

Identificación genética de *Dacus –Bactrocera– oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae) mediante marcadores RAPD-PCR

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

La introducción de las metodologías genético-moleculares en el campo de la entomología aplicada nos ofrece una notable oportunidad para la identificación objetiva de especies, así como para la caracterización de razas y biotipos.

En el presente trabajo, hemos utilizado la técnica de amplificación al azar del ADN genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) buscando marcadores específicos en la especie *Dacus –Bactrocera– oleae*.

Se han utilizado individuos pertenecientes a dos zonas geográficas, Genave, en Jaén y Aguadulce, en Sevilla, y 7 cebadores (primers). Se detectaron un total de 94 bandas, de las cuales 17 estaban presentes en todos los individuos analizados. Las 17 bandas invariables detectadas, representan un primer paso en la búsqueda de marcadores especie-específicos, y logicamente deberá comprobarse su ausencia en otras especies próximas de los insectos, incluso en sus diferentes estadios de desarrollo, tiene evidentes aplicaciones en el desarrollo de las apropiadas estrategias de control de plagas.

Los resultados indican que la técnica RAPD-PCR puede resultar extraordinariamente útil en estudios de caracterización. La posibilidad de una identificación inequívoca de los insectos, incluso en sus diferentes estadios de desarrollo, tiene evidentes aplicaciones en el desarrollo de las apropiadas estrategias de control de plagas.

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

Palabras clave: *Dacus –Bactrocera– oleae*, RAPD-PCR, marcadores moleculares, variabilidad genética, identificación genética.

INTRODUCCIÓN

En el campo de la entomología aplicada es evidente la necesidad de una segura identificación de las plagas a combatir. Es más, la caracterización de razas y biotipos resulta de enorme importancia especialmente para el diseño de programas eficaces en el control de esas plagas. Una identificación inapropiada o la incapacidad para reconocer diferencias poblacionales y/o raciales o biotípicas pueden tener drásticas y costosas consecuencias sobre las estrategias de control. La posibilidad de disponer de marcadores seguros y que puedan ser obtenidos mediante técnicas de relativa fácil aplicación, resul-

taría una herramienta enormemente valiosa para muy diversos especialistas.

Por otro lado, la revolución genético molecular, especialmente en la última década, ha extendido su radio de acción a múltiples disciplinas científicas. La utilidad de las técnicas moleculares para abordar diversos tipos de problemas biológicos ha quedado más que demostrada. La «resolución» de los métodos moleculares, permite conseguir una información imposible de obtener por otros métodos, y ha demostrado, también, una objetividad que otros métodos no poseen.

Entre las disciplinas científicas que mejor han aprovechado esas herramientas, lo que

ha permitido un avance cualitativo, se encuentran la sistemática y la biología de poblaciones. Y así, junto a la ya clásica electroforesis de proteínas, utilizada en la caracterización de poblaciones, razas, etc., en diversas especies de interés agrícola (OXFORD y ROLLISON, eds., 1983; DIEHL y BUSH, 1984; PASHLEY, 1986; MENKEN y ULENBERG, 1987; MCPHERON *et al.*, 1988; FEDER *et al.*, 1988; LOXDALE y DEN HOLLANDER, eds., 1989; FEDER *et al.*, 1990; BERLOCHER *et al.*, 1993; PAYNE *et al.*, 1995; BARUFFI *et al.*, 1995; NOWIERSKI *et al.*, 1996; RODA *et al.*, 1996, etc.), se están empleando otras técnicas como los polimorfismos para fragmentos de restricción en ADN mitocondrial, hibridación de ADN, secuenciación de ADN y proteínas, u otras diversas aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa –PCR– (PASHLEY, 1989; SHEPPARD *et al.*, 1992; HOY, 1994; SCHIERWATER *et al.*, eds., 1994; GASPARICH *et al.*, 1995; FUNK *et al.*, 1995, etc.).

