

Caracterización genética en *Ceratitidis capitata* asociada a fruto hospedador. II. Análisis mediante RAPD-PCR.

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

La introducción de las metodologías genético-moleculares en el estudio de plagas agrícolas ofrece una oportunidad inestimable para la caracterización de razas y biotipos. En nuestro estudio hemos aplicado la técnica de amplificación al azar de ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) para tratar de diferenciar e identificar, basándonos en la variación genética, dos poblaciones simpátricas de *Ceratitidis capitata* procedentes de Basta (Valencia), obtenidas de diferentes frutos hospedadores (higos y melocotones).

La metodología aplicada revela una gran cantidad de variabilidad genética en ambas poblaciones. Se detectaron un total de 183 bandas, 49 de ellas presentes en todos los individuos analizados, 19 presentes solo en una u otra población, aunque en bajas frecuencias, y 5 de las bandas manifestaron frecuencias estadísticamente diferentes en las dos poblaciones.

Los resultados indican que la técnica RAPD-PCR puede resultar extraordinariamente útil en estudios de taxonomía infraespecífica de insectos, e incluso en estudios de huella genética para la identificación individual. Lo que a su vez tiene una evidente aplicación en el desarrollo de las apropiadas estrategias de control de plagas.

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

Palabras clave: *Ceratitidis capitata*, RAPD-PCR, variabilidad genética, raza hospedador.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista de la entomología aplicada, la identificación de razas y biotipos resulta de enorme importancia especialmente para el diseño de programas eficaces en el control de plagas.

A este respecto, en las últimas décadas, el progreso en las técnicas y metodologías genético-moleculares, ha permitido un avance cualitativo en el campo de la taxonomía. Y así, junto a la ya clásica electroforesis de proteínas, utilizada en la identificación de razas en diversas especies de interés agrícola (OXFORD and ROLLISON, eds., 1983; DIEHL and BUSH, 1984; PASHLEY, 1986; MENKEN and ULENBERG, 1987; MCPHERON *et al.*, 1988; FEDER *et al.*, 1988; LOXDALE and DEN

HOLLANDER, eds., 1989; BERLOCHER *et al.*, 1993), se han empleado otras técnicas como los polimorfismos para fragmentos de restricción en ADN mitocondrial (PASHLEY, 1989), diversas aplicaciones de la PCR, etc.... (HOY, 1994; SCHIERWATER *et al.*, eds., 1994).

Recientemente una rápida y sensitiva técnica, ha proporcionado una poderosa herramienta para estudios de genética evolutiva en general y de taxonomía en particular. Es la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en conjunto con cortos "primers" de secuencia arbitraria y conocida. Su aplicación a los estudios poblacionales se produjo a partir de 1990 (WILLIAMS *et al.*, 1990), y ya se han puesto

de manifiesto gran parte de sus potencialidades, fundamentalmente, aunque no exclusivamente, en estudios de tipo taxonómico, en especial a nivel específico e infraespecífico. Las ventajas que esta técnica presenta son, por un lado, que no requiere del conocimiento previo de la secuencia del genoma de la especie en estudio, por otro, que son suficientes pequeñas cantidades de material y, además, que permite analizar regiones del genoma muy diversas que pueden estar sometidas a presiones selectivas diferentes y con tasas de evolución distintas, lo que faculta la obtención de marcadores genéticos utilizables para diferenciar razas, variedades, cepas ó biotipos en toda clase de organismos. Como consecuencia de ello, en los últimos años han sido numerosos los trabajos que han aplicado la técnica de RAPD-PCR en este sentido (HUNT and PAGE, 1992; CHALMERS *et al.*, 1992; CHAPCO *et al.*, 1992; BLACK, 1993; GAWEL and BARTLETT, 1993; PERRING *et al.*, 1993; HAYMER and MCINNIS, 1994; GUIRAO *et al.*, 1994; FOLKERTSMA *et al.*, 1994; REYES, 1995, etc...)

Por otra parte, dentro del campo de las plagas, la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata*, es una especie de gran importancia por ser altamente dañina y extender su acción como plaga sobre numerosos huéspedes vegetales de interés agronómico como cítricos, melocotones, albaricokes, higos, ciruelas, chirimoyas, uvas, por citar algunos ejemplos.

A pesar de su gran importancia económica, son escasos los trabajos encaminados a un conocimiento genético profundo de las poblaciones de *Ceratitis capitata* (GASPERI *et al.* 91; MALACRIDA *et al.* 92; SHEPPARD *et al.*, 1992; McPHERON *et al.* 94; HAYMER and MCINNIS, 1994; BARUFFI *et al.*, 1995; GASPARICH *et al.*, 1995) y aún más restringidos aquellos que analizan poblaciones españolas (LOUKAS, 1989; REYES and OCHANDO, 1994). De todos ellos, tan sólo dos trabajos (LOUKAS, 1989; CIVETTA *et al.*, 1990) analizan la posible diferenciación racial asociada a fruto hospedador y lo hacen mediante el uso de isoenzimas.

