



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.

ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO ENTRE LINAJES MITOCONDRIALES
DEL CHAPULÍN *SPHENARIUM PURPURASCENS* (ORTHOPTERA:
PYRGOMORPHIDAE).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

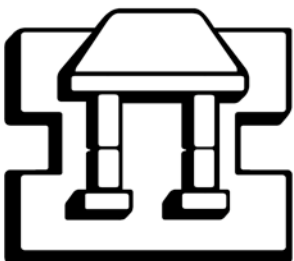
BIÓLOGO

PRESENTA:

OSCAR SALOMÓN SANABRIA URBÁN

DIRECTORA DE TESIS

DRA. SOFÍA SOLÓRZANO LUJANO



2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO ENTRE LINAJES MITOCONDRIALES DEL
CHAPULÍN *SPHENARIUM PURPURASCENS* (ORTHOPTERA:
PYRGOMORPHIDAE).



Macho de *Sphenarium purpurascens* ilustrado por Sanabria-Urbán O. S.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas a un mundo de conocimientos, cultura y personas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para el estudio a través del proyecto 57009.

A la Secretaría de Educación Pública (SEP) a través de la Comisión Nacional de Becas para la Educación Superior (CNBES) por su beca otorgada (043247).

A mi directora de tesis la Dra. Sofía Solórzano Lujano y a mi jurado, integrado por: Dr. Ken Oyama Nakagawa, Dr. Raúl Cueva del Castillo Mendoza, M en C. María del Pilar Villeda Callejas y Dr. Juan Nuñez Farfán, por su disposición y compromiso para asesorar mi trabajo.

A los M. en C. Laura Márquez Valdelamar (IB, UNAM) y Alejandro Monsalvo Reyes (UBIPRO, FESI) por su apoyo técnico y las facilidades prestadas durante el desarrollo experimental del estudio.

A mi compañera y amiga Daniela Reyes Covarrubias, por su importante contribución en el trabajo de campo y laboratorio.

Al Dr. Jorge Campos Contreras (UBIPRO, FESI), al M en C. Carlos Rosas Osorio y a mis amigos Eduardo Cruces Becerra, Alejandra Aline Pingarroni Martín del Campo y Carolina Molina Garay por su ayuda en el trabajo de campo.

Al Dr. Raymundo Montoya Ayala (UBIPRO, FESI) por sus asesorías para la utilización de SIG.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Raúl Cueva del Castillo por el conocimiento y la amistad que ha compartido conmigo. Especialmente, gracias por todo el apoyo y la solidaridad que me mostró cuando más lo necesite.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Carlitos, Alex, Carolina, Daniela, Jazmin, Veritos, Paco-Beto, Gustavo y Hector, por las alegrías y todo el compañerismo que siempre mostraron con migo, en la convivencia diaria en el Lab.

A mis primos Mari y Luis, mis tíos Antelmo, Andrés y Adelina, mis abuelos Conchita y Salvador y mis hermanos, por mostrarme el valor de la familia y ser un ejemplo a seguir. Gracias por todo su apoyo.

A ti Aline porque tu amistad, tu persona y tu cariño son la alegría y la ilusión más grande de mi vida.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres, a toda mi familia y a ti Aline, porque su apoyo, su comprensión y su amor son la razón y el motor que impulsan mi vida diaria. En especial, este trabajo te lo dedico a ti Mamá, porque tus enseñanzas son el cimiento de lo que soy ahora y porque con tu ejemplo y tu cariño me has enseñado a tener pasión y gusto por lo que hago. Por todo esto, a todos ustedes les doy las gracias.

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

MÉTODOS

RESULTADOS

DISCUSIÓN

LITERATURA CITADA

RESUMEN

El chapulín *Sphenarium purpurascens* es conocido en México por ser una plaga común para los cultivos de semillas y una fuente de alimento desde tiempos prehispánicos. A pesar de la importancia económica y la incertidumbre sobre los orígenes de esta especie hasta la fecha no se tienen datos moleculares sobre su variación genética que brinden elementos para entender su historia evolutiva intraespecífica y su estructura genética poblacional. Con esta finalidad, el presente trabajo realizó un análisis filogeográfico a partir de la variación genética encontrada en las secuencias de cuatro regiones del genoma mitocondrial (12S, 16S, Cyt b y COI). Se analizaron 94 individuos de nueve poblaciones del centro y una del sur de México. Se encontró que sólo las regiones 12S y COI fueron variables. La región COI mostró la mayor variación. Se identificaron en total 25 haplotipos, repartidos en las diez poblaciones, con porcentajes de distancias génicas entre 0.01 y 2.7 %. Sin embargo, los niveles de divergencia y de polimorfismo detectados en *S. purpurascens* fueron bajos en comparación con otros estudios. Las relaciones filogenéticas separaron a los 25 haplotipos en dos clados monofiléticos y en cinco grupos genéticos internos. El patrón de distribución geográfica de los grupos genéticos indicó una estrecha relación entre ocho de las poblaciones analizadas, que se ajustó a una estructura filogeográfica moderada y se identificó al menos un probable haplotipo ancestral. Por otro lado, también se identificaron dos poblaciones potencialmente aisladas desde tiempos históricos. Gran parte de las poblaciones analizadas mostraron niveles significativos de diferenciación. Aunque el flujo génico interpoblacional no se ajustó aun modelo de aislamiento por distancia si hay estructuración de la variación genética, donde ocurre un flujo génico considerable entre la mayoría de las poblaciones cercanas geográficamente. En general todos los resultados de este estudio concuerdan con una dispersión moderada de *S. purpurascens*.

INTRODUCCIÓN

El chapulín *Sphenarium purpurascens* Charpenter 1894 (Orthoptera; Pyrgomorphidae) es conocido en México como una de las principales plagas para los cultivos de maíz, frijol, ayocote, cebada y alfalfa (SARH-Tlaxcala, 1993; CESAVETLAX, 1995; Cerritos y Cano-Santana, 2008). Así como también por ser un elemento común en la dieta tradicional de muchos pueblos mexicanos desde tiempos precolombinos hasta la actualidad, principalmente en los estados de Oaxaca y Puebla (Grimaldo et al., 1958; Massieu et al., 1959; Cerritos y Cano-Santana, 2008). Este insecto áptero tiene un ciclo de vida anual que inicia con la eclosión de los huevos que ocurre durante la temporada de lluvias, desde mediados de mayo a principios de junio (Lugo-Olguín y Cueva del Castillo, 2007). Posteriormente, se distinguen cinco estadios ninfales que transcurren en un periodo de cinco a seis semanas antes de completar su desarrollo a adulto (Alfaro, 1995). En la fase adulta, este insecto permanece activo de 13 a 14 semanas (Alfaro, 1995). La máxima abundancia de individuos adultos se presenta a mediados de octubre y disminuye en meses posteriores (Serrano-Limón y Ramos-Elorduy, 1990). Durante estos meses, también ocurre el apareamiento, después del cual las hembras depositan sus huevos en el suelo donde permanecerán aproximadamente por 17 semanas hasta su eclosión (Serrano-Limón y Ramos-Elorduy, 1990).

Este chapulín tiene una distribución neotropical (Kevan, 1977). Su presencia está documentada principalmente en el centro y sur de México en las entidades federativas de Hidalgo, México, Distrito Federal, Michoacán, Querétaro, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Grimaldo et al., 1958; Kevan, 1977; Márquez-Mayaudón, 1962; Kevan, 1977; Cueva del Castillo et al., 1999a). No obstante, algunos autores consideran que esta especie podría estar presente en otros estados más al norte de México (Cerritos y Cano-Santana, 2008), así como también en otros países de América Central (Kevan, 1977), aunque no se cuenta con registro de esto.

El origen de *S. purpurascens* está lejos de ser claro. Según Kevan (1977) la biogeografía de los pyrgomorfidos, distribuidos en los trópicos del mundo, indica que el origen de este grupo es Gondwanico. Sin embargo, la subtribu Sphenariina, compuesta por los géneros *Sphenarium*, *Prospheia* y *Jaragua* (Pérez et al., 1995), parece tener un origen más reciente

debido a que esta subtribu se distribuye exclusivamente en México y América Central. Además los parientes más cercanos de esta subtribu se encuentran en Asia (en China y el Tíbet) en los miembros de la subtribu Mekongiana. Con base en esto, Kevan (1977) ha propuesto que el origen de *Sphenariina* en América se dio a partir de incursiones a este continente de antepasados asiáticos que atravesaron por el estrecho de Bering. Sin embargo, no explica en detalle cómo organismos plenamente tropicales se desplazaron por regiones templadas y árticas.