Una de estas aplicaciones de la «reacción en cadena de la polimerasa» (PCR) desarrollada en los últimos años, origina una nueva clase de marcadores genómicos llamados «ADN polimórfico amplificado al azar» (RAPD). Esta técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en conjunto con cortos «primers», o cebadores, de secuencia arbitraria y conocida (RAPD-PCR), fué aplicada por vez primera a estudios poblacionales hace menos de una década (WILLIAMS *et al.*, 1990), proporcionando una poderosa herramienta para estudios de genética evolutiva en general y de sistemática y taxonomía en particular. Se está extendiendo su uso al análisis de muy diversos problemas biológicos, y aplicándose a un número creciente de organismos, poniendo de manifiesto su utilidad y ventaja respecto a otras técnicas moleculares, así como gran parte de sus potencialidades, fundamentalmente, aunque no exclusivamente, en estudios de tipo sistemático, relaciones filogenéticas, en especial a nivel específico e infraespecífico, caracterización de razas, bio-

tipos, poblaciones, e incluso como huella genética a nivel de individuo.

Las ventajas que esta técnica RAPD-PCR 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, lo que resulta extraordinariamente importante cuando se trabaja con organismos de pequeño tamaño como muchos insectos, 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 o 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 y PAGE, 1992; CHALMERS *et al.*, 1992; CHAPCO *et al.*, 1992; BLACK, 1993; GAWEL y BARTLETT, 1993; PERRING *et al.*, 1993; HAYMER y MCINNIS, 1994; GUIRAO *et al.*, 1994; FOLKERTSMA *et al.*, 1994; BARUFFI *et al.*, 1995; REYES, 1995; REYES *et al.*, 1996, etc...).

Por otra parte, dentro del campo de las plagas, la mosca del olivo, *Dacus -Bactrocera- oleae*, es una especie de gran importancia en nuestro país por ser altamente dañina y extender su acción como plaga sobre uno de los cultivos más importante en nuestra agricultura: el olivo. A pesar de su gran importancia económica, son escasos los trabajos encaminados a un conocimiento genético profundo de las poblaciones de *Dacus -Bactrocera- oleae*.

Además de ese desconocimiento genético, esta especie, aún recientemente ha suscitado polémica respecto a su situación taxonómica (WHITE y WANG, 1992), de ahí la utilización que hacemos de los dos nombres genéricos, *Dacus* y *Bactrocera*.

Así pues, por lo que respecta a *D. -B.- oleae*, es evidente, no solo ese interés que podríamos definir puramente taxonómico, sino y de manera fundamental, se añade el interés agro-económico, y sistemático en general, de

relaciones filogenéticas, especialmente en la actualidad cuando la eliminación de fronteras hace imprescindible un estricto control de las exportaciones y una identificación que resulte inequívoca, fácil, rápida, útil en cualquier fase del ciclo vital y suficientemente sensitiva para distinguir no solo especies próximas, sino, incluso, razas, biotipos o poblaciones, lo que permitiría la monitorización del movimiento poblacional y el análisis del flujo genético entre diversas regiones.

Considerando lo anteriormente expuesto, nos hemos planteado la búsqueda de marcadores moleculares específicos (de especie), e incluso poblacionales, en dos muestras de *Dacus -Bactrocera- oleae*, procedentes de Jaen y Sevilla. La finalidad del presente trabajo es determinar, mediante la técnica de RAPD-PCR, la presencia de marcadores invariables, que pudieran aceptarse inicialmente como especie-específicos, o incluso marcadores de población, así como conocer el grado de diferenciación genética entre ambas poblaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han analizado dos muestras poblacionales de *Dacus -Bactrocera- oleae* de dos diferentes zonas geográficas: Genave, en Jaen y Aguadulce, en Sevilla.

Los frutos infestados fueron recogidos en Octubre-Noviembre de 1994 y llevados a una cámara climática ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) para permitir el desarrollo larvario. Posteriormente, los individuos adultos que emergieron eran congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

Fueron analizadas un total de 30 moscas, individualmente, por población, mediante la aplicación de la metodología de RAPD-PCR, utilizándose 7 diferentes cebadores, pertenecientes a la serie C de la casa Operon Technologies: OPC-02, OPC-14, OPC-15, OPC-16, OPC-18, OPC-19, y OPC-20.