Considerando lo anteriormente expuesto, nos hemos planteado el análisis de la posible diferenciación racial/biotípica asociada a fruto hospedador en dos poblaciones simpátricas de *C. capitata* muestreadas simultáneamente en frutos hospedadores diferentes. La finalidad del presente trabajo es determinar el grado de diferenciación genética entre ambas poblaciones mediante la técnica de RAPD-PCR y conocer la posible existencia de marcadores genéticos asociados al fruto hospedador.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado dos muestras poblacionales de *Ceratitis capitata* (Wied.) de la misma zona geográfica, un área de 1500 metros cuadrados, situada en Basta (Valencia). Una de las muestras obtenida a partir de higos, a la que hemos denominado BAH, y la otra obtenida a partir de melocotones, denominada como BAM.

Los frutos infestados fueron recogidos en Agosto de 1993 y llevados a una cámara climática ($23^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}$) para permitir el desarrollo larvario. Posteriormente, las pupas obtenidas se guardaron en placas petri hasta la aparición del individuo adulto, que al día de edad era congelado a -20°C hasta su posterior análisis.

Fueron analizados un total de 10 individuos por población, mediante la aplicación de la metodología de RAPD-PCR, utilizándose 13 diferentes cebadores, pertenecientes a la serie C de la casa Operon: OPC-01, OPC-02, OPC-05, OPC-06, OPC-07, OPC-08, OPC-09, OPC-10, OPC-11, OPC-15, OPC-16, OPC-18, OPC-19.

El ADN genómico de cada individuo fué extraído según un método fenol-SDS diseñado para muestras de pequeño tamaño (REYES, 1995). Una vez purificado, fué valorado espectrofotométricamente y comprobada su calidad en un gel de agarosa al 0,7% (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de WILLIAMS *et al.* (1990), con ligeras modifi-

caciones, en un volumen final de 25 μ l, conteniendo Tris-HCl 10mM pH 8,3 a temperatura ambiente, KCl 10 mM, MgCl₂ 4mM, 100 μ M de cada uno de los desoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 5 picomoles del oligodecámero correspondiente, 25 ng de ADN genómico y 1,25 u del fragmento Stoffel de la ADN polimerasa Amplitaq (Perkin Elmer).

Para la obtención de los perfiles de RAPDs se utilizó un termociclador programable Peltier PTC-100 (MJ Research). El programa empleado para la amplificación consta de un ciclo inicial de 6' a 94°C, 45 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 36°C, una rampa de 0,4°C/s, 6' a 72°C y un último ciclo de 6' a 72°C.

Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2% con tampón TAE (Tris-acético-EDTA) y se visualizaron tras tinción con EtBr (1 μ g/ μ l) en un transiluminador de luz ultravioleta.

Los resultados de la amplificación se interpretaron en forma de presencia o ausencia de bandas, sin tener en cuenta las diferencias en intensidad de las mismas. A partir de estos datos se calculó la frecuencia de cada banda en ambas poblaciones, así como los índices de biodiversidad de SIMPSON-GINI (D) y de SHANNON (H') (BROWER and ZAR, 1984). Por otra parte, se estimaron los coeficientes de similitud de JACCARD para cada par de individuos y en base a ellos se elaboró un dendrograma según el método UPGMA (SNEATH and SOKAL, 1973).

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 183 productos de amplificación cuyo tamaño oscilaba entre 350 y 1500 pares de bases, y que resultaron reproducibles en todos los casos.

En el Cuadro 1 se presentan las frecuencias de cada una de las bandas de RAPD observadas en ambas poblaciones, así como el nivel de significación del χ^2 de heterogeneidad que indica si las diferencias en las frecuencias entre las dos poblaciones son estadísticamente significativas ó no. De las

183 bandas observadas, 49 son comunes a todos los individuos analizados, 19 de ellas son exclusivas de una ú otra población, aunque presentes en baja frecuencia, y, 5 manifiestan frecuencias estadísticamente diferentes entre ambas poblaciones.

Como ejemplo, se muestran en la Figura 1 los productos de amplificación por RAPD-PCR de 10 individuos de cada población con el cebador OPC-08. En ella se señalan las bandas exclusivas de cada población, así como aquellas que muestran diferencias significativas entre ambas poblaciones.

