

## Caracterización genética en *Ceratitis capitata* Wied. asociada a fruto hospedador. I. Análisis isoenzimático

P. RODA, C. CALLEJAS, A. REYES Y M. D. OCHANDO

En el presente trabajo se han analizado dos poblaciones de *Ceratitis capitata* Wied. de una misma zona geográfica: Basta (Valencia), una de ellas obtenida a partir de higos infestados y la otra a partir de melocotones. El análisis se ha llevado a cabo mediante electroforesis en gel de almidón, obteniéndose información sobre 22 loci isoenzimáticos. Nuestra finalidad era detectar la posible existencia de razas hospedador en esta especie. No se han observado diferencias cualitativas en la variabilidad genética enzimática entre ambas muestras poblacionales. Sin embargo, las frecuencias alélicas de cinco de los loci analizados mostraron diferencias estadísticamente significativas asociadas a fruto hospedador. A pesar de esta diferenciación genética, no podemos afirmar positivamente la existencia de razas hospedador, aunque sí de factores selectivos que permiten la diferenciación de moscas procedentes de higos y melocotones. Los resultados evidencian la validez de la metodología utilizada y el interés de la determinación racial/biotipos, en beneficio de la posterior lucha biológica contra la plaga.

P. RODA, C. CALLEJAS, A. REYES Y M. D. OCHANDO. Departamento de Genética. Facultad de C.C. Biológicas. Universidad Complutense. 28040-Madrid. España.

**Palabras clave:** *Ceratitis capitata*, electroforesis, variabilidad genética, raza hospedadora.

### INTRODUCCIÓN.

Los estudios de variabilidad genética mediante análisis de loci enzimáticos proporcionan una valiosa información acerca de la estructura de las poblaciones y de los procesos evolutivos que actúan sobre las mismas. A pesar de que la técnica se viene aplicando desde mediados de la década de los 60 (HARRIS, 1966; HUBBY and LEWONTIN, 1966), sólo a partir de los años 80 comenzó a utilizarse para ayudar a resolver problemas en el campo de la entomología agraria. Así, se ha obtenido importante información sobre la estructura de las poblaciones, dispersión y flujo génico, introgresión e hibridación,....., en diversas especies de plagas (OXFORD and ROLLISON, 1983; MENKEN and ULENBERG, 1987;

LOXDALE and DEN HOLLANDER, eds., 1989; BERLOCHER *et al.*, 1993).

A todo ello, debemos añadir la importancia que en taxonomía tiene la técnica. Resulta imprescindible una correcta identificación de la especie en estudio para cualquier avance en el conocimiento de su biología. Especialmente a nivel subspecífico, es importante la determinación de razas hospedadoras y biotipos, en beneficio del posterior diseño de programas de lucha, y la puesta a punto de mecanismos de control y erradicación de la plaga. En este contexto, se ha detectado mediante análisis de variabilidad genética la presencia de razas hospedadoras en diversas especies, entre otras en la mosca de la manzana *Rhagoletis pomonella*, Lepidopteros, etc. (DIEHL and Bush, 1984; PASHLEY, 1986; MCPHERON *et al.*,

1988; FEDER *et al.*, 1988; BERLOCHER *et al.* 1993).

Por otro lado, *Ceratitidis capitata* se presenta como una de las más destructivas plagas agrícolas, causando grandes pérdidas económicas en origen, en diversos países de clima templado y cálido ya que infesta a más de 250 especies y variedades diferentes de frutales y ornamentales. A esto hay que añadir los costes económicos derivados de los tratamientos con agentes químicos, y del diseño y puesta a punto de programas de control biológico, así como las pérdidas causadas por la imposición de periodos de cuarentena en aquellos productos agrícolas destinados a la exportación.

A pesar de su enorme importancia apenas se han realizado estudios genéticos con las poblaciones naturales de *C. capitata*. De ellos, tan sólo dos hacen referencia a poblaciones españolas (LOUKAS, 1989; REYES and OCHANDO, 1994). Estos trabajos se han basado fundamentalmente en diferenciación geográfica, pero no han hecho referencia directa a aspectos de diferenciación racial.