El ADN genómico de cada individuo fue extraído según un método fenol-SDS diseñado para muestras de pequeño tamaño (REYES *et al.*, 1997). 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 modificaciones, en un volumen final de 25 μl , conteniendo Tris-HCl 10mM pH 8,3 a temperatura ambiente, KCl 10 mM, MgCl_2 4mM, 100 μM 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 minutos a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, para desnaturalización, 45 ciclos de amplificación en tres pasos, 1 minuto a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 minuto a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 minutos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, y un último ciclo de terminación, 6 minutos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2% con tampón Tris-acético-EDTA (TAE) y se visualizaron tras tinción con bromuro de etidio (EtBr, 1mg/ml) 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. Se consideraron, por un lado las bandas invariables y por otro las bandas variables, tanto a nivel de población como en el total de los 60 individuos analizados.

Se calcularon los índices de biodiversidad de SIMPSON-GINI (D) y de SHANNON (H') (BROWER y ZAR, 1984), así como los coeficientes de similitud de JACCARD, intra e interpoblacionales.

RESULTADOS

Se detectaron un total de 94 productos de amplificación cuyo tamaño oscilaba entre

450 y 1.500 pares de bases, y que resultaron reproducibles en todos los casos.

La cantidad de variabilidad encontrada, como promedio de bandas por individuo y cebador –primer–, puede observarse en el Cuadro 1, tanto respecto a marcadores variables como invariables –constantes–.

En el Cuadro 2 se muestra la clasificación de los diferentes tipos de bandas, según fuesen variables o constantes –invariables–, y se presentasen en solo una de las poblaciones o fuesen comunes a todos los individuos analizados. Como puede observarse, 77 bandas fueron variables, de ellas 66 en la muestra de Jaén, y 65 en la de Sevilla. El perfil

de cada una de las 60 moscas analizadas resultó diferente.

Bandas exclusivas de una población, es decir, presentes solo en una de las poblaciones y ausentes en la otra, fueron 7 para Jaén y 4 para Sevilla, aunque en todos los casos estos marcadores de población se presentaban en muy bajas frecuencias.

Y por último, bandas presentes en todos y cada uno de los individuos analizados, es decir, marcadores invariables, fueron 17. En el Cuadro 3 pueden observarse estos marcadores específicos, invariables, encontrados para cada primer, así como su tamaño en pares de bases. Para todos los primers se

Cuadro 1.–Cuantificación de la variabilidad observada por individuo y cebador

	Número de bandas variables	Número de bandas invariables
Por individuo	1,28	23 en Jaén (17 comunes) 19 en Sevilla
Por cebador	11	2,43

Cuadro 2.–Clasificación de los distintos tipos de marcadores RAPDs observados según se manifestasen como variables o invariables en las dos poblaciones analizadas

Población	BANDAS		
	Variables	Constantes	
		Diagnóstico pob.	Diagnóstico esp.
Jaén	66	7	17
Sevilla	65	4	
Total	77	11	17

Cuadro 3.–Bandas invariables, constantes en todos los individuos analizados, que pueden ser consideradas –en principio– diagnóstico para la especie, clasificadas por pares de bases

Primer	N.º Bandas	PB
OPC-02	4	600, 700, 800, 1000
OPC-14	2	550, 900
OPC-15	3	450, 550, 800
OPC-16	2	1100, 1300
OPC-18	1	1500
OPC-19	2	500, 850
OPC-20	3	500, 600, 700

ha encontrado algún marcador invariable, desde uno, el de mayor tamaño, de 1.500 pares de bases, en el caso del cebador OPC-18, hasta 4, de tamaños menores en el caso del OPC-02.

En las Figuras 1 y 2, pueden observarse algunos de los perfiles obtenidos, así como las bandas constantes en cada caso. Se presentan a modo de ejemplo los productos de amplificación para 10 individuos de cada población con el cebador OPC-02 y el OPC-14. Se señalan las bandas diagnóstico

de especie, comunes a todos los individuos analizados.

Los índices de biodiversidad de Simpson-Gini (D) y de Shannon (H) promedio de los siete cebadores utilizados, se muestran en el Cuadro 4. Como puede observarse estos índices son muy semejantes para ambas poblaciones analizadas, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones.

