocado por la consideración conjunta, en una única unidad poblacional, de dos subpoblaciones, de dos muestras heterogéneas entre las que no hay cruzamientos. En nuestro caso, no parece una explicación lógica ya que, por un lado, debería ocurrir el fenómeno simultáneamente en las dos poblaciones estudiadas, y por otro lado, ambas poblaciones se recolectaron en áreas reducidas y uniformes. El Efecto Wahlund no parece una explicación válida en nuestro caso.

Así pues, considerando todo lo expuesto anteriormente, el más probable proceso implicado en el mantenimiento de la variabilidad genética detectada, es la Selección Natural. Incluso podríamos afirmar que la propuesta realizada por algunos autores a favor de la generalización de la selección balanceadora heterótica, no se ajusta en nuestro caso a los resultados obtenidos. Por tanto, podríamos pensar en una selección balanceadora de tipo diversificador (SINGH y RHOMBERG,

1987) o dependiente de la frecuencia, o bien, en una selección de tipo direccional. En cualquier caso, sería necesaria una experimentación específica para alcanzar una conclusión definitiva.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ha llevado a cabo mediante la subvención concedida al proyecto CAM C233/91.

ABSTRACT

OCHANDO, M. D.; CALLEJAS, C.; FERNÁNDEZ, O. H. y REYES, A., 1994: Allozymic genetic variability in *Dacus oleae* (Gmelin). (Diptera: Tephritidae). I. Analysis of two natural populations from the South-east of Spain. *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**(1): 35-44.

Genetic variation in the olive fruit fly *Dacus oleae*, was analyzed at 12 enzyme genes by starch gel electrophoresis. Two natural populations from the South-east of Spain were studied.

The populations showed high levels of genetic variability. Average heterozygosity was 0.1339. The proportion of polymorphic loci was 0.7725 or 0.9545 (criterion 95 % and criterion 99 % respectively). The average number of alleles per locus was 2.6818.

Concerning the pattern of the variation, the most remarkable finding was the similarity of the configuration of allelic frequencies in our populations.

Our observations support the conclusion that selection may be the major factor responsible for the genetic variation observed in *Dacus oleae*.

Key words: *Dacus oleae*, electrophoresis, genetic variability.

REFERENCIAS

- AYALA, F. J.; POWELL, J. R.; TRACEY, M. L.; Mouro, C. A. y PÉREZ-SALAS, S., 1972: Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics* **70**: 113-139.
- AYALA, F. J. y KITTO, G. B., 1974: Genetic differentiation within and between species of the *Drosophila willistoni* group. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **71**: 999-1.003.
- BERLOCHER, S. H. y BUSH G. L., 1982: An electrophoretic analysis of *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) phylogeny. *Syst. Zool.* **31**: 136-155.
- BUSH, G. L. y KITTO, G. B., 1979: Research on the genetic structure of wild and laboratory strains of the olive fly. FAO Report: *Development of pest management system for olive culture program*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- GILLESPIE, J. H. y LANGLEY, C. H., 1974: A general model to account for enzyme variation in natural populations. *Genetics*, **76**: 837-848.
- HARRIS, H., 1966: Enzyme polymorphism in man. *Proc R. Soc. B.*, **164**: 298-310.
- HUBBY, J. I. y LEWONTIN, R. C., 1966: A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, **54**: 577-594.
- HUETTEL, M. D.; FUERST, P. A.; MARUYAMA, T. y CHAKRABORTY, R., 1980: Genetic effects of multiple population bottlenecks in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitits capitata*). *Genetics*, **94**: 5-47.
- KIMURA, M., 1983: *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge Univ. Press.
- KING, J. L. y JUKES, T. H., 1969: Most evolutionary change in proteins may be due to neutral mutations and genetic drift. *Science*, **164**: 788-798.
- LEVINTON, J., 1973: Genetic variations in a gradient of environmental variability: marine Bivalvia (Mollusca). *Science*, **180**: 75-76.
- LOUKAS, M.; ECONOMOPOULOS, A. P.; ZOUROS, E. y VERGINI, Y., 1985: Genetic changes in artificially reared colonies of the olive fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Ann. Ent. Soc. Amer.* **78**: 159-165.
- LOUKAS, M., 1989: Population genetic studies of fruit flies of economic importance, especially medfly and olive fruit fly, using electrophoretic methods. In *Electrophoretic Studies on Agricultural Pest*. H. D. Loxdale and J. den Hollander (eds.), vol. 39. 69-102.
- LOXDALE, H. D. y DEN HOLLANDER, J. (Eds.), 1989: *Electrophoretic Studies on Agricultural Pest*. Syst. Ass. Clarendon Press. Oxford.
- MALACRIDA, A. R.; GUGLIELMINO, C. R.; GASPERI, G.; BARUFFI, L. y MILANI, R., 1992: Spatial and temporal differentiation in colonizing populations of *Ceratitis capitata*. *Heredity*, **69**: 101-111.
- MALAVASI, A. y MORGANTE, J. S., 1983: Population genetics of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, Tephritidae) in different host: genetics differentiation and heterozygosity. *Genetica*, **60**: 207-211.
- MCPHERON, B. A.; JORGENSEN, C. D. y BERLOCHER, S. H., 1988: Low genetic variability in Utah cherry-infes-