Considerando lo anterior nos hemos planteado el análisis de la variabilidad genética isoenzimática en dos poblaciones naturales simpátricas de *C. capitata* recolectadas en diferentes tipos de frutos, con la finalidad de determinar la posible diferenciación racial ó biotípica asociada a fruto hospedador.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

**Poblaciones estudiadas:** Las poblaciones analizadas fueron muestreadas simultáneamente en la localidad de Basta (Valencia), en un área de 1500 m<sup>2</sup>, y obtenidas de dos diferentes tipos de frutos hospedadores, en concreto higos y melocotones.

Los frutos infestados recogidos en el campo, se colocaron en una cámara climática. Posteriormente se obtuvieron las pupas, y a partir de ellas los adultos, que al día de edad eran congelados a -20°C hasta su posterior análisis electroforético.

**Preparación de muestras y electroforesis:** Inmediatamente antes de la electroforesis, cada individuo fué homogeneizado en 50 µl de tampón Tris-HCl, 0.1M, pH 7.1, 0.1% Triton X-100. Dicho homogeneizado era posteriormente absorbido en tiras de papel Whatman 3MM (0.3x1mm), que se insertaban en un gel de almidón al 12%. La electroforesis se llevó a cabo durante 3h. 30' a 4°C y con un voltaje constante de 240V.

Los tampones usados fueron: 76 mM Tris-5mM ácido cítrico, pH 8.65 para el gel y 300mM ácido bórico-60mM NaOH, pH 8.1 para los electrodos (POULIK, 1957 L. AYALA *et al.*, 1972). Las tinciones se realizaron según los protocolos de AYALA *et al.* (1972), excepto para la enzima diaforasa, en la que se siguió el sistema descrito por BREWER y SING (1970).

**Loci analizados:** Se resolvieron hasta un total de 22 loci, que codifican para las siguientes enzimas: 4 loci de diaforasa (*Día-1*, *Día-2*, *Día-3* y *Día-4*), 3 loci para esterasa (*Est-1*, *Est-2* y *Est-3*), dos loci para leucín aminopeptidasa (*Lap-1* y *Lap-2*), colinesterasa (*Ce-1* y *Ce-2*) y alcohol deshidrogenasa (*Adh-1* y *Adh-2*) y 1 locus para aldehído oxidasa (*Aox*), alfa glicerofosfato deshidrogenasa (*gpdh*), hidroxibutirato deshidrogenasa (*Hbdh*), isocitrato deshidrogenasa (*Idh*), enzima málico (*Me*), manosa fosfato isomerasa (*Mpi*), malato deshidrogenasa (*Mdh*), fosfoglucomutasa (*Pgm*) y adenilato quinasa (*Ak*).

**Análisis estadístico:** tras la lectura e interpretación de los geles, se obtuvieron las frecuencias genotípicas y génicas, así como los parámetros clásicos que cuantifican la variabilidad genética: Heterocigosidad (H), Polimorfismo (P) y número medio de alelos por locus (n).

Por otra parte se calcularon los índices de fijación de WRIGHT (1931, 1978),  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{ST}$ , que miden la desviación de las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg en cada población ( $F_{IS}$ ), o para el total de las

poblaciones ( $F_{IT}$ ), y el grado de diferenciación interpoblacional para cada uno de los loci analizados ( $F_{ST}$ ). Para este cálculo aplicamos las siguientes fórmulas:  $F_{IS}=1-H_o/H_s$ ;  $F_{IT}=1-H_o/H_T$  y  $F_{ST}=1-H_s/H_T$  (WEIR and COCKERHAM, 1984), donde  $H_o$  es la heterocigosidad observada, y  $H_S$  y  $H_T$  son las heterocigosidades esperadas en condiciones de equilibrio de Hardy-Weimberg por población y para el total de las poblaciones, respectivamente. La significación del índice  $F_{ST}$  se estableció mediante la prueba  $\chi^2$  de WORKMAN y NISWANDER (1970).

## RESULTADOS

En el presente trabajo se ha analizado la variabilidad genética presente en 22 loci isoenzimáticos, que codifican para enzimas implicadas en rutas metabólicas muy diversas y que pueden ser consideradas como una muestra aleatoria significativa del genoma, ya que aquellos loci que están mapeados se localizan en 4 de los 6 cromosomas del complemento haploide de *Ceratitis capitata*.