Los índices de biodiversidad para cada uno de los cebadores empleados, así como el valor promedio, se muestran en el Cuadro 2. En dicho cuadro se puede observar que existen 6 cebadores para los cuales los valores de ambos índices de biodiversidad son máximos en las dos poblaciones (OPC-01, OPC-02, OPC-05, OPC-15, OPC-16, OPC-18), mientras que el resto de cebadores mantienen unos valores que oscilan entre 0,5333 y 0,9778, ó incluso 1 en solo una de las poblaciones, siendo en algunos casos superiores esos valores en la población obtenida a partir de higos y en otros casos en la procedente de melocotones. En lo referente al valor promedio se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones: $t_{24} = 0,2380$ ($p > 0,05$) para el índice de Simpson-Gini (D) y $t_{24} = 0,1484$ ($p > 0,05$) para el índice de Shannon (H').

Con respecto a los coeficientes de similitud de Jaccard, sus valores oscilan entre 0,5000 y 0,7311. Los valores de similitud intrapoblacional son 0,6222 y 0,6438 para BAM y BAH, respectivamente, siendo 0,6245 el valor de la similitud interpoblacional. La similitud intrapoblacional media (0,6333) no resultó diferente estadísticamente de la similitud interpoblacional (0,6245), $t_{188} = 1,3006$ ($p > 0,05$).

Basado en estos coeficientes de similitud de Jaccard, se ha construido un dendrograma que muestra las relaciones filogenéticas existentes entre los individuos procedentes de ambas poblaciones (Figura 2). En él se observa que, en general, se da una separación de individuos en función del fruto hos-

Cuadro 1.—Frecuencias observadas para cada banda de RAPD en dos poblaciones de *Ceratitis capitata* obtenidas a partir de diferentes frutos hospedadores en la localidad de Basta (Valencia). También se muestra la significación del X^2 de heterogeneidad para dichas frecuencias ambas poblaciones (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, --- no significativo).

OLIGO	BANDA	BAM	BAH	X^2	OLIGO	BANDA	BAM	BAH	X^2
OPC-01	01	1	1	---	OPC-06	01	1	1	---
	02	0,2	0,2	---		02	1	1	---
	03	0,1	0	---		03	0,7	0,8	---
	04	0,6	0,7	---		04	1	1	---
	05	0,6	0,8	---		05	0,1	0,1	---
	06	0,7	0,8	---		06	0,3	0,1	---
	07	0,2	0	---		07	0,9	0,8	---
	08	1	1	---		08	0,2	0,2	---
	09	0,2	0,6	---		09	1	1	---
	10	0,8	0,4	---		10	0,2	0	---
	11	0,3	0	---	OPC-07	01	0,1	0,3	---
	12	0	0,1	---		02	1	1	---
	13	0,7	1	---		03	0	0,1	---
	14	0,7	0,5	---		04	0,6	0,6	---
	15	0,1	0,2	---		05	0	0,1	---
	16	0,3	0,5	---		06	0,8	1	---
	17	1	1	---		07	0,5	0,7	---
	18	0,1	0,2	---		08	0,8	1	---
	19	1	1	---		09	0,8	0,5	---
	20	0,1	0,3	---		10	0,7	0,4	---
	21	0,3	0,2	---		11	0,2	0,7	---
	22	1	0,8	---		12	1	1	---
OPC-02	01	0,9	0,9	---	13	1	1	---	
	02	0,5	0,3	---	14	1	1	---	
	03	1	1	---	15	1	1	---	
	04	0,4	0,7	---	OPC-08	01	0,1	0,3	---
	05	0,5	0,4	---		02	0,6	0,2	---
	06	1	1	---		03	0,8	0,7	---
	07	1	1	---		04	0,3	0	---
	08	0,6	0,7	---		05	1	1	---
	09	0,4	0,3	---		06	1	1	---
	10	1	1	---		07	0,4	0,8	---
	11	1	1	---		08	1	0,6	*
	12	0,9	0,9	---		09	0,4	0,3	---
	13	0,4	0,4	---		10	0,1	0,2	---
	14	0	0,1	---		11	1	1	---
OPC-05	01	1	1	---		12	0,5	1	**
	02	0,2	0	---		13	0	0,2	---
	03	0,7	0,4	---	OPC-09	01	1	1	---
	04	0,8	0,8	---		02	0,3	0,2	---
	05	0,1	0,5	---		03	1	1	---
	06	0,9	0,4	*		04	0,3	0,1	---
	07	0,3	0,7	---		05	1	1	---
	08	0,9	0,8	---		06	0,9	1	---
	09	0,3	0	---					