- ting population of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella*. *Entomol. Exp. appl.* **46**: 155-160.
- MENKEN, S. B. J. y ULENBERG, S. A., 1987: Biochemical characters in Agricultural Entomology. *Agric. Zoo. Reviews*, **2**: 305-359.
- NEI, M., 1972: Genetic distance between populations. *Am Nat.*, **106**: 283-292.
- NEI, M., 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583-590.
- NEI, M.; MARUYAMA, T. y CHAKRABORTY, R., 1975: The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, **29**: 1-10.
- NEI, M. y KOEHN, R. K. (eds.), 1983: *Evolution of genes and proteins*. Sinauer Assoc.
- NEVO, E., 1978: Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. *Theor. Pop. Biol.*, **13**: 127-177.
- POULIK, M. D., 1957: Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, **180**: 1.477-1.479.
- POWELL, J. P., 1971: Genetic polymorphisms in varied environments. *Science*, **174**: 1.035-1.036.
- REYES, A. y OCHANDO, M. D., 1993: A study of gene-enzyme variability in three Spanish populations of *Ceratitidis capitata*. Proc. Int. Open Meeting «Fruit fly Economic Importance» (in press).
- SINGH, R. S. y RHOMBERG, L. R., 1987: A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster* II. Estimates of Heterocigosity and Patterns of Geographic Differentiation. *Genetics*, **117**: 255-271.
- TSAKAS, S. C. y ZOUROS, E., 1980: Genetic differences among natural and laboratory-reared populations of the olive fruit fly *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Ent. exp. & appl.*, **28**: 268-276.
- YONG, H. S., 1988: Allozyme variation in the artocarpus fruit fly *Dacus umbrosus* (Insecta: Tephritidae) from Peninsular Malaysia (1988). *Comp. Biochem. Physiol.*, **91B**: 85-89.
- YONG, H. S., 1990: Low allozyme variability in *Bactrocera albistrigata* (Insecta: Diptera: Tephritidae) from peninsular Malaysia. *Comp. Biochem. Physiol.*, **97B**: 119-121.
- YONG, H. S., 1992: Allozyme variation in the melon fly *Dacus cucurbitae* (Insecta: Diptera: Tephritidae) from Peninsular Malaysia. *Comp. Biochem. Physiol.*, **102B**: 367-370.
- ZOUROS, E. y KRIMBAS, C. B., 1969: The genetics of *Dacus oleae*. III. Amount of variation at two esterase loci in a Greek population. *Genet. Res., Camb.*, **14**: 249-258.
- ZOUROS, E. y LOUKAS, M., 1989: Biochemical and colonization genetics of *Dacus oleae* (Gmelin). In: *Fruit flies, Their biology, Natural enemies and Control*. A. S. Robinson and G. Hooper (eds.). Chapter 5.3, 75-87.