La mayoría de los estudios sobre *S. purpurascens* han trabajado con su biología general (e. g. Kevan, 1977; Alfaro, 1995), su biología reproductiva (e. g. Márquez-Mayaudón, 1962; Cueva del Castillo et al., 1999a y 1999b; Lugo-Olguín y Cueva del Castillo, 2007), su importancia alimenticia (e. g. Grimaldo et al., 1958; Ramos-Elorduy, 2004) y más recientemente, la diferenciación morfológica entre sus poblaciones (Galicia-Mendoza, 2002; Cueva del Castillo et al., en revisión). Sin embargo, hasta el momento no se tiene conocimiento sobre la magnitud de la variación genética, los procesos de flujo génico entre las poblaciones (estructura genética poblacional) o la historia evolutiva a nivel molecular de esta especie u otras especies cercanas.

La información obtenida del empleo de técnicas moleculares ha permitido inferir la estructura genética poblacional y la historia evolutiva de las especies (Avice, 2000). Entre estas técnicas destacan aquellas que permiten la detección de una alta variación como la secuenciación (Nei, 1987; Avice, 2000). Cuando esta técnica se aplica a la molécula del ADN mitocondrial (ADNmt), es posible comparar las similitudes y las diferencias entre poblaciones, examinar sus procesos de flujo génico e identificar linajes genealógicos dentro de las especies (Avice et al., 1987; Avice, 2000). En los animales esta molécula se hereda únicamente por vía materna (Lansman et al., 1983; Gyllensten et al., 1985) lo que permite rastrear la historia evolutiva entre linajes maternos sin que estén presentes procesos de recombinación. Las mutaciones en el ADNmt se estima que ocurren en tasas de cambio de hasta diez veces más que las del genoma nuclear (Brown et al., 1979; Brown et al., 1982). Además, al igual que otros en marcadores la evolución del ADNmt se considera neutra (Avice et al., 1987), lo cual implica que sus mutaciones no afectan la adecuación de los organismos.

La filogeografía estudia la distribución geográfica actual de los linajes genealógicos presentes en las poblaciones de una especie o en especies cercanas. El principal objetivo de esta disciplina es analizar los factores y procesos que determinan o influyen en esta distribución geográfica (Avice, 2000). El análisis y la interpretación de los patrones de distribución de los linajes genealógicos requiere la integración de los marcos teóricos y metodológicos de la biología evolutiva con la sistemática molecular; la genética de poblaciones, la demografía histórica y la ecología (Avice et al., 1987; Avice, 2000). Los análisis filogeográficos han permitido obtener información sobre cómo, cuándo y la magnitud con la que eventos geológicos (e.g. formación de montañas, elevación de continentes, glaciaciones), procesos ecológicos (e.g. colonización, extinción) y demográficos (e.g. incremento o reducción poblacional) han impactado en la distribución de la variación genética dentro de las poblaciones de una especie (Avice et al., 1987; Avice, 2000; Knowles, 2009). Así los estudios filogeográficos han permitido inferir la historia evolutiva intraespecífica y han formado una conexión directa entre los procesos microevolutivos y macroevolutivos, ya que las trayectorias históricas de herencia que se infieren de los linajes en las poblaciones pueden seguirse más allá del nivel de especie (Avice et al., 1987; Avice, 2000).

En filogeografía se ha propuesto una hipótesis principal, la cual establece que la mayoría de las especies se componen de poblaciones geográficas y sus integrantes ocupan ramas o grupos filogenéticos diferentes en una filogenia intraespecífica. Esta concordancia geográfica de los grupos filogenéticos se llama patrón filogeográfico y puede ser marcado o moderado (Avice et al., 1987; Avice, 2000). A partir de esta hipótesis se pueden derivar los siguientes corolarios: i) cuando las especies tienen un patrón filogeográfico moderado poseen historias de vida asociadas a la dispersión y no han tenido impedimentos al flujo génico y ii) un patrón filogeográfico marcado está asociado a la existencia de prolongadas barreras extrínsecas al proceso de flujo génico interpoblacional (Avice et al., 1987; Avice, 2000). Se ha demostrado que varias especies de animales tienen un patrón filogeográfico marcado, lo cual implica que los linajes genealógicos tienen una alta concordancia con su distribución geográfica. Lo anterior se ha encontrado tanto en especies de vertebrados (e.g. Seutin et al., 1993; Hendersson y Hedges, 1995; Ryan et al., 1996; da Silva y Patton, 1998; Perdices et al., 2002), como de invertebrados (e. g. Wilcox et al., 1997; Wen-Bin et al., 2004; Hochkirch y Görzing, 2009). No obstante, también hay casos en los que el patrón

filogeográfico es moderado (Bermingham y Avise, 1986) o incluso ausente (Chapco et al., 1992; McMillan y Bermingham, 1996; Zeh et al., 2003). Las explicaciones al origen de todos estos patrones filogeográficos se fundamentan principalmente en los niveles de flujo génico ocurrido entre las poblaciones y la presencia o la ausencia de barreras que establecen un aislamiento geográfico entre las poblaciones.

A partir de datos generados en distintos taxa, se han propuesto cinco grandes categorías de patrones filogeográficos, las que se obtienen construyendo filogenias derivadas del ADNmt (Avise et al., 1987; Avise, 2000). Estas categorías se conforman en dos grupos de acuerdo a los patrones de divergencia genética. El patrón de divergencia discontinuo indica una separación filogenética pronunciada entre linajes. El patrón de divergencia continuo indica una escasa separación filogenética entre linajes (Cuadro 1).

CUADRO 1

Cinco categorías de patrones filogeográficos propuestas por Avise et al. (1987) y Avise (2000).

CATEGORÍA	PATRÓN DE DIVERGENCIA GENÉTICA	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	CIRCUNSTANCIAS EVOLUTIVAS PROBABLES
I	Discontinuo	Los grupos filogenéticos se separan por muchas mutaciones y cada grupo filogenético ocupa regiones geográficas diferentes.	Barreras ancestrales al flujo génico o la extinción de linajes intermedios en especies de flujo génico limitado.
II	Discontinuo	Los grupos filogenéticos se separan por muchas mutaciones aunque ocupan las mismas regiones geográficas.	Admisión reciente a esas regiones y/o existencia de barreras intrínsecas en la especie
III	Continuo	Los grupos filogenéticos se diferencian escasamente entre sí. Sin embargo, ocupan regiones geográficas diferentes	Flujo génico limitado en ausencia de barreras geográficas
IV	Continuo	Los grupos filogenéticos se diferencian escasamente entre ellos y ocupan las mismas regiones geográficas	Flujo génico extensivo en ausencia de barreras geográficas
V	Continuo	Los grupos filogenéticos se diferencian escasamente entre sí, aunque ocupan las mismas regiones geográficas algunos grupos son más frecuentes en regiones específicas.	Flujo génico intermedio en ausencia de barreras geográficas

Algunos estudios filogeográficos en ortópteros ápteros parecidos a *S. purpurascens* en sus historias de vida (e.g. *Deinacrida connectens*, Trewick et al., 2000; *Loxoblemmus appendicularis*, Wen-Bin et al., 2004; *Dollichopoda sp*, Allegrucci et al., 2005; *Melanopus oregonensis*, Knowles y Richards, 2005; *Arminda sp*, Hochkirch y Görzing, 2009), han encontrado que existe un patrón filogeográfico marcado y gran diferenciación genética entre sus poblaciones. Esta condición ha sido asociada a la presencia de barreras de aislamiento geográfico claras entre las poblaciones. Así, los resultados de estos trabajos permiten establecer algunas ideas sobre la posible estructura filogeográfica de *S. purpurascens*. Por ejemplo, si la dispersión es relativamente baja como resultado de la incapacidad de vuelo de este chapulín, es probable que las poblaciones de esta especie se mantengan aisladas genéticamente (si existen barreras biogeográficas entre ellas). Sin embargo, el patrón de distribución actual de la especie parece indicar la ausencia de barreras de aislamiento geográfico. Por tal motivo se esperaría encontrar en *S. purpurascens*: i) que las poblaciones muestren un patrón filogeográfico moderado, con linajes poblacionales ligeramente diferenciados pero restringidos a regiones geográficas diferentes (Categoría III, Cuadro 1), y ii) que la estructura genética interpoblacional se ajuste a un modelo de flujo génico de aislamiento por distancia, donde las poblaciones geográficamente cercanas sean también las genéticamente más cercanas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer las relaciones filogeográficas entre linajes mitocondriales de diez poblaciones de México del chapulín *Sphenarium purpurascens* con la finalidad de inferir sus procesos evolutivos.