En el Cuadro 1 se presentan las frecuencias alélicas obtenidas, para cada locus y en ambas poblaciones. Como puede observarse, en general, las frecuencias son similares en las dos poblaciones, aún cuando se aprecian diferencias de cierto grado en algunos loci como: *Aox*, *Adh<sub>2</sub>*, *Ce<sub>2</sub>*, *Dia<sub>1</sub>* y *Pgm*, siendo en otros menores estas diferencias, como en *Est<sub>3</sub>* y *Dia<sub>3</sub>*. Además, se han encontrado alelos exclusivos de ambas poblaciones, aunque en baja frecuencia: *Aox<sup>103</sup>*, *Ce<sup>97</sup>*, *Me<sup>102</sup>*, *Dia<sub>3</sub><sup>81</sup>* y *Pgm<sup>106</sup>* en la población obtenida a partir de higos, y *Aox<sup>95</sup>* en la población procedente de melocotones.

En función de las frecuencias alélicas observadas en el Cuadro 1, los loci pueden ser clasificados como: polimórficos en ambas poblaciones, como *Aox*, *Ce<sub>2</sub>*, *Est<sub>3</sub>*, *Gpdh*, *Dia<sub>1</sub>*, *Dia<sub>2</sub>*, *Mpi* y *Pgm*; polimórficos en una de las poblaciones, *Adh<sub>2</sub>*, *Dia<sub>3</sub>* y *Mdh*; monomórficos con alelos raros o en

baja frecuencia, como ocurre en *Hbdh* y *Me*; y, por último, loci monomórficos con un único alelo, y el mismo, en ambas poblaciones: *Adh<sub>1</sub>*, *Ak<sub>2</sub>*, *Ce<sub>1</sub>*, *Est<sub>1</sub>*, *Est<sub>2</sub>*, *Idh*, *Lap<sub>1</sub>*, *Lap<sub>2</sub>*, y *Dia<sub>4</sub>*.

En el Cuadro 2 se presentan los tres estadísticos empleados habitualmente para cuantificar la variabilidad genética a nivel poblacional: heterocigosidad (H), polimorfismo (P) y número medio de alelos por locus (n), obteniéndose valores relativamente semejantes, aunque ligeramente superiores en la población procedente de higos. También se muestra en dicho Cuadro 2 el valor promedio para tales estadísticos.

El patrón de diferenciación alélica intra e interpoblacional ha sido analizado en estas poblaciones con la finalidad de determinar el grado de divergencia genética en relación con las condiciones de nicho hospedador. Así, para cada uno de los 13 loci variables analizados, se han calculado los valores de  $H_o$ ,  $H_s$  y  $H_T$ , y los índices de fijación  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  y  $F_{ST}$  (Cuadro 3). Para los índices  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  se han encontrado unos valores positivos en todos los loci, excepto uno, lo que significa un defecto de heterocigotos con respecto a los esperados bajo las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg; en cambio, para el locus *Dia<sub>1</sub>* se obtienen unos valores negativos, lo que indica un exceso de heterocigotos con respecto a los esperados bajo dichas condiciones. En relación con el valor del índice  $F_{ST}$ , encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones para cinco de los loci variables: *Aox*, *Adh<sub>2</sub>*, *Ce<sub>2</sub>*, *Dia<sub>1</sub>* y *Pgm*. El valor promedio de la diferenciación entre poblaciones,  $F_{ST}$ , es de 0,0089, lo que significa que del total de la varianza genética observada, solo un 0,89% se debe a diferencias interpopulacionales.

Por último, basándonos en los datos de frecuencias alélicas, se ha calculado la distancia genética existente entre las poblaciones analizadas, que toma un valor de  $0,0078 \pm 0,019$ .

Cuadro 1.-Frecuencias genéticas para los 22 loci estudiados en dos poblaciones naturales simpátricas de *Ceratitis capitata*, una procedente de higos (H) y otra de melocotones (M); (n=tamaño de la muestra).