También se han calculado los coeficientes de similitud de Jaccard (Cuadro 4), intra e

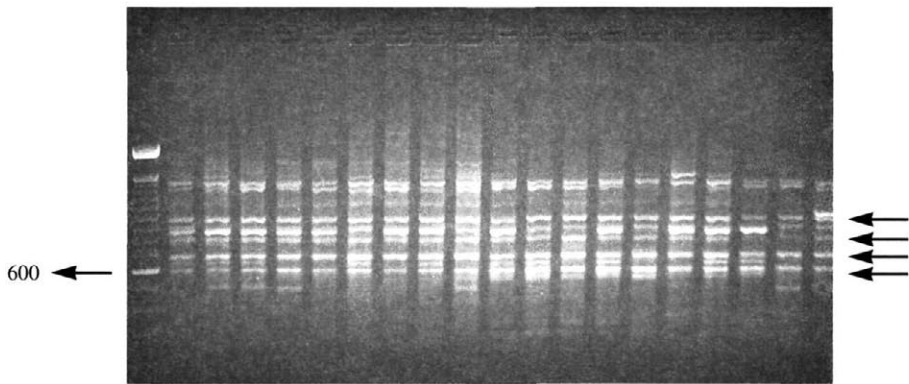


Fig. 1.-Patrones de amplificación obtenidos en *Dacus oleae* utilizando el cebador OPC 02. Línea 1, marcador escalera de peso molecular. Líneas 2-11, individuos de la población de Jaen. Líneas 12-20, individuos de la población de Sevilla. Las flechas indican las bandas diagnóstico.

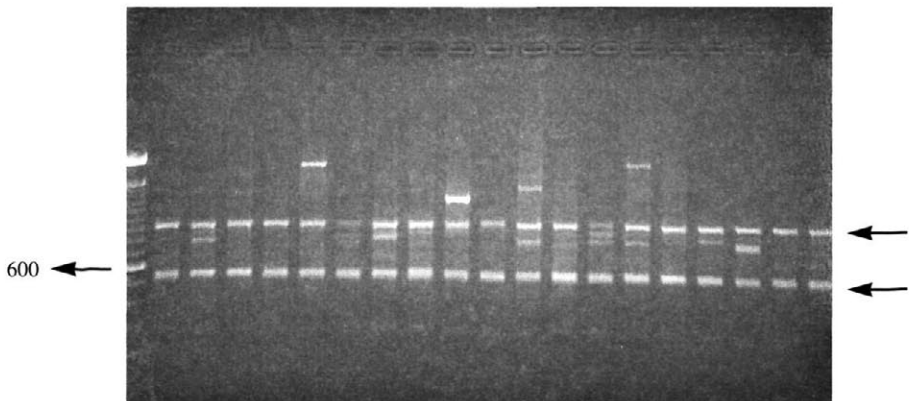


Fig. 2.-Patrones de amplificación obtenidos en *Dacus oleae* utilizando el cebador OPC 14. Línea 1, marcador escalera de peso molecular. Líneas 2-11, individuos de la población de Jaen. Líneas 12-20, individuos de la población de Sevilla. Las flechas indican las bandas diagnóstico.

Cuadro 4.—Índices de Biodiversidad de Simpson-Gini (D) y de Shannon (H), promedio de los 7 cebadores usados, así como coeficientes de Jaccard intra (promedio) e interpoblacionales

Poblaciones	Índices de Biodiversidad		Coeficientes de Jaccard	
	D	H	Intra	Inter
Jaén	0,974	0,883	0,7000	0,6927
Sevilla	0,977	0,887		

interpoblacionales, siendo extraordinariamente semejantes. El valor de similitud intrapoblacional promedio es 0,7000, y 0,6924 el valor de la similitud interpoblacional, que no resultaron diferentes estadísticamente.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se han obtenido, en *Dacus -Bactrocera- oleae*, 94 productos de amplificación mediante la técnica de RAPD-PCR y la utilización de 7 primers—cebadores—.

De esas 94 bandas de RAPD, 17 resultaron ser comunes a todos los individuos (Cuadro 1, y Cuadro 2), 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, flujo genético, colonización, preferencias de hábitats, etc., en poblaciones naturales.