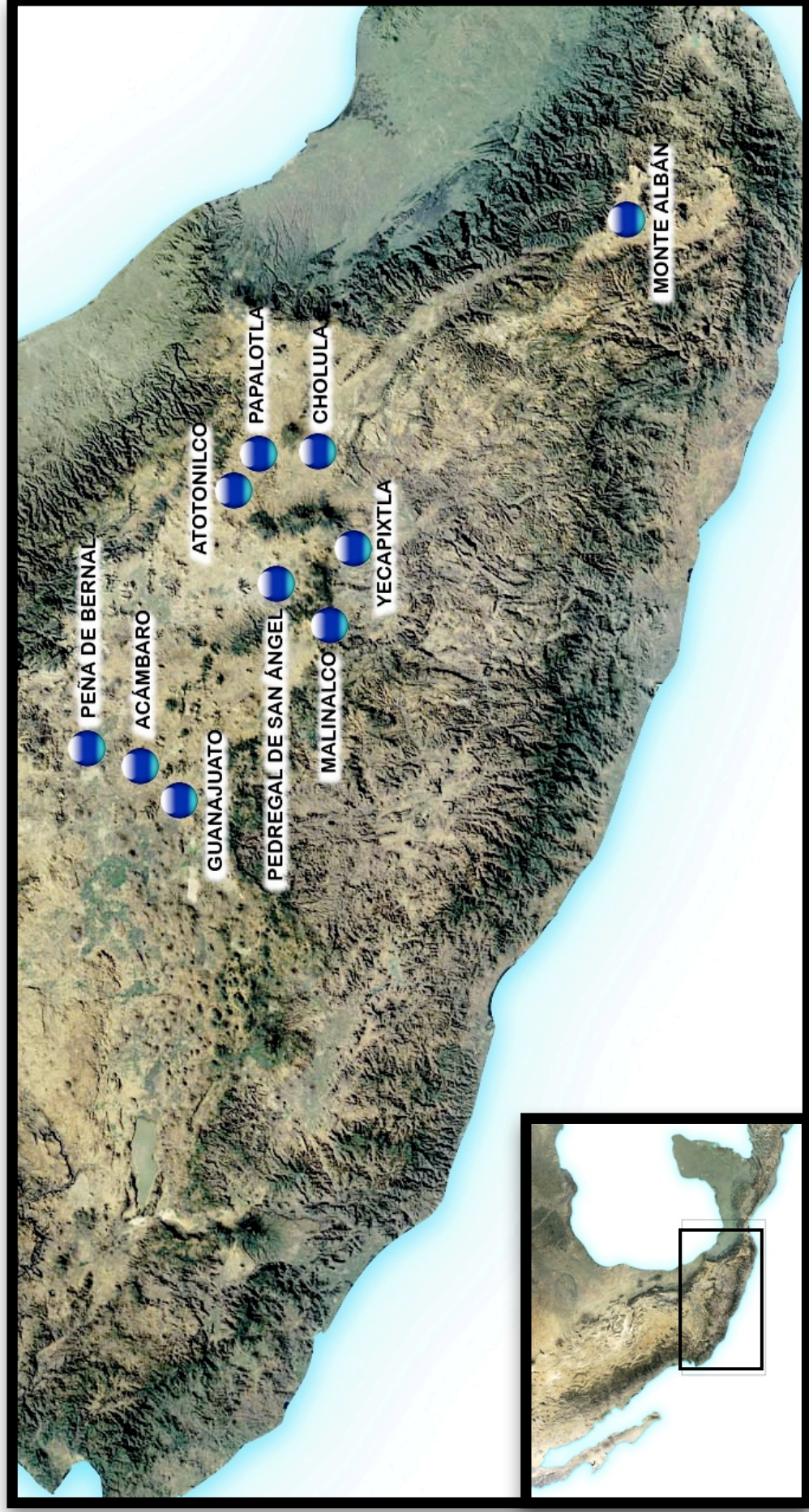
OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la variación genética mitocondrial de la subunidad I de la citocromo oxidasa en diez poblaciones mexicanas de *Sphenarium purpurascens* para determinar un patrón filogeográfico.

2. Analizar la estructura genética en diez poblaciones mexicanas de *Sphenarium purpurascens* para inferir el patrón de flujo génico.

FIGURA 1

Mapa de distribución geográfica de las poblaciones del chapulín *S. purpurascens* en este estudio.



AISLAMIENTO DEL ADN

El ADN genómico total de los individuos de cada población fue aislado de acuerdo con las especificaciones del DNeasy Blood & Tissue kit (QUIAGEN). Para evitar contaminaciones posibles con otros genomas (e.g. parásitos del tracto digestivo) se utilizó exclusivamente el músculo del fémur III de cada individuo. El ADN genómico total aislado se visualizó en geles de agarosa al 0.8 % teñidos con bromuro de etidio y luz ultravioleta en el equipo Multiimager tmLight Cabinet (Alpha Innotec Corporation). Cada muestra de ADN se almacenó a - 20 °C para las reacciones subsecuentes.

AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES DEL ADNMT MEDIANTE PCR

Debido a que no existen primers específicos para *S. purpurascens*, se utilizaron los diseñados para otras especies de ortópteros (Cuadro 4). A partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se amplificaron las regiones blanco correspondientes a las subunidades 12S y 16S del ARN ribosomal, la subunidad del citocromo b (Cit b) y la subunidad de la citocromo oxidasa I (COI), del ADNmt. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: inicialmente se desnaturalizó el ADN por 5 min a 94 °C. Posteriormente, cada ciclo de PCR consistió en 30 s de desnaturalización a 94 °C, 45 s de alineamiento a 50, 55 ó 58 °C (dependiendo de la temperatura de alineamiento (T_m) de los primers, Cuadro 4) y 2.5 min de extensión a 72 °C. Después de 35 ciclos, se dio un tiempo de extensión final por 5 min a 72 °C. Estas condiciones de PCR se establecieron con base en las indicaciones de los autores de los primers (Kocher et al., 1989; Flook y Rowell, 1996; Zhang y Hewitt, 1997).

Los productos de la amplificación de PCR se visualizaron con luz ultravioleta en geles de agarosa al 1.2 % teñidos con bromuro de etidio, en el equipo Multiimager tmLight Cabinet (Alpha Innotec Corporation). Dado que se obtuvieron bandas únicas en la amplificación, las reacciones de PCR fueron purificadas directamente siguiendo las especificaciones del PCR Purification Kit (QUIAGEN).

CUADRO 4

Regiones blanco del ADNmt utilizadas en *S. purpurascens*.

REGIÓN BLANCO	TAMAÑO ESPERADO (PB)	<i>T_m</i> (°C)	ID DEL PRIMER	SECUENCIA	FUENTE
12S	380	50	SRJ14233 SRN14588	5'-AAGAGCGACGGGCGATGTGT-3' 5'-AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT-3'	Flook y Rowell (1996)
16S	550	55	LNR13398 LNI12887	5'-CGCCTGTTTAAACAAAAACAT-3' 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	Flook y Rowell (1996)
Cit b	432	50	L14841 H15149	5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' 5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCTCA-3'	Kocher et al. (1989)
COI	1300	58	C1J1763 TL2N3014	5'-TATAGCATTCCCACGAATAAATAA-3' 5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3'	Zhang y Hewitt (1997)

SECUENCIACIÓN

Los productos de PCR purificados se secuenciaron siguiendo las instrucciones del Big Dye Terminator v.3.1. Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Las reacciones se prepararon para los dos sentidos de cadena (forward: 5' \Rightarrow 3' y reverse: 3' \Rightarrow 5') de cada muestra. En la PCR de secuenciación inicialmente se desnaturizó el ADN a 96 °C durante 1 min. Cada ciclo de PRC consistió en: desnaturalización a 96 °C durante 10 s, alineación por 5 s a la *T_m* de cada primer y extensión a 60 °C por 4 min. Después de 25 ciclos se dio una extensión final de 5 min a 60 °C. Cada reacción se purificó usando columnas Centrisep (Applied Biosystems) con 600 μ L de sephadex G-50 (Sigma). Cada muestra fue purificada, liofilizada y desnaturalizada para realizar la electroforesis en el secuenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Los electroferogramas obtenidos se visualizaron con el programa PHYDE 0992 (Müller et al., 2006). Se cotejaron los dos sentidos de las cadenas de cada reacción para confirmar la autenticidad de las secuencias así como la posibilidad de eliminar ambigüedades. Posteriormente se alinearon los haplotipos obtenidos usando el programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997).

SELECCIÓN DE REGIÓN VARIABLE

Preliminarmente se eligieron al azar tres individuos de cuatro poblaciones diferentes. Se obtuvieron secuencias de las cuatro regiones mitocondriales (12S, 16S, Cit b y COI) de

estos individuos. Las secuencias resultantes fueron comparadas a fin de encontrar la región que mostrara la variación genética más alta. Se observó que solamente las regiones 12S y COI mostraron variación genética interpoblacional. Esta variación fue más alta en la región COI, por ello se secuenció la COI de 94 individuos repartidos entre las diez poblaciones de estudio (PÑ: n= 9, AC: n= 9, GU: n= 10, PD: n= 8, ML: n= 10, AT: n= 10, PP: n= 10, YC: n= 10, CH: n= 9 y MA: n= 9).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y FILOGENÉTICOS DE LAS SECUENCIAS DE ADNMT

Se identificaron todos los haplotipos presentes en las secuencias alineadas de la región COI. Con el programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007) se calcularon las distancias genéticas entre los haplotipos mediante el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura-2-parámetros (K2P). Con este mismo programa, se llevaron a cabo los análisis filogenéticos, utilizando como grupo externo las 871pb de la región COI de *Dolichopoda baccetti* (Raphidophoridae; Orthoptera) disponibles en el GenBank y las secuencias de los haplotipos identificados en *S. purpurascens*. Se emplearon métodos de construcción de árboles filogenéticos basados en distancias genéticas y verosimilitud como el método de distancia promedio (UPGMA) basado en K2P y el método de máxima parsimonia (MP). Cada árbol fue asociado a un soporte bootsatrap de 1000 réplicas. También se construyó una red de contracción mínima o minimum spanning network (MSN) con los haplotipos identificados de COI, con base en sus distancias genéticas basadas en K2P y sus frecuencias haplotípicas, empleando el programa ARLEQUIN 409 (Excoffier et al., 2005).