POBLACIONES					
LOCUS/ALELO	BASTA (M)	BASTA (H)	LOCUS/ALELO	BASTA (M)	BASTA (H)
<b>Aox</b>			<b>Lap-1</b>		
(n)	118	88	(n)	72	48
95	0	0,047	104	1	1
97	0,271	0,476	<b>Lap-2</b>		
99	0,559	0,393	(n)	40	40
101	0,161	0,083	100	1	1
103	0,084	0	<b>Me</b>		
<b>Adh-1</b>			(n)	72	120
(n)	58	94	102	0,027	0
S	1	1	106	0	0,033
<b>Adh-2</b>			104	0,972	0,966
(n)	54	56	<b>Día-1</b>		
127	1	0,928	(n)	108	84
129	0	0,071	92	0	0,012
<b>Ak-2</b>			94	0,518	0,261
(n)	108	18	96	0,472	0,631
115	1	1	98	0,093	0,095
<b>Ce-2</b>			<b>Día-2</b>		
(n)	76	86	(n)	96	76
95	0,013	0,058	89	0	0,053
97	0,105	0	90	0,938	0,895
99	0,737	0,849	91	0,062	0,053
101	0,145	0,093	<b>Día-3</b>		
<b>Ce-1</b>			(n)	102	104
(n)	132	100	79	0,039	0,019
115	1	1	80	0,922	0,981
<b>Est-1</b>			81	0,039	0
(n)	140	92	<b>Día-4</b>		
120	1	1	(n)	80	98
<b>Est-2</b>			65	1	1
(n)	68	50	<b>Mpi</b>		
115	1	1	(n)	88	68
<b>Est-3</b>			87	0,015	0,015
(n)	114	22	89	0,559	0,574
100	0,561	0,636	91	0,382	0,382
102	0,439	0,363	93	0,044	0,029
<b><math>\alpha</math>-Gpdh</b>			<b>Mdh</b>		
(n)	176	38	(n)	148	148
F	0,670	0,526	102	0,027	0,027
S	0,318	0,421	104	0,973	0,946
WF	0,011	0,052	106	0	0,027
<b>Hbdh</b>			<b>Pgm</b>		
(n)	94	86	(n)	76	80
118	1	0,976	106	0,013	0
116	0	0,023	108	0,039	0,125
<b>Idh</b>			110	0,947	0,875
(n)	90	42			
98	1	1			

Cuadro 2.—Valores de la heterocigosidad (H), polimorfismo (P) y número medio de alelos por locus (n), para ambas poblaciones estudiadas: Basta-Higos y Basta-Melocotones. También se presentan los valores promedio para cada parámetro

POBLACION	H	P (95%)	n
HIGOS	0,0969	0,4545	2,0454
MELOCOTONES	0,0954	0,4090	1,9545
VALOR MEDIO	0,09615	0,43175	1,99995

## DISCUSIÓN

Los análisis de variabilidad genética isoenzimática en poblaciones naturales han resultado ser de gran utilidad en la detección del grado de diferenciación entre poblaciones de una misma especie. Así, en el presente trabajo se han analizado 22 loci isoenzimáticos con la finalidad de determinar el grado de diferenciación asociado al fruto hospedador en dos poblaciones de *Ceratitís capitata*.

Los parámetros de variabilidad genética presentados en el Cuadro 3 muestran unos valores promedio de 0,09165 para la heterocigosidad, 0,4317 para el polimorfismo y 1,9999 para el número medio de alelos por locus. Estos valores están en concordancia con los valores obtenidos en trabajos previos analizando poblaciones europeas de *C. capitata*, en los cuales la heterocigosidad oscila

entre 0,034 y 0,114, el polimorfismo entre 0,05 y 0,36 y el número medio de alelos por locus entre 1,1 y 1,95 (HUETTEL *et al.*, 1981; LOUKAS, 1989; MALACRIDA *et al.*, 1992; REYES and OCHANDO, 1994). En lo que respecta a la comparación con otras especies de Tefrítidos, se puede comprobar que los valores de heterocigosidad obtenidos en estas poblaciones son inferiores a otros descritos en especies que infestan un único tipo de fruto hospedador. Así por ejemplo, la mosca de la manzana *Rhagoletis pomonella* y poblaciones españolas de la mosca del olivo *Dacus oleae* presentan una heterocigosidad de 0,181 y 0,1322 respectivamente (BERLOCHER and BUSH, 1982; OCHANDO *et al.*, 1994). En otras palabras, no se detecta una relación entre grado de diversidad hospedador y cantidad de variabilidad genética soportada por la población. Y como consecuencia, estos resultados estarían apoyando la hipótesis que