OLIGO	BANDA	BAM	BAH	X ²	OLIGO	BANDA	BAM	BAH	X ²
	10	0,6	0,7	---		07	0,1	0	---
	11	0,4	0,6	---		08	0,3	0,6	---
	12	1	1	---		09	0,1	0,4	---
	13	0,7	0,7	---		10	0,6	0,7	---
	14	0,4	0,2	---		11	1	1	---
	15	0,1	0	---		12	0,7	0,7	---
	16	0,2	0,4	---					
	17	1	1	---					
OPC-10	01	0,6	0,8	---	OPC-16	01	0,2	0,3	---
	02	0	0,1	---		02	0,2	0,2	---
	03	0,2	0,4	---		03	0,5	0,3	---
	04	0,5	1	**		04	0,1	0,1	---
	05	1	1	---		05	0,7	0,7	---
	06	0,1	0,2	---		06	1	0,9	---
	07	0,7	0,4	---		07	0,4	0,4	---
	08	0	0,1	---		08	0,6	0,5	---
	09	0,4	0,3	---		09	0,2	0,2	---
	10	1	1	---		10	0,6	0,4	---
	11	0,5	0,5	---		11	1	1	---
						12	0,1	0	---
OPC-11	01	1	0,9	---	OPC-18	01	0,2	0,3	---
	02	0,3	0,3	---		02	0,2	0,3	---
	03	0,3	0,5	---		03	0,3	0,6	---
	04	0,2	0,3	---		04	0,3	0,2	---
	05	0,7	0,6	---		05	0,8	0,7	---
	06	1	1	---		06	1	1	---
	07	0,7	0,9	---		07	1	1	---
	08	0,6	0,3	---		08	1	1	---
	09	0,5	0,9	---		09	0,2	0,1	---
	10	1	1	---		10	0,7	0,9	---
	11	0,4	0,3	---		11	0,3	0,1	---
	12	1	1	---		12	1	1	---
OPC-15	01	0	0,2	---		13	0	0,2	---
	02	0,8	0,5	---		14	0,6	0,7	---
	03	0,4	0,8	---		15	0,7	1	---
	04	1	1	---	OPC-19	01	0,3	0,5	---
	05	0,4	0,6	---		02	1	1	---
	06	1	1	---		03	1	1	---
	07	0,2	0,2	---		04	0,9	0,6	---
	08	1	1	---		05	0,6	0,7	---
	09	1	1	---		06	0,2	0,2	---
	10	0,7	0,6	---		07	0,6	1	*
	11	0,5	0,2	---		08	1	1	---
	12	0,2	0,7	---		09	0,3	0,1	---
	13	0,7	0,4	---		10	0,5	0,4	---
	14	0,4	0,2	---		11	0	0,1	---
	15	1	1	---		12	0,8	1	---
	16	1	1	---					
	17	0,2	0	---					
	18	1	1	---					

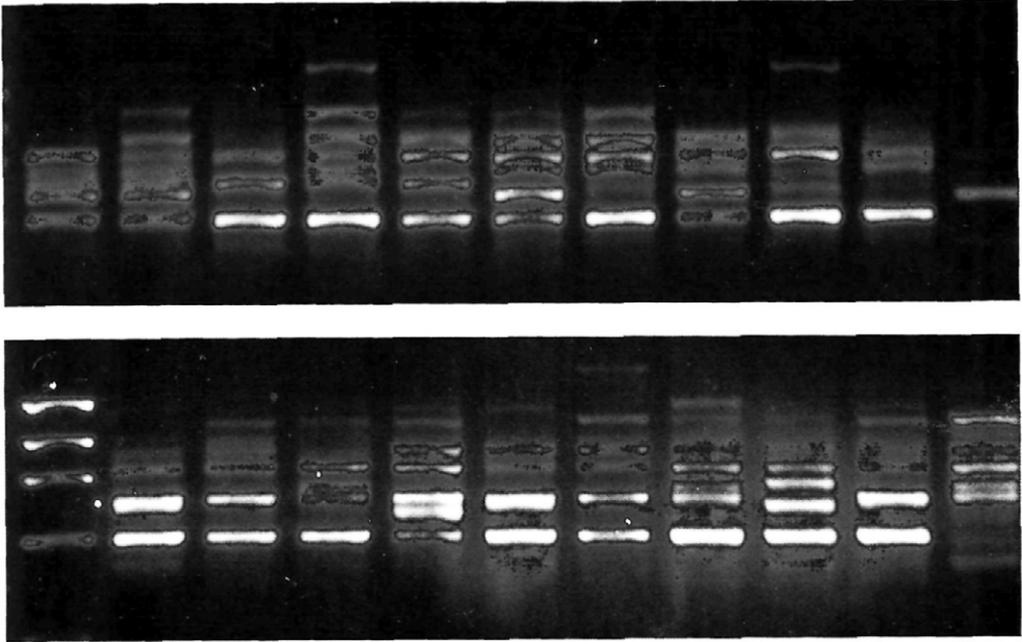


Fig. 1.- Productos de amplificación obtenidos con el oligo C-8, para la población BAH (a), y para la población BAM (b).