ANÁLISIS POBLACIONALES

Empleando el programa DNASP 5.10.00 (Librado y Rozas, 2009) se midió la variación genética intrapoblacional mediante la diversidad haplotípica (h), definida como la probabilidad de que dos individuos tomados al azar en un población pertenezcan a linajes mitocondriales distintos (Nei, 1987) y la diversidad nucleotídica (π), que es el número promedio de las diferencias por posición nucleotídica entre pares comparados de haplotipos mitocondriales (Nei, 1987). Con este programa también se estimó la divergencia neta entre poblaciones (D_a), definida como el número neto de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones (Nei, 1987) y el número promedio de diferencias nucleotídicas entre poblaciones. Con el programa ARLEQUIN 409 (Excoffier et al., 2005) se evaluó el grado de diferenciación genética interpoblacional (F_{st}) y la estructura genética poblacional

aplicando un análisis de variación molecular (AMOVA). Para este último análisis las poblaciones fueron organizadas en tres grupos de acuerdo a su cercanía geográfica: grupo norte (Peña de Bernal, Acámbaro y Guanajuato), grupo centro (Pedregal de San Ángel, Malinalco, Yecapixtla, Atotonilco, Papalotla y Cholula) y grupo sur (Monte Albán). Las distancias geográficas entre las poblaciones fueron calculadas con el programa ARCVIEW 3.0.3. (ESRI, 2000). Para conocer la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de los haplotipos se usó la prueba de Mantel implementada en el programa MANTELTEST 2.0. (Liedloff, 1999).

RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE LAS REGIONES AMPLIFICADAS

Se logró amplificar y secuenciar todas las regiones ensayadas en la especie. Los tamaños obtenidos de cada región no difirieron mucho de lo esperado (12S: 330 pb; 16S: 553 pb; Citb: 378 pb y COI: 1069 pb). Los sitios polimórficos de la región COI representaron el 6.2 % del total de la secuencia. De las 1069 pb obtenidas de esta región, se encontró que 66 sitios fueron polimórficos de los cuales 49 fueron sitios parsimoniosamente informativos.

HAPLOTIPOS ENCONTRADOS Y SUS RELACIONES FILOGENÉTICAS

Se identificaron 25 haplotipos con la región COI de los 94 individuos analizados. El número de haplotipos por población varió de uno a seis. Las diversidades haplotípica (h) y nucleotídica (π) de las poblaciones tuvieron los valores más altos en Atotonilco, Monte Albán y Acámbaro, y los valores más bajos en el Pedregal de San Ángel y Yecapixtla (Cuadro 5).

CUADRO 5

Diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) de la región COI en las poblaciones analizadas.

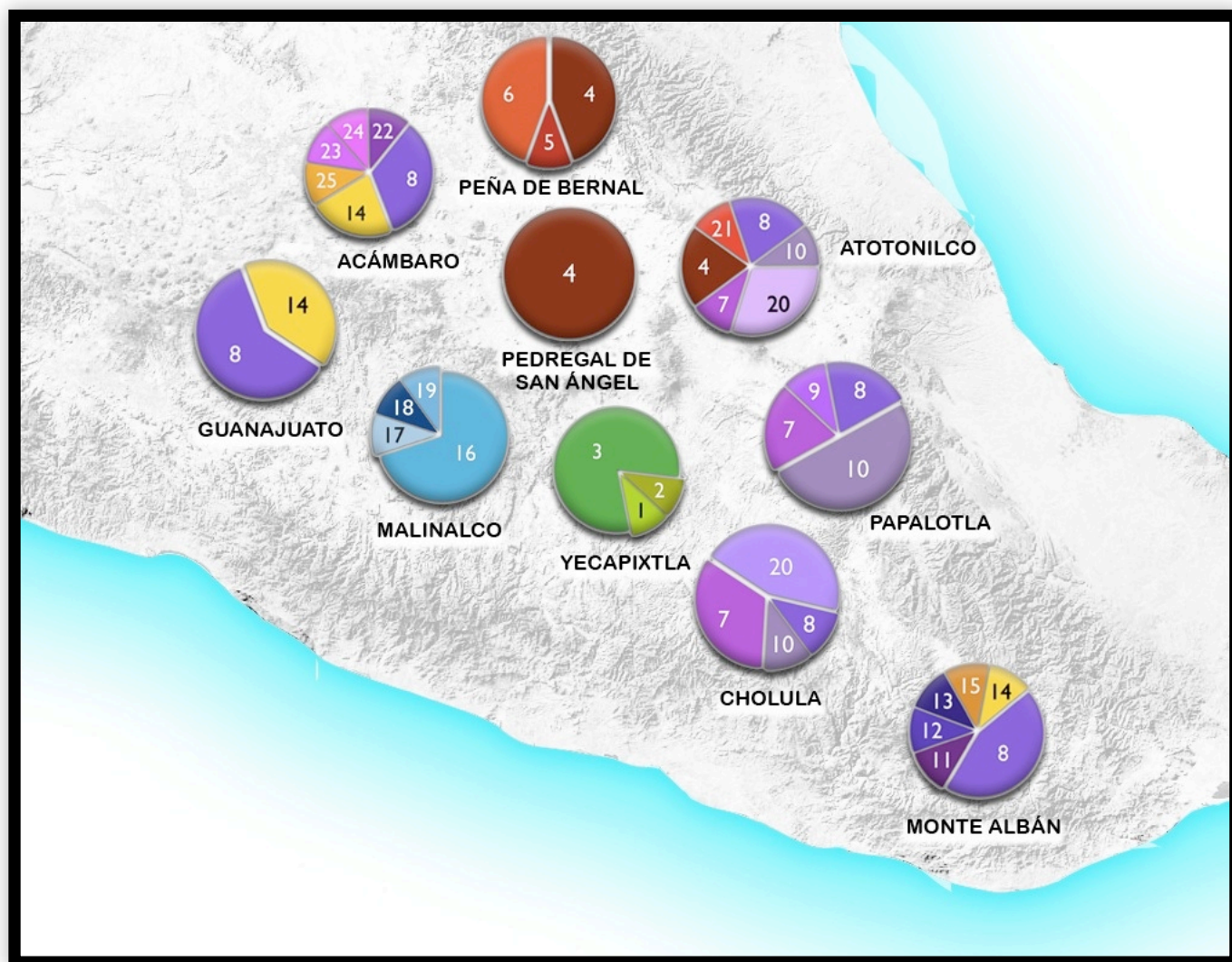
	ML	YC	PÑ	PD	AT	PP	CH	MA	AC	GU	TOTAL
TAMAÑO DE MUESTRA	10	10	9	8	10	10	9	9	9	10	94
NÚMERO DE HAPLOTIPOS	4	3	3	1	6	4	4	6	6	2	25
h	0.533	0.378	0.667	0.0	0.889	0.733	0.75	0.833	0.667	0.533	0.91375
π	0.0045	0.0004	0.0009	0.0	0.0082	0.0014	0.0012	0.0053	0.0046	0.0040	0.01358

La distribución geográfica de los haplotipos (Figura 2) muestra que a excepción de Malinalco y Yecapixtla (con haplotipos únicos) todas las demás poblaciones compartieron al menos uno de los haplotipos de mayor frecuencia (haplotipos 8, 4, 14, 10, 7 y 20). Sin embargo, algunos de los haplotipos compartidos se restringieron a poblaciones cercanas geográficamente, a menos de 40 km de distancia (haplotipos 7, 10 y 20 en Atotonilco,

Papalotla y Cholula). En contraste, otros haplotipos se compartieron entre poblaciones más distantes geográficamente, a más de 240 km de distancia (haplotipo 4 en Peña de Bernal, el Pedregal de San Ángel y Atotonilco; haplotipos 8 y 14 en Acámbaro, Guanajuato y Monte Albán). El haplotipo 8 se identificó como el de más amplia distribución geográfica ya que se presentó en el 60 % de las poblaciones (Acámbaro, Guanajuato, Atotonilco, Papalotla, Cholula y Monte Albán) y fue el más frecuente en este estudio (presente en 19.1 % de los individuos analizados). Por otro lado, también se encontraron haplotipos restringidos a poblaciones particulares (haplotipos 22, 23, 24 y 25 en Acámbaro; 11, 12, 13 y 15 en Monte Albán; 5 y 6 en Peña de Bernal; 21 en Atotonilco y 9 en Papalotla).