Cuadro 3.—Heterocigosidades e índices de fijación para distintos loci variables en dos poblaciones de *Ceratitís capitata*

LOCUS	H <sub>o</sub>	H <sub>s</sub>	H <sub>r</sub>	F <sub>is</sub>	F <sub>tr</sub>	F <sub>sr</sub>
Dia <sub>1</sub>	0,6693	0,5200	0,5427	-0,2871	-0,2333	0,0418***
Aox	0,1816	0,6092	0,6235	0,7019	0,7087	0,0228***
Adh <sub>2</sub>	0	0,0688	0,0701	1	1	0,0185**
Ce <sub>2</sub>	0,2858	0,3515	0,3558	0,1865	0,1968	0,0126***
Pgm	0,1263	0,1623	0,1642	0,2217	0,2308	0,0116*
Dia <sub>3</sub>	0	0,0945	0,0950	1	1	0,0047
α-Gpdh	0,2530	0,5082	0,5104	0,5022	0,5043	0,0042
Hbdh	0	0,0232	0,0232	1	1	0,0005
Est <sub>3</sub>	0,4833	0,4912	0,4872	0,0161	0,0081	0
Me	0	0,0606	0,0604	1	1	0
Dia <sub>2</sub>	0	0,1593	0,1586	1	1	0
Mpi	0,1176	0,5459	0,5388	0,7845	0,7817	0
Mdh	0	0,0792	0,0791	1	1	0
Media						0,0089

postula que *Ceratitis capitata* es una especie generalista, que sigue una estrategia de grano fino (MORGANTE *et al.*, 1981; KRAICNAKER *et al.*, 1987; REYES and OCHANDO, 1994), según la cual los individuos de dicha especie tenderían a considerar frutos diferentes como similares. Lo que implicaría que la selección natural favorece la presencia de determinados alelos, aquellos cuyos productos génicos sean capaces de actuar en el rango más amplio de condiciones. Y efectivamente, en este sentido encontramos: que el alelo más frecuente en cada uno de los loci analizados es el mismo en ambas poblaciones (Cuadro 1), que los niveles de variabilidad genética medida como número medio de alelos por locus, son bajos, y que aumenta la frecuencia de homocigotos (con respecto a lo esperado bajo condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg), causando unos bajos niveles de heterocigosidad (Cuadro 2) y unos valores positivos en los índices  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  (Cuadro 3). En definitiva, una estrategia de grano fino implicaría ausencia de diferenciación genética, y por tanto, ausencia de razas asociadas al fruto hospedador. En relación con esto, cabe mencionar los trabajos realizados en esta misma especie por LOUKAS (1989) y CIVETTA *et al.* (1990) analizando los loci *Pep1* y *Est1* (pupal), respectivamente, en los que no detectan diferenciación genética en relación con el fruto hospedador, si bien la no detección de razas en estos casos podría estar relacionada con el hecho de que analizan un único locus y este podría no estar implicado en la diferenciación genética entre poblaciones (LOUKAS, 1989).

Pero a pesar de lo anterior, y de que el grado de diferenciación genética promedio entre ambas poblaciones es bajo (0,89 %), así como, en consecuencia, la distancia genética, cuyo valor de 0,0078 es inferior al descrito para poblaciones de esta misma especie separadas geográficamente (GASPERI *et al.*, 1991; MALACRIDA *et al.*, 1992; REYES y OCHANDO, 1994; BARUFFI *et al.*, 1995), se detectan diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias génicas de cinco de los loci variables (Cuadro 2), además de alelos exclusivos

de población (Cuadro 1), que al encontrarse en baja frecuencia, no resultan suficientes para ser considerados como indicativos de la existencia de aislamiento reproductivo entre ambas poblaciones, sino más bien como resultado de un equilibrio mutación-selección. Todo ello viene a sugerir que en las poblaciones de *C. capitata* analizadas, a esa posible estrategia de grano fino, se añaden, se superponen, otros claros efectos selectivos sobre la variabilidad genética, provocando cierto grado de diferenciación entre ambos tipos de hospedador. Y ello podría ser consecuencia: de una alimentación preferencial y/o de una oviposición preferencial por parte de las hembras en relación con el genotipo individual y/o, lo que parece más probable, de efectos selectivos diferenciales sobre la viabilidad larvaria (PROKOPY *et al.*, 1984; CAREY, 1984; HENDRICHs and HENDRICHs, 1990).