Desde el punto de vista de la cantidad de variabilidad genética presente en ambas poblaciones (Cuadro 3) no se han detectado diferencias ni en el índice de Simpson-Gini ni en el de Shannon. Tampoco se observa una mayor similitud dentro de cada población que entre poblaciones (valores de Jaccard, Cuadro 3). Además, entre las poblaciones analizadas, se ha encontrado un valor medio de similitud de Jaccard de 69,24% (0,6924), que es superior al detectado entre poblacio-

nes geográficamente separadas de diferentes especies de insectos, en las cuales toma valores de 47,3% en *Melanoplus sanguinipes* (CHAPCO *et al.*, 1992), 39,1% en *Listronotus bonaerensis* (WILLIAMS *et al.*, 1994), 33,6% en *Aedes aegypti* (BALLINGER-CRABTREE *et al.*, 1992) o 49%, 57,86%, y 62,45% en *Ceratitis capitata* (REYES, 1995; REYES *et al.*, 1996). En el caso de la propia especie *D. oleae*, el presente trabajo constituye la primera publicación de este tipo en la especie, (otra publicación que utilizó también la misma especie y aplicó RAPD-PCR, no resulta comparable ya que realizó las extracciones por grupos de individuos en conjunto, CENIS y BEITIA, 1994). Solo disponemos para una posible comparación, de datos propios (no publicados como artículo, presentados en el XX International Congress of Entomology, OCHANDO *et al.*, 1996) referentes también a las mismas zonas geográficas, pero utilizando distintos cebadores. Los resultados obtenidos, en este último caso, dieron unos valores de similitud de Jaccard de 66,27% interpoblacional y 66,82% promedio intrapoblacional. Tampoco los índices de biodiversidad mostraron diferencias significativas entre las dos muestras utilizadas.

Estos datos obtenidos mediante RAPD-PCR son altamente congruentes con los obtenidos en estas mismas poblaciones mediante el estudio de loci isoenzimáticos, o los ya nombrados, con la aplicación de otros cebadores (OCHANDO *et al.*, 1994, 1996), que ponen de manifiesto el patrón de variabilidad genética observado, de gran similitud genética entre las diversas poblaciones analizadas. Aún cuando la cantidad de variabilidad genética detectada es alta en

ambos casos, a pesar de que en el estudio isoenzimático 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 o incluso ninguno.

Dos podrían ser las causas relacionadas con el patrón de distribución de la variabilidad en esta especie, una neutral, y otra selectiva. Aunque, lógicamente, mucha mayor información, en tiempo y espacio, será necesaria para obtener resultados concluyentes.

Una de las posibilidades teóricas para explicar la no diferenciación poblacional en una especie, es su reciente dispersión, el tiempo insuficiente para una evolución diferenciadora. En el caso que nos ocupa, y a pesar de que la primera referencia de la presencia de *D. oleae* en nuestro país data de 1805, parece lógico pensar que su llegada a la Península Ibérica, se produjo con la introducción de los olivos silvestres desde África y Asia Occidental, posiblemente por los fenicios (RUIZ, 1948), y por tanto, el tiempo transcurrido resultaría, en principio, suficiente para la diferenciación genética.

El otro aspecto que podría explicar el alto grado de similitud observado puede relacionarse con la estricta monofagia de la especie analizada que implicaría semejante adaptación y por ende similares efectos selectivos sobre los individuos de diferentes zonas geográficas. No obstante, debemos considerar: por un lado, que las presiones selectivas pueden ser diferentes sobre las dos poblaciones, no por efectos del sustrato nutritivo, pero sí por efecto de la climatología y de los insecticidas empleados por los agricultores en unas y otras zonas; y por otro lado, no debemos olvidar que los marcadores aquí analizados no necesariamente son dianas de la selección natural, ya que se están amplificando zonas del genoma puramente al azar, y por tanto es esperable que se incluyan re-

giones codificadoras y no codificadoras, regiones con diferentes funciones genéticas,... En definitiva, quizás los valores de similitud observados son más altos de lo esperado, y debemos, como hemos dicho anteriormente, conseguir una más completa información para extraer conclusiones definitivas.