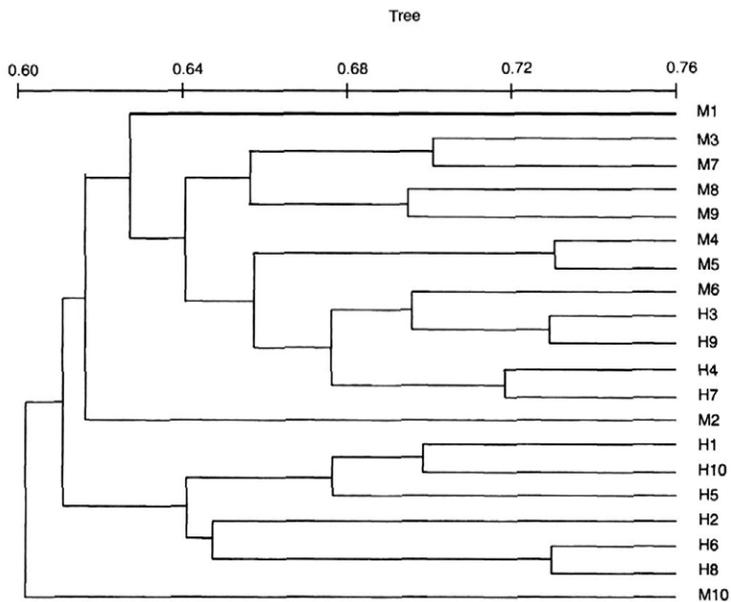


Fig. 2.- Dendrograma basado en los índices de similitud de Jaccard construído con la información de 10 individuos de *Ceratitís capitata* procedentes de la población BAM (M1 a M10) y 10 procedentes de la población BAH (H1 a H10).

Cuadro 2.-Valores de biodiversidad estimados según el índice de Simpson-Gini (D) y el índice de Shannon (H') para cada uno de los cebadores analizados, así como el valor promedio, en dos poblaciones naturales de *C. capitata* obtenidas de la localidad de Basta (Valencia) a partir de melocotones (BAM) e higos (BAH). las diferencias promedio no son estadísticamente significativas.

OLIGO	D		H'	
	BAM	BAH	BAM	BAH
OPC-01	1	1	1	1
OPC-02	1	1	1	1
OPC-05	1	1	1	1
OPC-06	0,8667	0,6667	0,7592	0,5331
OPC-07	0,9778	1	0,9398	1
OPC-08	0,9556	0,9778	0,8796	0,9397
OPC-09	0,9556	1	0,8796	1
OPC-10	0,8667	0,9556	0,7967	0,8796
OPC-11	1	0,9556	1	0,8796
OPC-15	1	1	1	1
OPC-16	1	1	1	1
OPC-18	1	1	1	1
OPC-19	0,9778	0,9556	0,9398	0,8796
Media	0,9692	0,9624	0,9381	0,9317

pedador, quedando agrupados por un lado los individuos procedentes de melocotones, individuos M (excepto tres de ellos: M6, M2 y M10), y por otro, los individuos procedentes de higos, individuos H.

DISCUSION

En el presente trabajo se han analizado 183 productos de amplificación que han sido obtenidos en *Ceratitis capitata* mediante la técnica de RAPD-PCR.

De dichas 183 bandas de RAPD, solo 49 resultaron ser comunes a todos los individuos (Cuadro 1), siendo el patrón de RAPDs diferente en cada individuo analizado, lo que es representativo de una alta variabilidad, y podría ser de gran interés en posteriores estudios ya que pone de manifiesto la utilidad de esta técnica para determinar la huella genética de individuos concretos (DNA fingerprinting), y ello puede ser aplicado en estudios de estimas de tamaño poblacional,

migración, colonización, preferencias de hábitats, etc., en poblaciones naturales.

Desde el punto de vista de la cantidad de variabilidad genética presente en ambas poblaciones (Cuadro 2) no se han detectado diferencias estadísticamente significativas ni en el índice de Simpson-Gini ($t_{24} = 0,2380$, $p > 0,05$) ni en el de Shannon ($t_{24} = 0,1484$, $p > 0,05$). Tampoco se observa una mayor similitud dentro de cada población que entre poblaciones ($t_{188} = 1,003$, $p > 0,05$). Además, entre las poblaciones analizadas, se ha encontrado un valor medio de similitud de Jaccard de 0,6245, que es superior al detectado entre poblaciones geográficamente separadas de diferentes especies de insectos, en las cuales toma valores de 0,47 en *Melanoplus sanguinipes* (CHAPCO *et al.* 1992), 0,39 en *Listronotus bonaerensis* (WILLIAMS *et al.* 1994), 0,34 en *Aedes aegypti* (BALLIGER-CRABTREE *et al.* 1992) ó 0,49 en la misma *Ceratitis capitata* (REYES, 1995). No obstante, los valores obtenidos son similares a los detectados en poblaciones de esta especie recogidas simultánea-

mente de diferentes frutos en una misma localidad, 0,5786 (REYES, 1995). Lo que indicaría que la diferenciación geográfica, en esta especie, es superior a la determinada por el hospedador. En base a todo ello, no se puede postular que exista una diferenciación racial asociada al fruto hospedador en *C. capitata*. Estarían, así, los resultados en concordancia con la hipótesis postulada por diversos autores (MORHANTE *et al.*, 1981; KRAINACKER *et al.*, 1987; REYES and OCHANDO, 1994) según la cual esta especie sigue una estrategia de grano fino, es una generalista frugívora, de modo que frutos hospedadores diferentes son considerados por este Díptero como similares, y por ende no se desarrollaría la existencia de razas hospedadoras.