No obstante lo ya mencionado, hay que tener en cuenta que valores bajos de  $F_{ST}$  pueden ser compatibles con la existencia de diferenciación racial, siempre y cuando la diferenciación genética entre poblaciones geográficas, recogidas de un mismo tipo de fruto, sea menor que la detectada entre poblaciones obtenidas a partir de diferentes tipos de frutos en una misma área geográfica. Como ejemplo de ello, cabe destacar el trabajo de McPHERON *et al.* (1988) en *Rhagoletis pomonella*, donde los valores de  $F_{ST}$  oscilan entre 0,5-0,6% para poblaciones separadas geográficamente obtenidas a partir del mismo tipo de fruto, mientras que para poblaciones procedentes de diferentes tipos de frutos y recogidas en la misma área geográfica,  $F_{ST}$  toma un valor del 1,2%, que es estadísticamente superior a los anteriores.

En conclusión, podemos afirmar que aún observando diferencias genéticas entre ambas poblaciones estudiadas, no parecen ser suficientes para aceptar la existencia de razas en *Ceratitis capitata* en relación con el tipo de fruto hospedador, si bien se pone de manifiesto, por un lado, la validez de la metodología utilizada para los estudios de este tipo de problemas, y por otro, la necesidad de realizar estudios genéticos más profundos analizando si-

multáneamente diferentes poblaciones de distintos frutos hospedadores y diversas zonas geográficas para poder llegar a una información más completa acerca de la posible existencia de razas ó biotipos hospedador en *Ceratitis capitata*.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado mediante la subvención concedida a los Proyectos DGICYT-PB93-1210E, APC 94-0033 y CAM C 233/91.

## ABSTRACT

RODA, P.; C. CALLEJAS, A. REYES Y M. D. OCHANDO, 1996: Caracterización genética en *Ceratitis capitata* wied. asociada a fruto hospedador. I. Análisis isoenzimático. *Bol. San Veg. Plagas*, 22 (1): 71-78

Allozyme variation at 22 enzyme loci were compared for two sympatric samples of *Ceratitis capitata*, one infesting figs and the other, peaches. Allele frequencies for 5 of the 22 loci displaying host associated differences. However this genetic differentiation, we can not positively affirm the existence of host races.

Host recognition and host associated developmental traits are discussed as important selective factors differentiating peach and fig flies.

**Key words:** *Ceratitis capitata*, electrophoresis, genetic variability, host race.

## REFERENCIAS

- AYALA, F.J., POWELL, J.R., TRACEY, M.L., MOURAO, C.A. AND PÉREZ-SALAS, S. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genetic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, 70:113-139.
- BARUFFI, L., DAMIANI, G., GUGLIELMINO, C.R., BANDI, C., MALACRIDA, A.R. AND GASPERI, G. 1995. Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity*, 74: 425-437.
- BERLOCHER, S.H. AND BUSH, G.L. 1982. An electrophoresis analysis of *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) phylogeny. *Sys. Zool.*, 31: 136-155.
- BERLOCHER, S.H., MCPHERON, B.A., FEDER, J.L. AND BUSH, G.L. 1993. Genetic differentiation at allozyme loci in the *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) species complex. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86: 716-727.
- BREWER, G.J. AND SINGH, C.F. 1970. *An Introduction to Isozyme Techniques*. Academic Press. New York.
- CAREY, J.R. 1984. Host-specific demographic studies of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Ecol. Entomol.* 9: 261-270.
- CIVETTA, A., VILARDI, J.C., SAIDMAN, B.O., LEANZA, C.A. AND CLADERA, J.L. 1990. Estimation of the number of ovipositing females per fruit in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae). *Heredity*, 65: 59-66.
- DIEHL, S.R. AND BUSH, G.L. 1984. An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. *Ann.Rev. Entomol.* 29: 471-504.
- FEDER, J.F., CHILCOTE, C.A., AND BUSH, G.L. 1988. Genetic differentiation between sympatric host races of the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *Nature*, 6194: 61-64.
- GASPERI, G., GUGLIEMINO, C.R., MALACRIDA, A. AND MILANI, R. 1991. Genetic variability and gene flow in geographical populations of *Ceratitis capitata* (Wied.) (medfly). *Heredity*, 67: 347-356.
- HARRIS, H. 1966. Enzyme polymorphism in man. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, B164: 298-310.
- HENDRICH, J. AND HENDRICH, M. A. 1990. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in nature: Location and diet pattern of feeding and another activities on fruiting and non fruiting hosts and non hosts. *Ann. Ent. Soc. Am.*, 83: 632-641.
- HUBBY, J.L. AND 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. AND CHAKRABORTY, R. 1981. Genetic effects of multiple populations bottlenecks in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Genetics* 94: s94.
- KRAINACKER, D.A., CAREY, J.R. AND VARGAS, R.I. 1987. Effect of larval host on life history traits of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Oecologia*, 73: 583-590.
- LOUKAS, M. 1989. Population genetic studies of fruit flies of economic importance, specially medfly and fruit fly, using electrophoretic methods. *En:*