A pesar de lo anteriormente expuesto, tanto en un caso como en el otro (análisis proteico, y genómico), se evidencia, cierto, aunque muy pequeño, grado de diferenciación genética: alelos o, paralelamente, bandas, exclusivos/as de población; siempre en muy bajas frecuencias. En consecuencia, estas bandas no podrían ser consideradas como marcadores genéticos diagnóstico de población, ya que para ello sería necesario que estuvieran presentes en todos los individuos o al menos en una frecuencia significativa en la población. En cualquier caso, y con los datos disponibles hoy, podemos afirmar que no se observa la existencia de razas geográficas en las poblaciones de *Dacus* -*Bactrocera*- *oleae* analizadas.

Con respecto a la otra finalidad de nuestro trabajo, dice DREW (1989) en su capítulo dedicado a caracteres taxonómicos, que los Tefrítidos, particularmente la subfamilia Dacinae, son uno de los grupos de insectos más difíciles de estudiar taxonómicamente, ha sido arduo encontrar caracteres taxonómicos sólidos, y esto ha creado importantes problemas. Todavía en 1992 se publicaban datos sobre la polémica taxonómica (WHITE y WANG, 1992), y de hecho nuestro material biológico se designa en dos diferentes géneros (*Dacus*, y *Bactrocera*). Así pues, la detección de marcadores adecuados, resulta necesaria.

La búsqueda de marcadores moleculares especie-específicos, diagnóstico, exclusivos, objetivo fundamental del presente trabajo podemos considerar que se ha logrado plenamente, ya que con todos y cada uno de los 7 cebadores utilizados se han detectado bandas invariables (Cuadros 3 y 4). Se detectaron un total de 17 marcadores constantes, presentes en todos y cada uno de los 60 individuos analizados. Marcadores de diver-

esos tamaños y conseguidos, como hemos dicho, para todos los cebadores. Uno en el caso del primer OPC-18, y hasta 4 en el caso del OPC-02. Lo que evidencia la sensibilidad y utilidad de la técnica para este tipo de trabajos. No obstante, lógicamente, antes de conclusiones definitivas, habrá que contrastar estos mismos primers en las especies próximas para descartar su presencia en las mismas, así como ampliar los estudios a otras poblaciones de la especie estudiada.

Los datos sobre variabilidad genética intra e interpoblacional que facilita este tipo de metodología, resultan extraordinariamente útiles a dos niveles. Por un lado, la información «cuantitativa», que permite el establecimiento de las relaciones filogenéticas entre poblaciones, y la construcción de mapas biogeográficos, a nivel genético, de la distribución de la especie. Y la derivación de información significativa respecto a flujo genético, colonización..., en definitiva, sobre movimiento de la plaga, algo de extraordinaria importancia en el campo del control. Y por otro lado, la información «cualitativa», la de aquellas bandas o marcadores, que son exclusivas/os o diagnóstico de especie. La necesidad de una identificación no ambigua en el campo del control biológico, es evidente. Resulta imprescindible para muchos profesionales, laboratorios de cuarentena, etc., conocer con exactitud, y a ser posible rapidez y sencillez, la presencia de potenciales plagas, en cualquier nivel de desarrollo que se observe (huevo, larva, pupa, adulto). Las bandas de RAPD, de ADN genómico, deben estar presentes en cualquiera de esos estadios.

En conclusión, aunque la delimitación de especies y razas o biotipos, está todavía dominada por aproximaciones tradicionales, que ciertamente mantendrán su valor en el futuro, datos moleculares y análisis cualitativo, están evidenciando su inestimable y objetivo valor en el campo de la sistemática y relaciones filogenéticas; aunque desafortunadamente todavía están subexplotados. Y algo semejante podría añadirse con respecto al diseño de programas de control biológico: es obvia la necesidad de estudios profundos sobre la variabilidad genética intra e interpoblacional para la adquisición de información que podría resultar clave en nuestra lucha contra las plagas (tamaño efectivo de las poblaciones, monitorización de movimientos, flujo genético, etc).