FIGURA 2

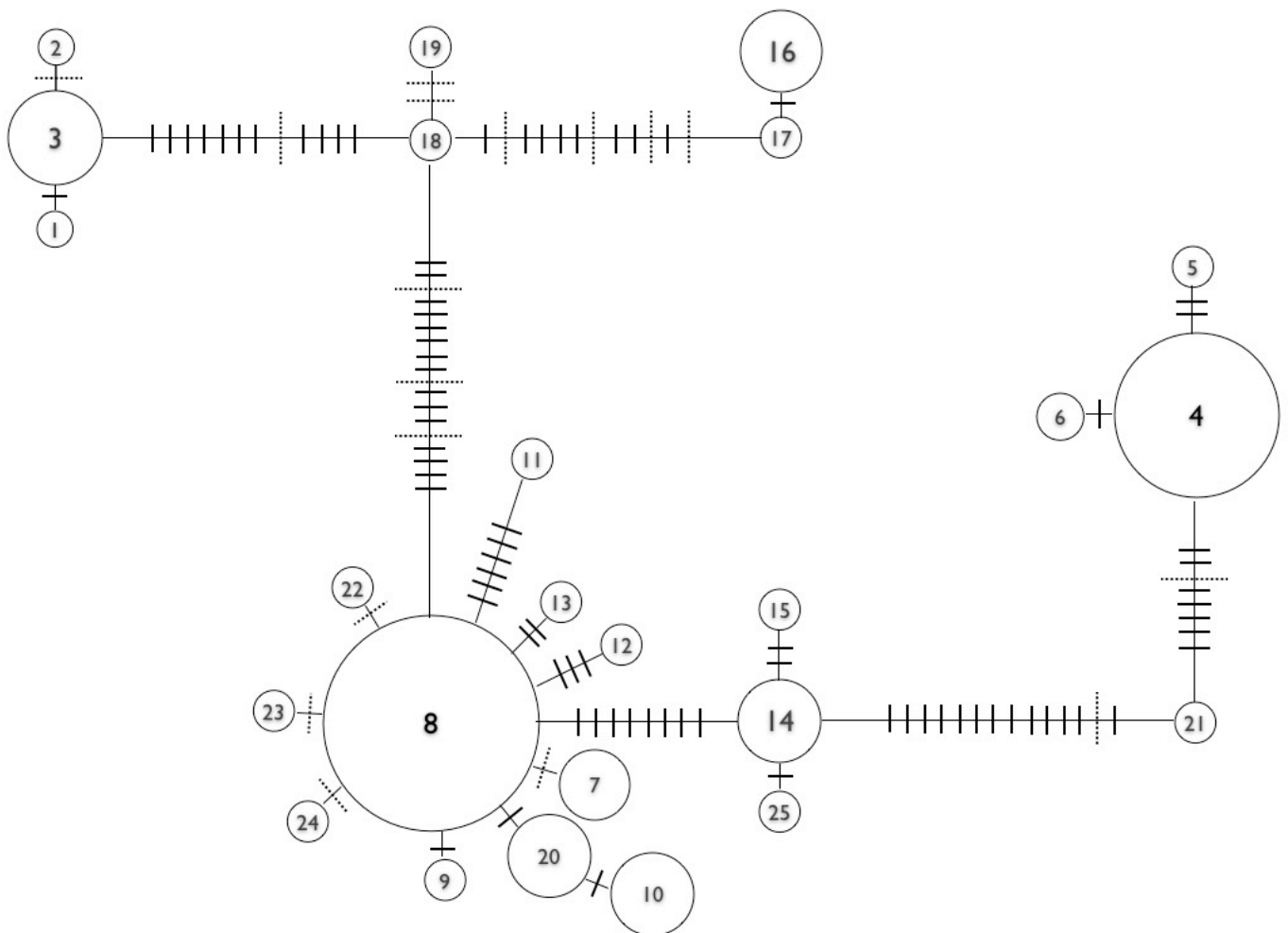
Distribución geográfica de los 25 haplotipos de COI en las poblaciones de estudio. La frecuencia relativa de cada haplotipo en la población está representada por la proporción que ocupa del círculo. Imagen modificada de CONABIO 2008.



Las comparaciones pareadas entre las distancias genéticas de los haplotipos, estimadas con K2P, mostraron porcentajes de diferenciación que van de 0.01 a 2.7 % del total de la secuencia. La mayor parte de los haplotipos de menor frecuencia se diferenciaron por una o hasta seis mutaciones de los más frecuentes (haplotipos 8, 4, 14 y 3), formando un patrón de estrella en la MSN (Figura 3). También se observó que los haplotipos más frecuentes se diferenciaron entre si por más de ocho mutaciones, generalmente transiciones. El mayor número de transversiones se presentó entre los haplotipos provenientes de las poblaciones de Yecapixtla (haplotipos 1, 2 y 3) y Malinalco (haplotipos 16, 17, 19 y 18).

FIGURA 3

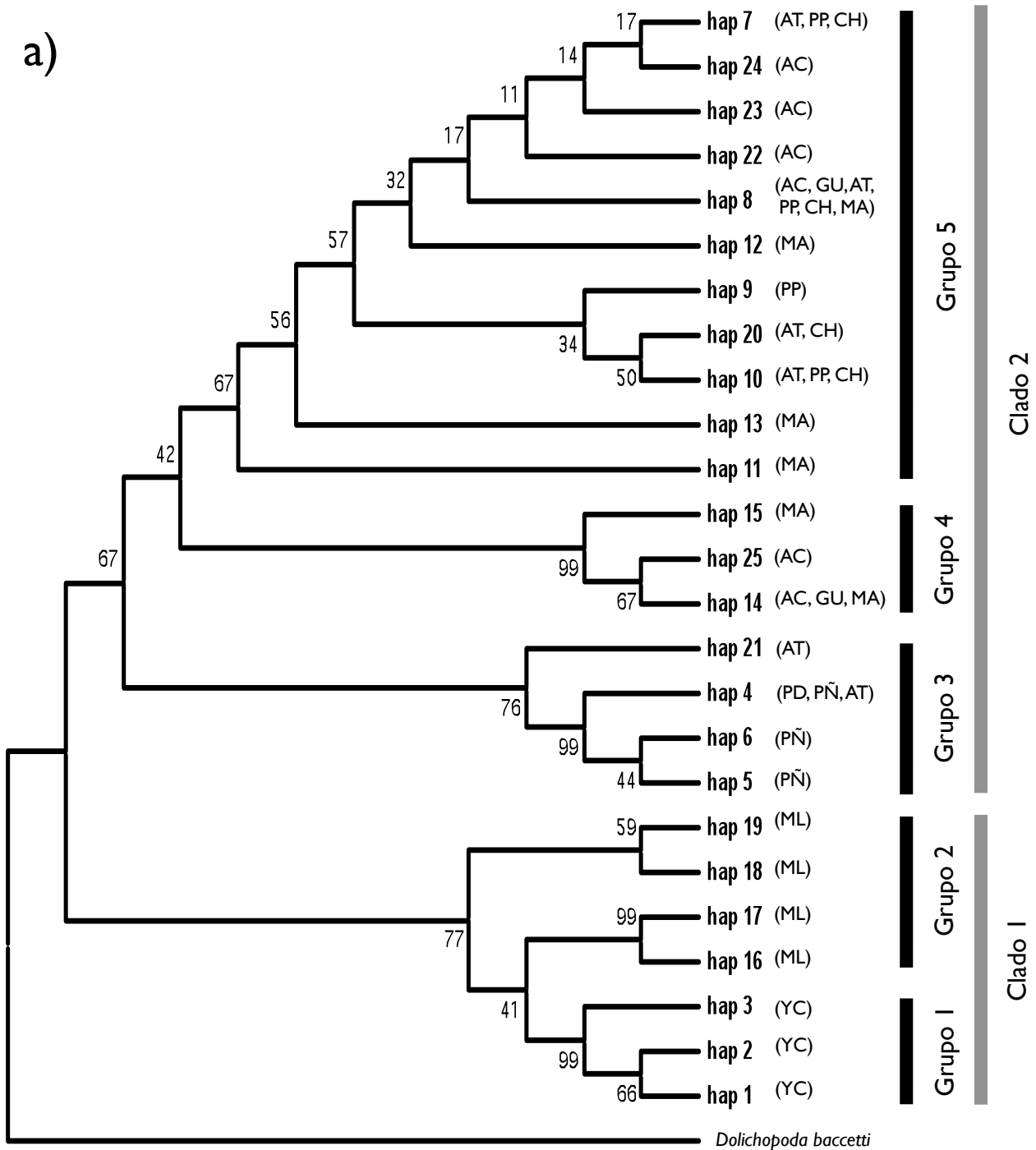
MSN entre los 25 haplotipos encontrados en los 94 individuos de las diez poblaciones a partir de COL. La longitud de las líneas entre haplotipos (círculos) refleja el grado de diferenciación genética. El número de mutaciones de transición (|) y transversión (|·|) están representadas por las líneas transversales a las líneas que conectan a los haplotipos. El tamaño de cada círculo indica la frecuencia relativa de cada haplotipos en la población total.