No obstante lo anterior, sí que se observa un cierto grado de diferenciación entre las dos poblaciones, aún cuando fueron recogidas simultáneamente en una misma área geográfica, siendo el único factor variable el fruto hospedador. En el análisis de los perfiles de RAPDs es de destacar la presencia de bandas exclusivas en ambas poblaciones (Cuadro 1, Figura 1), aunque dichas bandas se detectan en baja frecuencia. En consecuencia, estas bandas no podrían ser consideradas como marcadores genéticos exclusivos de población ya que para ello sería necesario que estuvieran presentes en todos los individuos ó al menos en una frecuencia significativa. Por otra parte, cabe resaltar la existencia de 5 bandas que aparecen en frecuencias estadísticamente distintas en ambas poblaciones analizadas (Cuadro 1), si bien estos resultados deben tomarse con precaución dado el tamaño muestral empleado.

Además, en la Figura 2 puede observarse como los individuos presentan una clara tendencia a agruparse en función de su procedencia hospedadora, lo que sería indicativo de que el fruto hospedador juega un importante papel en la diferenciación de estas poblaciones. En este sentido, se sabe que la hembra de *Ceratitis capitata* a la hora de realizar la oviposición sobre un determinado hospedador se ve influenciada por múltiples estímulos como son la presencia de atractivos volátiles (FERON,

1962; SANDERS, 1962; TANAKA, 1965), olor, forma y tamaño de la planta (SANDERS, 1968) y color, forma y tamaño del fruto (FERON, 1962; SANDERS, 1968; NAKAGAWA *et al.* 1978). Casos de oviposición preferencial en *C. capitata* han sido descritos por PROKOPY *et al.* (1984) en experimentos de aceptación del fruto hospedador en relación con el tamaño del fruto. Por otra parte, hay que tener en cuenta que también existen preferencias en los sitios de alimentación (HENDRICHS and HENDRICHS, 1990), que podrían ser responsables de que los apareamientos no se diesen al azar entre los individuos y que también podrían afectar a la oviposición preferencial hospedadora. En otras palabras, en la diferenciación poblacional observada (Cuadro 1, Figura 2) podría jugar algún papel una posible preferencia de determinados genotipos a ovipositar en un tipo de fruto hospedador concreto. Pero más bien, y considerando, además, la concordancia a este respecto con los resultados correspondientes al análisis enzimático, parece más probable que la diferenciación se produzca como efecto de presiones selectivas diferenciales sobre las larvas alimentadas en uno u otro tipo de fruto, desarrolladas en diferentes microhabitats (CAREY, 1984; RODA *et al.*, 1995).

En definitiva, estos datos obtenidos mediante RAPD-PCR son altamente congruentes con los obtenidos en estas mismas poblaciones mediante el estudio de loci isoenzimáticos (RODA *et al.*, 1995), que ponen de manifiesto la influencia del fruto hospedador sobre el patrón de variabilidad genética observado. Aún cuando la cantidad de variabilidad genética detectada es menor en el caso del estudio isoenzimático; lo que parece lógico si recordamos que en ese caso estamos analizando secuencias codificadoras de enzimas, que, muy probablemente, están sometidas a presiones selectivas estrictas, mientras que en el caso que nos ocupa las secuencias analizadas pueden ser muy diversas, incluidas secuencias no codificadoras, altamente repetitivas, etc., que razonablemente, no sufren el mismo grado de presiones selectivas ó incluso ninguno. Pero tanto en un caso como en el otro, se evidencian, no razas, pero sí diferenciación genética:

alelos ó, paralelamente, bandas, exclusivos/as, y loci ó bandas con frecuencias estadísticamente diferentes en ambas poblaciones.

En conclusión, los resultados permiten afirmar que no se observa la existencia de razas hospedadoras en las poblaciones de *Ceratitis capitata* analizadas, aunque sí se ha detectado cierta diferenciación genética asociada al fruto hospedador, probablemente como consecuencia de una acción selectiva diferencial sobre la viabilidad larvaria. Evidenciándose, además, la validez de la metodología RAPD-PCR en los estudios taxonómicos infraespecíficos, e incluso su utilidad para estudios epidemiológicos de parentesco genético de poblaciones, y

de huella genética e identificación individual dada la gran cantidad de bandas observable. Lo que a su vez tiene una clara aplicación en el desarrollo de las apropiadas estrategias de control de plagas.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado mediante las subvenciones concedidas a los proyectos DGICYT -PB93-1210 y CAM-C233/91.