- Electrophoretic Studies on Agricultural Pests*. H.D. Loxdale, J. den Hollander (Eds.). Syst. Ass. Special Vol. 39. Clarendon Press. Oxford. pp. 69-102.
- LOXDALE, H.D. AND DEN HOLLANDER, (eds.). 1989. *Electrophoretic studies on Agricultural Pests*. Syst. Assoc. Special Vol. 39. Clarendon press.
- MALACRIDA, A.R., GUGLIELMINO, C.R., GASPERI, G. BARUFFI, L. AND MILANI, R. 1992. Spatial and temporal differentiation in colonizing populations of *Ceratitits capitata*. *Heredity*, **69**: 101-111.
- MCPHERON, B. A., SMITH, D.C. AND BERLOCHER, S.H. 1988. Genetic differences between host races of the apple maggot fly. *Nature* **336**: 64-66.
- MENKEN, S. B. J. AND ULENBERG, S.A. 1987. Biochemical Characters in Agricultural Entomology. *Agric.Zoo.Rev.* vol. 2: 305-359.
- MORGANTE, J. S., DE SOUZA, H. M. L., DE CONTI, E. AND CYTRYNOWICK, M. 1981. Allozymic variability in an introduced fruit fly pest *Ceratitits capitata* (Wiedeman), 1824, (Diptera:Tephritidae). *Rev. Brazilian Genet.*, **2**: 183-191.
- OCHANDO, M.D., CALLEJAS, C., FERNÁNDEZ, O.H. Y REYES, A. 1994. Variabilidad genética aloenzimática en *Dacus oleae* (Gmelin). (Diptera: Tephritidae). I. Análisis de dos poblaciones del sureste español. *Bol. Veg. San. Plagas*, **20**: 35-44.
- OXFORD, G.S. AND ROLLISON, D. (eds.). 1983. *Protein polymorphism: Adaptive and taxonomic significance*. Academic Press.
- PASHLEY, D.P. 1986. Host-associated genetic differentiation in fall-armyworm (Lepidoptera: Noctunidae). A sibilling species complex ?. *Ann. Ent. Soc. Am.* Vol. 79: 898-904.
- POULIK, M.D. 1957. Starch gel in a discontinuous system of buffers. *Nature* **180**: 1477-1479.
- PROKOPY, R.J., McDONALD, P.T. AND WONG, T. T. Y. 1984. Inter-population variation among *Ceratitits capitata* flies in host acceptance pattern. *Entomol. exp. appl.*, **35**: 65-69.
- REYES, A. AND OCHANDO, M.D. 1994. A study of gene-enzyme variability in three Spanish populations of *Ceratitits capitata*. En: *IOBC/WPRS Bull.* **17** (6): 151-160.
- WORKMAN, P.L. AND NISWANDER, J.D. 1970. Population studies on Southwestern Indian tribes. II. Local differentiation in the Papago. *Am. J. Hum. Genet.*, **22**: 24-49.
- WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **28**: 139-156.
- WRIGHT, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations. Vol. 4. Variation within and among natural populations*. Univ. of Chicago Press.
- WEIR, B.S. AND COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358-1370.

(Aceptado para su publicación: 12 de febrero de 1996)