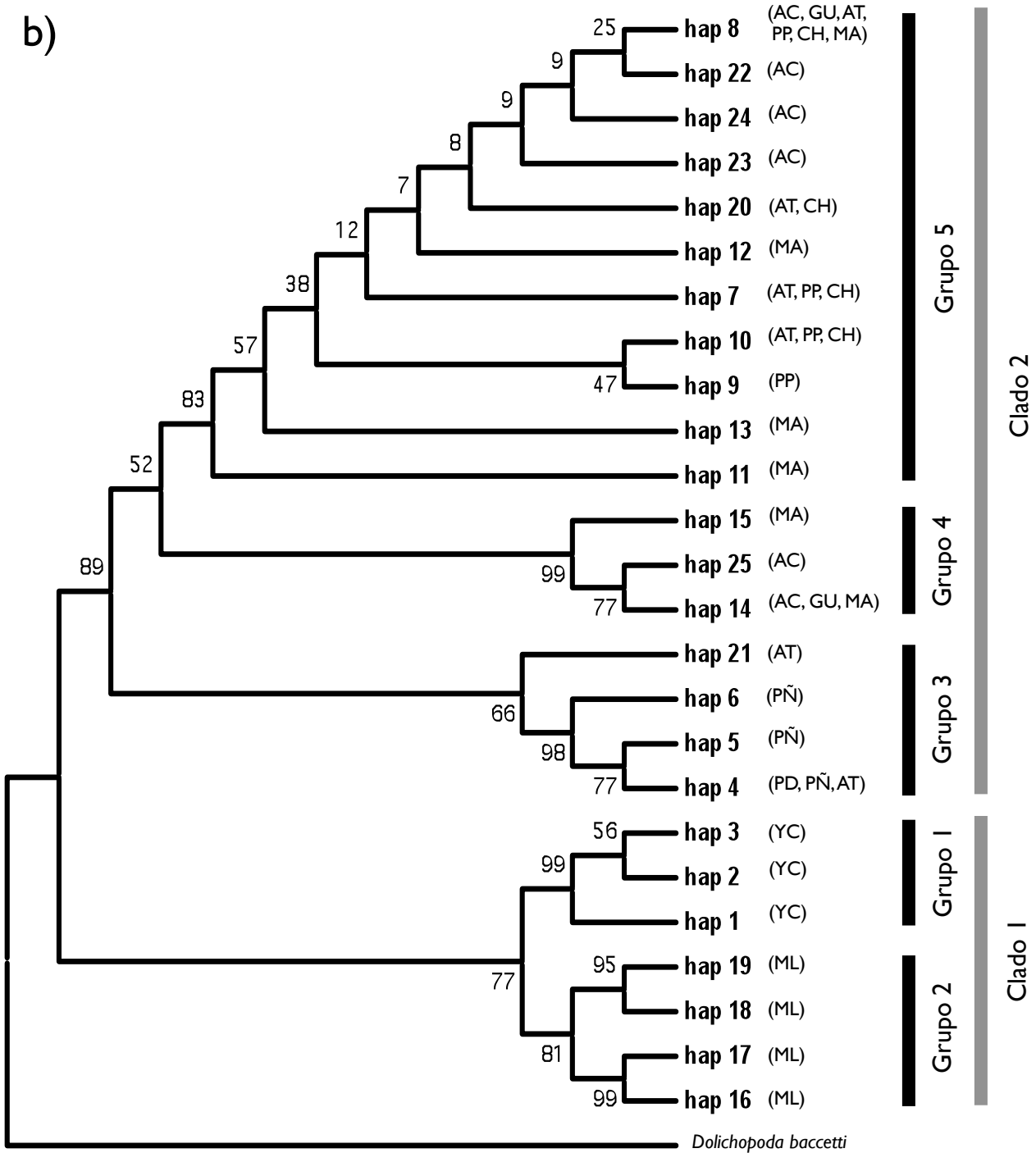
Los dos árboles filogenéticos construidos con los 25 haplotipos de COI mediante los métodos de MP y UPGMA mostraron topologías similares (Figura 4). En ambas filogenias, los haplotipos se separaron en dos clados monofiléticos y se formaron cinco grupos genéticos al interior de estos clados (sustentados por valores de bootstrap > 50 %). Sin embargo, la resolución filogenética fue baja dentro de estos grupos, debido al escaso número de mutaciones que diferenció a sus haplotipos. Los haplotipos provenientes de las poblaciones de Yecapixtla y Malinalco conformaron el clado 1, donde los haplotipos de cada localidad formaron un grupo genético individual dentro de este clado (grupo 1 y 2, respectivamente). Los haplotipos provenientes de las ocho poblaciones restantes conformaron el clado 2, el cual se separó en tres grupos genéticos (Grupos 3, 4 y 5). Se observó que los grupos 4 y 5 estaban más estrechamente relacionados entre sí que con el grupo 3. Aunque todos los grupos dentro del clado 2 se integraron de haplotipos compartidos entre algunas poblaciones, cabe señalar que el grupo 3 se formó exclusivamente de haplotipos provenientes de Peña de Bernal, el Pedregal de San Ángel y Atotonilco (haplotipos 4, 5, 6 y 21) que son poblaciones colindantes.

FIGURA 4

Árboles filogenéticos consenso de MP (a) y UPGMA (b) generados para los haplotipos obtenidos con la región COI en las diez poblaciones de estudio (Acámbaro (AC), Guanajuato (GU), Peña de Bernal (PÑ), el Pedregal de San Ángel (PD), Malinalco (ML), Yecapixtla (YC), Atotonilco (AT), Papalotla (PP), Cholula (CH) y Monte Albán (MA), utilizando como grupo externo a *Dolichopoda baccetti* (Raphidophoridae; Orthoptera). Los valores de soporte estadístico bootstrap se muestran en los inicios de cada rama.



b)



ESTRUCTURA POBLACIONAL

La divergencia genética neta entre las poblaciones (Da) varió de -0.0003 a 2.5 % (Cuadro 6). Los valores más altos de divergencia genética resultaron de las comparaciones entre Malinalco y Yecapixtla con el resto de las poblaciones (valores de Da entre 1.6 y 2.5 %). Las poblaciones de Peña de Bernal y el Pedregal de San Ángel mostraron valores de Da entre 0.7 y 1.5 % cuando se compararon con Acámbaro, Guanajuato, Atotonilco, Papalotla, Cholula y Monte Albán. En contraste, cuando estas últimas seis poblaciones se compararon entre sí, la divergencia genética fue más baja (valores de Da entre -0.0003 y 0.15 %).

CUADRO 6

Divergencia genética neta Da entre las poblaciones (arriba de la diagonal) y el número promedio de diferencias nucleotídicas entre las poblaciones (debajo de la diagonal).

	ML	YC	PÑ	PD	AT	PP	CH	MA	AC	GU
ML	--	0.01301	0.0228	0.02265	0.01668	0.01937	0.01954	0.01765	0.01791	0.01788
YC	16.5	--	0.02541	0.02526	0.02041	0.02393	0.02372	0.02105	0.02152	0.02139
PÑ	27.267	27.867	--	0.00016	0.0077	0.01546	0.01525	0.01299	0.01303	0.01292
PD	26.6	27.2	0.667	--	0.00769	0.01551	0.01531	0.01304	0.0131	0.01297
AT	24.6	26.4	13.111	12.6	--	0.00097	0.0008	0.00059	0.00077	0.00098
PP	23.832	26.5	17.744	17.3	6.14	--	0.00011	0.0009	0.00116	0.00154
CH	23.911	26.2	17.444	17	5.867	1.478	--	0.0007	0.00096	0.00134
MA	24.089	25.533	17.222	16.778	7.844	4.522	4.222	--	-0.00026	-0.00014
AC	23.978	25.644	16.877	16.444	7.644	4.411	4.111	5	--	-0.00037
GU	23.64	25.2	16.444	16	7.56	4.5	4.2	4.822	4.178	--

La mayoría de las comparaciones entre poblaciones produjeron valores significativos de diferenciación genética interpoblacional ($F_{ST} \geq 0.1$; $P \leq 0.05$) (Cuadro 7). Esta diferenciación genética fue notablemente más pronunciada cuando se compararon las poblaciones de Malinalco, Yecapixtla, el Pedregal de San Ángel o Peña de Bernal con las demás poblaciones ($F_{ST} \geq 0.6$; $P \leq 0.000001$). También se observó que algunas poblaciones cercanas geográficamente mostraron una alta similitud genética. Por ejemplo, no se encontró diferenciación genética significativa entre las poblaciones de Atotonilco, Papalotla y Cholula ($F_{ST} \leq 0.17$; $P > 0.05$), entre Acámbaro y Guanajuato ($F_{ST} = -0.09$; $P = 0.69$) o

entre el Pedregal de San Ángel y Peña de Bernal ($F_{ST} = 0.22$; $P = 0.15$). Sin embargo, cuando se compararon las poblaciones de Acámbaro y Guanajuato con Monte Albán tampoco se encontraron valores de F_{ST} significativos ($F_{ST} \leq 0.02$; $P > 0.05$), a pesar de su lejanía geográfica (> 500 km).