CONCLUSIONES

En definitiva, los resultados obtenidos ponen de manifiesto:

- La validez del método de RAPD-PCR.
- Su utilidad en el posible establecimiento de relaciones filogenéticas
- Su utilidad para monitorizar el movimiento de la plaga, colonización, flujo genético.
- La existencia de bandas exclusivas de población, que podrían conducirnos a hablar de biotipos o razas, en un futuro, aún cuando por el momento no son suficientes para ello, debido a su baja frecuencia.
- La existencia de bandas diagnóstico de especie, al menos, en principio. Y que deberán ser contrastadas en especies próximas para concluir, si en ellas no se encuentran, que realmente son «identificadoras», exclusivas de la especie en estudio.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado mediante las subvenciones concedidas a los proyectos DGICYT-APC95-0165 y Unión Europea FAIR3-CT96-1972.

Agradecemos a J. A. Cortés, y M. Civanotos su desinteresada ayuda en la obtención del material biológico.

ABSTRACT

CALLEJAS, C.; RODA, P.; REYES, A. y OCHANDO, M. D., 1998: Identificación genética de *Dacus -Bactrocera- oleae* Gmelin (Diptera: Tephritidae) mediante marcadores RAPD-PCR. *Bol. San. Veg. Plagas*, 24(Adenda al n.º 4): 873-882.

The introduction of molecular genetic methodologies in the field of applied entomology, can offer us an unique opportunity for unambiguous identification of species, as well as for the characterization of races, biotypes and populations.

In the present work, we have used the RAPD-PCR technique, to genetically identify two population samples of *Dacus -Bactrocera- oleae*, one from Jaen, and the other from Sevilla. A total of 30 adult flies from each population were screened with 7 different primers.

From the 94 obtained bands, 17 were present in all the analyzed individuals, 11 only present in one or the other population, however in very low frequencies, and the rest were variables.

The results make evident the validity of the RAPD-PCR technique for characterization and unambiguous identification of insects, with the obvious derived advantages for pest control management.

Key words: *Dacus -Bactrocera- oleae*, RAPD-PCR, molecular markers, genetic variability, genetic identification.

REFERENCIAS

- BALLINGER-CRABTREE, M. E.; BLACK IV, W. C. Y 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. y 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. y 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.; DUTEAU, N. M.; PUTERKA, G. J.; NECHOLS, J. R.; PETTORINI, J. M., 1992: Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bull. Entom. Res.* 82: 151-159.
- BLACK IV, W. C., 1993: PCR with arbitrary primers: Approach with care. *Insect Mol. Biol.*, 2: 1-5.
- BROWER, J. E. y ZAR, J. H., 1984: *Field and laboratory Methods for General Ecology*. W.C. Brown Publ. Dubuque, IA.
- CENIS, J. L. y BEITIA, F., 1994: Aplicación de la técnica RAPD-PCR (ADN polimórfico amplificado al azar) a la identificación de insectos. *Invest. Agr.: Prod. Veg.*, 9, 2: 289-297.
- CHALMERS, K. J.; WAUGH, R.; SPRENT, J. L.; SIMONS, A. J. y 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. y 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.
- DIEHL, S. R. y BUSH, G. L., 1984: An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. *Ann. Rev. Entomol.* 29: 471-504.
- DREW, R. A. I.: The taxonomy and distribution of Tropical and Subtropical Dacinae (Diptera: Tephritidae) pp. 9-14, vol. 3.* In «Fruit flies. Their biology, natural enemies and control» A. S. Robinson & G. Hooper (eds.). Elsevier, 1989.
- FEDER, J. L.; CHILCOTE, C. A. y BUSH, G. L., 1988: Genetic differentiation between sympatric host races of the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *Nature*, 336, 6194: 61-64.
- FEDER, J. L.; CHILCOTE, C. A. y BUSH, G. L., 1990: The geographic pattern of genetic differentiation between host associated populations of *Rhagoletis pomonella* (Diptera, Tephritidae) in the Eastern United States and Canada. *Evolution*, 44, 3: 570-594.
- FOLKERTSMA, R. T.; ROUPPE, J. N. A. M.; VAN GENTPELZER, M. P. E.; GROOT, K. E.; VAN DEN BOS, W. J.; SCHOTS, A.; BAKKER, J. y 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.
- FUNK, D. J.; FUTUYMA, D. J.; ORTI, G. y MEYER, A., 1995: A history of host associations and evolutionary diversification for *Orphraella* (Coleoptera: Chrysomelidae): new evidence from mitochondrial DNA. *Evolution*, 49, 5: 1008-1017.