Agradecemos a B. Ochando su desinteresada ayuda en la obtención del material biológico.

ABSTRACT

REYES, A.; C. CALLEJAS, P. RODA Y M. D. OCHANDO: Caracterización genética en *Ceratitis capitata* asociada a fruto hospedador. II Análisis mediante RAPD-PCR. *Bol. San. Veg. Plagas*, 22 (2): 361-371.

We have used the RAPD-PCR technique, to genetically identify two sympatric population samples of *Ceratitis capitata*, one infesting figs, and the other peaches.

This methodology revealed a large amount of genetic variation in these two populations. A total of 183 bands were detected, 49 present in all the screened individuals, 19 only present in one or the other population, however in low frequencies, and 5 show up frequencies statistically different between populations. The results are discussed in relation to the validity of the RAPD-PCR technique to host and biotype diagnostics.

Keywords: *Ceratitis capitata*, RAPD-PCR, genetic variability, host races.

REFERENCIAS

- BALLIGER-CRABTREE, M. E.; BLACK IV, W.C., and MILLER, B. R. 1992: Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am.J. Trop. Med. Hyg.*, 47: 893-901.
- BARUFFI, L.; DAMIANI, G.; GUGLIELMINO, C.R.; BANDIS, 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.; 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. Entom. Soc. Am.* 86, 6: 716-727.
- BLACK IV, W.C. 1993: PCR with arbitrary primers: Approach with care. *Insect Mol. Biol.*, 2: 1-5.
- BROWER, J. E. and ZAR, J. H., 1984: *Field and Laboratory Methods for General Ecology*. W.C. Brown Publ. Dubuque. IA.
- CAREY, J.R. 1984: Host-specific demographic studies of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Ecological Entomology*, 9: 261-270.
- CHALMERS, K.J.; WAUGH, R.; SPRENT, J.L.; SIMONS, A.J. and POWELL, W., 1992: Detection of genetic variation between and within populations of *Glicicida sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity*, 69: 465-472.
- CHAPCO, W.; ASHTON, N. W.; MARTEL, R. K. B.; ANTONISHYN, N. and CROSBY, W. L., 1992: A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome*, 35: 569-574.
- 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.L.; CHILCOTE, C.A. and BUSH, G.L., 1988: Genetic differentiation between sympatric host races of the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *Nature*, **336**, 6194: 61-64.
- FERON M., 1962: L'instinct de reproduction chez le mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* (Wied) (Dipt. Trypetidae). Comportement sexuelle. Comportement de ponte. *Rev. Pathol. Vég. Entomol. Agric. Fr.*, **41**: 1-129.
- FOLKERTSMA, R.T.; ROUPPE, J. N. A. M.; VAN GENT-PELZER, M. P. E.; GROOT K. E.; VAN DEN BOS W. J.; SCHOTS A.; BAKKER J. and GOMMERS F. J., 1994: Inter- and intraspecific variation between populations of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* revealed by random amplified polymorphic DNA. *Phytopathology*, **84**: 807-811.
- GASPARICH, G.E.; SHEPPARD, W.S.; HAN, H.-Y.; MCPHERON, B.A. and STECK, G.J., 1995: Analysis of mitochondrial DNA and development of PCR-based diagnostic molecular markers for Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) populations. *Insect Mol. Biol.* **4**, 1: 61-67.
- GASPERI, G.; GUGLIELMINO, C. R.; MALACRIDA, A. R. and MILANI, R., 1991: Genetic variability and gene flow in geographical populations of *Ceratitis capitata* (Wied) (Medfly). *Heredity*, **67**: 347-356.
- GAWEL, N. and BARTLETT, A., 1993: Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Insect Molec. Biol.* **2**: 33-38.
- GUIRAO, P.; BEITIA, F. y CENIS, J. L., 1994: Aplicación de la técnica RAPD-PCR a la taxonomía de moscas blancas (*Homoptera, Aleyrodidae*). *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**: 757-764.
- HAYMER, D. and MCINNIS, D., 1994: Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*, **37**: 244-248.
- 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. HOY, M.A., 1994: *Insect Molecular Genetics. An introduction to principles and applications*. Academic Press.
- HUNT, G.F. and PAGE, R.E., 1992: Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 15-20.
- KRAINACKER, D.A.; CAREY, J.R. and VARGAS, R.I., 1987: Effect of larval host life history traits of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Oecologia* (Berlin), **73**: 583-590.
- LOUKAS M., 1989: Population genetic studies of fruit flies of economic importance, specially medfly and olive fruit fly, using electrophoretic methods. En: *Electrophoretic Studies on Agricultural Pest*. H. D. Loxdale, J. den Hollander (Eds.). Sys. Ass. Special vol. 39. Clarendon press. Oxford. pp. 69-102.
- LOXDALE, H.D. and DEN HOLLANDER, J., (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 *Ceratitis 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.
- MCPHERON, B.A.; GASPARICH, G.E.; HAN, H.-Y.; STECK, G.J. and SHEPPARD, W.S., 1994: Mitochondrial DNA restriction map for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Biochem. Gen.* **32**: 25-33.
- MENKEN, S.B.J. and ULENBERG, S.A., 1987: Biochemical characters in Agricultural Entomology. *Agric. Zoo. Rev.* **2**: 305-359.
- MORHANTE, J.S.; DE SOUZA, H.M.L.; DE CONTI, E. and CYTRYNOWICK, M., 1981: Allozymic variability in an introduced fruit fly pest *Ceratitis capitata* (Wiedeman), 1824, (Diptera: Tephritidae). *Rev. Brazilian Genet.*, **2**: 183-191.
- NAKAGAWA, S.; PROKOPY, R.J.; WONG, T.T.Y.; ZIEGLER, J. R.; MITCHELL, S. M.; URAGO, T. and HARRIS, E. J., 1978: Visual orientation of *Ceratitis capitata* flies to fruit models. *Entomol. exp. Appl.*, **24**: 193-198.
- 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: Noctuidae). A sibling species complex?. *Ann.Ent.Soc.Am.*, **79**: 898-904.
- PASHLEY, D.P., 1989: Host-associated differentiation in armyworms (Lepidoptera: Noctuidae): An allozymic and mitochondrial DNA perspective. En: *Electrophoretic studies on Agriculture Pest*. H. D. Loxdale, J. den Hollander (eds.). Syst. Assoc. Special vol. 39. Clarendon press. Oxford. pp. 103-114.
- PERRING, T.; COOPER, A.; RODRÍGUEZ, R.; FARRAR, C. and BELLOWS, T., 1993: Identification of whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science*, **259**: 74-77.
- PROKOPY, R.J.; MCDONALD, P.T. and WONG, T.T.Y., 1984: Inter-population variation among *Ceratitis capitata* flies in host acceptance pattern. *Entomol. exp. appl.*, **35**: 65-69.
- REYES, A., 1995: Análisis de la variabilidad genética en poblaciones españolas de *Ceratitis capitata* Wied., mediante la utilización de marcadores moleculares. *Tesis Doctoral. U.C.M.* pp 202.
- REYES, A. and OCHANDO, M.D., 1994: A study of gene-enzyme variability in three Spanish populations of *Ceratitis capitata*. *IOBC/WPRS Bull.* vol. **17**, 6: 151-160.
- RODA, P.; CALLEJAS, C.; REYES, A. y OCHANDO, M.D.: Caracterización genética en *Ceratitis capitata* asociada a fruto hospedador. I. Análisis isoenzimático. *Bol. San. Veg. Plagas* (en prensa).
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T., 1989: *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd Edit. Cold Spring Harbor Lab. Press.