CUADRO 7

Índices de diferenciación interpoblacional F_{ST} entre pares comparados de poblaciones utilizando como método de distancia genética K2P (arriba de la diagonal). Los números en negritas son aquellos que no fueron significativos ($P > 0.05$). Por debajo de la diagonal se observan los valores de significancia, donde * representa valores altamente significativos ($P \leq 0.000001$).

	PÑ	AC	GU	ML	YC	PD	CH	AT	PP	MA
PÑ	--	0.827	0.836	0.892	0.976	0.23	0.936	0.617	0.931	0.808
AC	*	--	-0.095	0.801	0.903	0.844	0.251	0.103	0.293	-0.0556
GU	*	0.690	--	0.811	0.909	0.853	0.331	0.139	0.366	-0.0284
ML	*	*	*	--	0.844	0.901	0.871	0.727	0.871	0.786
YC	*	*	*	*	--	0.992	0.970	0.828	0.966	0.888
PD	0.150	*	*	*	*	--	0.960	0.622	0.954	0.823
CH	*	*	*	*	*	*	--	0.134	0.078	0.178
AT	*	0.063	*	*	*	*	0.262	--	0.170	0.078
PP	*	*	*	*	*	*	0.298	0.063	--	0.224
MA	*	0.693	0.531	*	*	*	*	0.199	*	--

La estructura genética poblacional no se ajustó al modelo planteado en el AMOVA. La mayor fuente de variación estuvo entre las poblaciones que conformaron los grupos (96.36 %) y en segundo lugar la variación dentro de las poblaciones (22.75 %) (Cuadro 8). La diferenciación genética en las poblaciones analizadas no se ajustó a un modelo de flujo génico de aislamiento por distancia ya que no hay correlación entre la distancia genética de los haplotipos y la distancia geográfica entre las poblaciones (Prueba de Mantel: $r^2 = -0.036$; $P = 0.168$) (Figura 5).

CUADRO 8

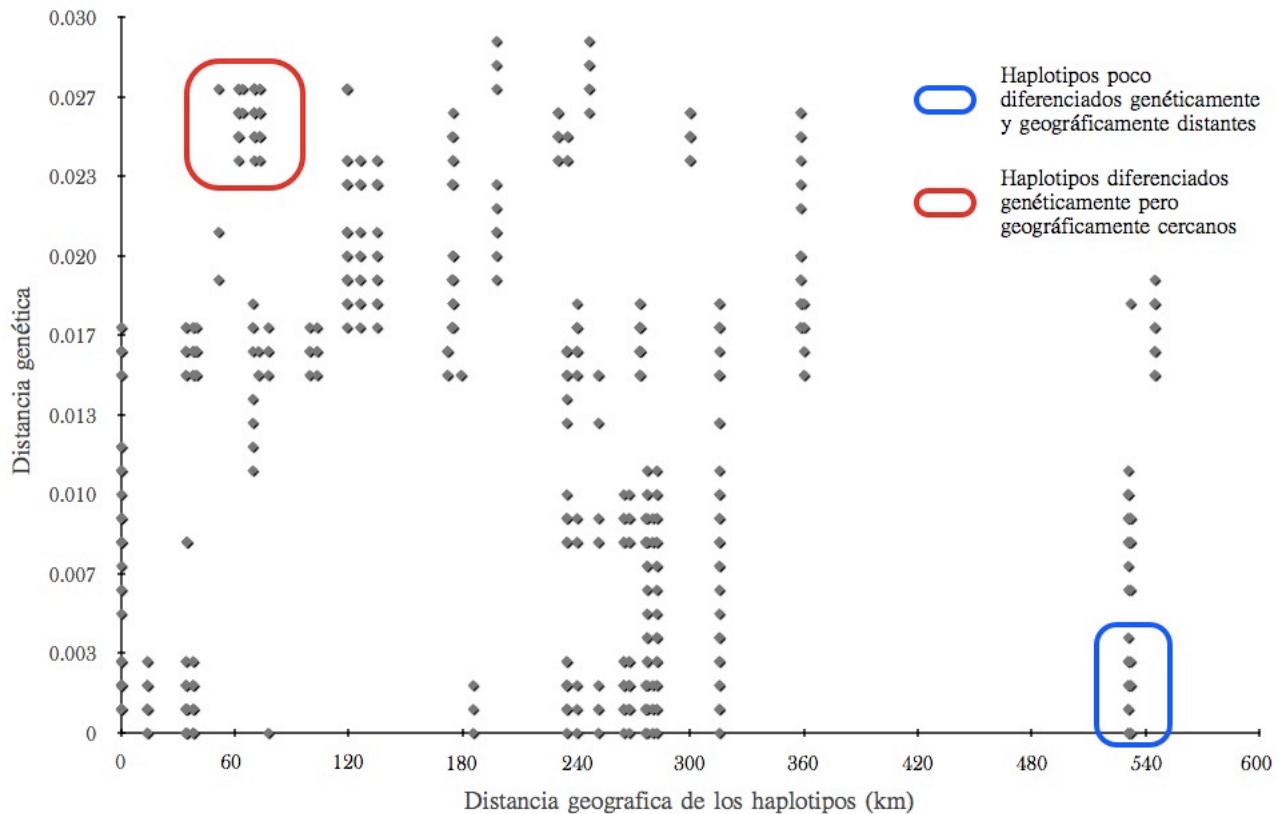
Análisis de variación molecular (AMOVA) entre los tres grupos de poblaciones (Grupo norte: Peña de Bernal, Acámbaro y Guanajuato; Grupo centro: Pedregal de San Ángel, Malinalco, Yecapixtla, Atotonilco, Papalotla y Cholula y Grupo sur: Monte Albán).

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	COMPONENTES DE VARIANZA	PORCENTAJE DE VARIACIÓN
ENTRE LOS GRUPOS	2	63.869	- 1. 40951 Va	-19.1
ENTRE LAS POBLACIONES DENTRO DE LOS GRUPOS	7	481.531	7.10917 Vb	96.36
DENTRO DE LAS POBLACIONES	84	140.962	1.67812 Vc	22.75
TOTAL	93	686.363	7.37778	

FIGURA 5

Gráfica de correlación entre la distancia genética de los haplotipos y su distancia geográfica. Se observa que no hay una tendencia clara en los valores, ya que los haplotipos genéticamente más distantes están geográficamente cercanos. No obstante, los haplotipos más cercanos genéticamente son los más lejanos geográficamente entre sí.

Correlación entre distancia genética vs distancia geográfica



DISCUSIÓN

VARIACIÓN GENÉTICA EN *S. PURPURASCENS*

Otros estudios en insectos (e. g. Kambhampati et al., 1996; Wilcox et al., 1997; Zeh et al., 2003; Wen-Bin et al., 2004; Allegrucci et al., 2005; Hochkirch y Görzing, 2009) han encontrado que las regiones mitocondriales 12S, 16S, Citb y COI (en fragmentos similares a los utilizados aquí) pueden presentar o no variación genética a nivel interpoblacional. El presente trabajo exploró la variación genética de estas cuatro regiones mitocondriales en *S. purpurascens* encontrando que sólo las regiones 12S y COI fueron variables y que la región COI tuvo los niveles más altos de variación genética, con valores de divergencia entre haplotipos de 0.01 hasta 2.5 %. Estos valores de divergencia son comparativamente más bajos con los estimados en otros ortópteros ápteros con una estructura filogeográfica marcada como *Melanoplus oregonensis* (Knowles y Richards, 2005) *Loxoblemmus appendicularis* (Wen-Bin et al., 2004) y *Deinacrida connectens* (Trewick et al., 2000) con valores de divergencia entre haplotipos tan altos como 3, 3.2 y 7.6 %, respectivamente. Sin embargo, niveles de divergencia genética más bajos que los encontrados en *S. purpurascens* se han documentado para insectos voladores con estructura filogeográfica ausente como el arlequín *Acrocinus longimanus* (Zeh et al., 2003) o acrididos migratorios como *Melanoplus sanguinipes* (Chapco et al., 1992) con valores de divergencia entre haplotipos no mayores a 1.5 %. Estos datos indican que la divergencia genética observada en *S. purpurascens* es intermedia entre especies con patrones filogeográficos marcados y especies con estructura filogeográfica ausente.