- GASPARICH, G. E.; SHEPPARD, W. S.; HAN, H.-Y.; MCPHERON, B. A. y 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.
- GAWEL, N. y 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. y 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.
- HOY, M. A., 1994: *Insect Molecular Genetics*. Academic Press. San Diego, California.
- HUNT, G. F. y 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.
- LOXDAL, H. D. y DEN HOLLANDER, J. (eds.), 1989: *Electrophoretic studies on Agricultural Pests*. Syst. Assoc. Special vol. 39. Clarendon Press.
- MCPHERON, B. A.; SMITH, D. C. y BERLOCHER, S. H., 1988: Genetic differences between host races of the apple maggot fly. *Nature*, **336**: 64-66.
- MENKEN, S. B. J. y ULENBERG, S. A., 1987: Biochemical characters in Agricultural Entomology. *Agric. Zoo. Rev.* **2**: 305-359.
- NOWIERSKI, R. M.; McDERMOTT, G. J.; BUNNELL, J. E.; FITZGERALD, B. C. y ZENG, Z., 1996: Isozyme analysis of *Aphthona* species (Coleoptera: Chrysomelidae) associated with different *Euphorbia* species (Euphorbiaceae) and environmental types in Europe. *Ann. Ent. Soc. Amer.* **89**, 6: 858-868.
- 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 naturales del Sureste Español. *Bol. San. Veg. Plagas* **20**: 35-44.
- OCHANDO, M. D.; CALLEJAS, C.; RODA, P. y REYES, A., 1996: Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). Proceedings of the XX International Congress of Entomology, Firenze, Italy.
- OXFORD, G. S. y 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: Noctunidae): 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.
- PAYNE, J. A. y BERLOCHER, S. H., 1995: Phonological and electrophoretic evidence for a new blueberry-infesting species in the *Rhagoletis pomonella* sibling species complex. *Ent. Exp. Appl.*, **75**: 183-187.
- PERRING, T.; COOPER, A.; RODRÍGUEZ, R.; FARRAR, C. y BELLOWS, T., 1993: Identification of whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science*, **259**: 74-77.
- 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.; CALLEJAS, C.; RODA, P. y OCHANDO, M. D., 1996: Caracterización genética en *Ceratitis capitata* asociada a fruto hospedador. II. Análisis mediante RAPD-PCR. *Bol. San. Veg. Plagas*, **22**: 361-371.
- REYES, A.; LINACERO, R. y OCHANDO, M. D., 1997: Molecular genetic and integrated control: a universal genomic DNA microextraction method for PCR, RAPD, restriction and Southern analysis. *IOBC wprs Bulletin*, **20**: 274-284.
- RODA, P.; CALLEJAS, C.; REYES, A. y OCHANDO, M. D., 1996: Caracterización genética en *Ceratitis capitata* Wied. asociada a fruto hospedador. I. Análisis isoenzimático. *Bol. San. Veg. Plagas*, **22**: 71-78.
- RUIZ, A., 1948: *Fauna entomológica del olivo en España. Estudio sistemático biológico de las especies de mayor importancia económica*. CSIC Trabajos del Instituto Español de Entomología.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. y MANIATIS, T., 1989: *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd Edit. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- SCHIERWATER, B.; STREIT, B.; WAGNER, G. P. y DESALLE, R. (eds.), 1994: *Molecular Ecology and Evolution: Approach and Applications*. Birkhäuser V.
- SHEPPARD, W. S.; STECK, G. J. y MCPHERON, B. A., 1992: Geographic populations of the medfly may be differentiated by mitochondrial DNA variation. *Experientia*, **48**: 1010-1013.
- WHITE, I. M. y WANG, X. J., 1992: Taxonomic notes on some dacine (Diptera: Tephritidae) fruit flies associated with citrus, olives and cucurbits. *Bull. Ent. Res.*, **82**, 2: 275-279.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. y 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. y BULLOCK, D. W., 1994: Geographical origin of an introduced insect pest, *Listronotus bonariensis* (Kuschel), determined by RAPD analysis. *Heredity*, **72**: 412-419.

(Recepción: 14 enero 1998)

(Aceptación: 9 marzo 1998)