- SANDERS W., 1962: Das Verhalten der Mittelmeerfruchtfliege *Ceratitis capitata* Wied. bei der Eiablage. *Z. Tierpsychol.*, **19**: 1-28.
- SANDERS W., 1968: Die Eianblagehandlung der Mittelmeerfruchtfliege *Ceratitis capitata* Wied. Ihre Abhängigkeit von Farbe und Gleiderung des Umfeldes. *Z. Tierpsychol.*, **25**: 588-607.
- SCHIERWATER, B.; STREIT, B.; WAGNER, G.P. and DE SALLE, R. (eds.), 1994: *Molecular Ecology and Evolution: Approach and Applications*. Birkhäuser V.
- SHEPPARD, W.S.; STECK G.J. and MCPHERON, B.A., 1992: Geographic populations of the medfly may be differentiated by mitochondrial DNA variation. *Experientia*, **48**: 1010-1013.
- SNEATH, P.H.A. and SOKAL, R.R., 1973: *Numerical taxonomy*. Freeman. San Francisco.
- TANAKA N., 1965: Artificial egg receptacles for three species of tephritid flies. *J. Econ. Entomol.*, **58**: 177-178.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V., 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 6531-6535.
- WILLIAMS, C.L.; GOLDSON, S.L.; BAIRD, D.B. and BULLOCK, D.W. 1994: Geographical origin of an introduced insect pest, *Listronotus bonariensis* (Kuschel), determined by RAPD analysis. *Heredity*, **72**: 412-419.

(Aceptado para su publicación: 12 Febrero 1996)