El nivel de polimorfismo detectado en la región COI de *S. purpurascens* ($\pi = 0.01358$) es bajo, de acuerdo con lo encontrado en otros ortópteros (e.g. Chapco et al., 1992; Lee et al., 2006) y otros taxa de vertebrados e invertebrados (Nei, 1987). Generalmente, bajos niveles de polimorfismo se relacionan con tasas de mutación bajas en la especie, una divergencia reciente de los linajes mitocondriales (Kambhampati et al., 1996; Avise, 2000), así como también con una expansión o reducción poblacional reciente (Chapco et al., 1992; Buehler y Baker, 2005). Además, en otras especie en las cuales se ha inferido que sus poblaciones han experimentado cuellos de botella (e.g. las aves *Calidris canutus*, Buehler y Baker, 2005) o se han expandido recientemente a partir de una población pequeña (e.g. la

anchoa *Engraulis encrasicolus*, Maguolas et al., 1996 o el pinzón *Carduelis chloris*, Merilä et al., 1997), frecuentemente las redes filogenéticas construidas con sus haplotipos mitocondriales muestran un patrón de estrella, tal como se formó en la MSN de los haplotipos de *S. purpurascens*. Sin embargo, los alcances de este estudio no permiten proponer alguna de estas explicaciones al caso de *S. purpurascens*.

PATRÓN FILOGEOGRÁFICO

Los resultados del presente trabajo sugieren que las poblaciones de Acámbaro, Guanajuato, Peña de Bernal, el Pedregal de San Ángel, Atotonilco, Papalotla, Cholula y Monte Albán han estado estrechamente relacionadas, ya que todos sus haplotipos se agruparon en un clado monofilético dentro de la especie (Clado 2) y se encuentran relativamente poco diferenciados genéticamente. El patrón de distribución de sus haplotipos y las relaciones filogenéticas de estos, sugieren una moderada estructuración filogeográfica, en la cual, existen haplotipos comunes (haplotipos 8, 4 y 14), algunos ampliamente distribuidos, pero también haplotipos raros restringidos a poblaciones o regiones geográficas particulares (e.g. el resto de los haplotipos en los grupos genéticos 3, 4 y 5) que están escasamente diferenciados de los haplotipos comunes. Tradicionalmente, se ha considerado que los haplotipos más frecuentes y más ampliamente distribuidos representan linajes ancestrales dentro de las especies, ya que han tenido el tiempo suficiente para acumularse en una cantidad sustancial de copias y expandirse a poblaciones distantes. También se considera que de estos haplotipos comunes se derivaran gran número de nuevas mutaciones, que representan a los haplotipos más raros y recientes, los cuales, permanecen en la población de origen, a menos que ocurran altos niveles de flujo génico provocando que emigren a poblaciones lejanas (Avice et al., 1987; Avice, 2000; Excoffier y Smouse, 1994; Templeton, 1998). Con base en esto, se puede asumir que el haplotipo 8 representa uno de los linajes ancestrales en *S. purpurascens*, debido a que: i) fue el haplotipo con mayor frecuencia en el estudio, ii) se presentó en el 60 % de las poblaciones, incluso entre las más lejanas geográficamente, iii) otros haplotipos menos frecuentes se diferenciaron por escasas mutaciones de éste y iv) como se observó en la MSN, fue el haplotipo más cercano (en términos de distancias genéticas) a los haplotipos de Malinalco y Yecapixtla (que pertenecieron a otro clado en la especie). Otros prospectos a linajes ancestrales pueden ser los representados por los haplotipos 4 y 14, ya que fueron los

haplotipos con las frecuencias más altas después del haplotipo 8, otros haplotipos de menor frecuencia se diferenciaron escasamente de estos y se presentaron en poblaciones distantes geográficamente. Sin embargo, ambos haplotipos mostraron una distribución geográfica más limitada.

La existencia de haplotipos comunes de amplia distribución y de haplotipos raros y locales, estrechamente relacionados a los ampliamente distribuidos es un patrón que se ajustan a la categoría filogeográfica V (ver Cuadro 1) propuesta por Avise et al. (1987) y Avise (2000). De acuerdo con estos estudios, la categoría filogeográfica V se asocian a especies con: i) niveles moderados de dispersión, ii) ausencia de barreras de aislamiento biogeográfico entre sus poblaciones y iii) con flujo génico contemporáneo bajo. Estas implicaciones parecen congruentes con algunos aspectos de la biología y la distribución geográfica de la especie. Por ejemplo, aunque no se conoce la magnitud de la dispersión de *S. purpurascens*, su condición áptera puede implicar niveles relativamente bajos de dispersión como se ha demostrado en otros ortópteros ápteros (e.g. *Metrioptera bicolor*, Kindvall, 1999 y *Hemideina maori*, Leisnham y Jamieson, 2002). Por otro lado, las poblaciones de la especie se distribuyen en regiones geográficas aparentemente continuas como el valle de México (Acámbaro, Guanajuato, Peña de Bernal y el Pedregal de San Ángel), el valle de Tlaxcala-puebla (Atotonilco, Papalutla, Cholula) y los valles centrales de Oaxaca (Monte Albán) las cuales, se caracterizan principalmente por la presencia de cultivos de maíz, frijol y alfalfa, (SARH-Tlaxcala, 1993; CESAVETLAX, 1995; Cerritos y Cano-Santana, 2008; Carta de uso de suelo-INEGI, 2009) que favorecen la presencia de *S. purpurascens* al servir como su alimento y hábitat (Kevan, 1977; (Cerritos y Cano-Santana, 2008).

Con respecto a las poblaciones de Yecapixtla y Malinalco, los resultados del presente estudio sugieren un aislamiento histórico de ambas poblaciones, debido a que sus haplotipos mostraron una notable asociación geográfica (Grupo 1 en Yecapixtla y Grupo 2 en Malinalco), se diferenciaron en un clado monofilético en la especie (Clado 1) y ambas poblaciones produjeron los niveles más altos de D_a (> 1.78 %) y F_{ST} (> 0.7) cuando se compararon con las demás. Este aislamiento histórico encuentra sustento en la dispersión moderada de *S. purpurascens* (propuesta anteriormente) y la topografía circundante a las localidades de Yecapixtla y Malinalco. Debido a que la localidad de Yecapixtla se ubicó en la porción norte más elevada del valle de Morelos que al mismo tiempo se encuentra rodeado

al norte por el eje neovolcánico transversal y al suroeste por el sistema de sierras y valles guerrerenses. En tanto que, la localidad de Malinalco está en un pequeño valle rodeado por un sistema de serranías pertenecientes a la provincia fisiográfica de sierras y valles guerrerenses, así como también por el eje neovolcánico transversal al noreste (como se observa en las cartas de provincias fisiográficas y topográficas de México-INEGI, 2009). De esta manera, las poblaciones de Yecapixtla y Malinalco aparentemente están aisladas geográficamente de las poblaciones más próximas como las del valle de México (el Pedregal de San Ángel y Peña de Bernal) y el valle de Tlaxcala-Puebla (Cholula, Papalotla y Atotonilco).

PROCESOS DE FLUJO GÉNICO

Otros estudios filogeográficos (e.g. Buerkle, 1999; Bulgin et al., 2003; Buehler y Baker, 2005) han documentado que valores significativos de $F_{ST} \geq 0.1$ reflejan una notable diferenciación genética entre las poblaciones, implicando un flujo génico bajo entre estas. Los valores de F_{ST} entre las poblaciones de *S. purpurascens* fueron, generalmente, > 0.1 , lo cual concuerda con un flujo génico bajo, asociado a una dispersión moderada de este chapulín. En contraste, la alta similitud genética entre las poblaciones de Acámbaro, Guanajuato y Monte Albán (con valores negativos y no significativos de F_{ST}) a pesar su separación geográfica (> 500 km), podría interpretarse como que ha ocurrido un flujo génico extensivo entre estas poblaciones. A este respecto, algunos autores (e.g. Templeton, 1998; Buerkle, 1999; Bulgin et al., 2003; Buehler y Baker, 2005) han argumentado que bajos niveles de diferenciación interpoblacional, no necesariamente implican niveles altos de flujo génico. Esto se debe a que cuando las poblaciones han divergido recientemente, los índices F_{ST} pueden sobreestimar la magnitud de flujo génico entre las poblaciones, como consecuencia del polimorfismo ancestral compartido entre estas. Aunque, los resultados de este trabajo no permiten asumir una separación reciente de las poblaciones de *S. purpurascens*, esta explicación parece más coherente que un flujo génico alto entre estas población.

El por qué la diferenciación genética de las poblaciones no se ajustó a un modelo de flujo génico de aislamiento por distancia, ni al modelo planteado en el AMOVA (que también consideraba la cercanía geográfica de las poblaciones), puede explicarse, principalmente, por la existencia de haplotipos compartidos entre las poblaciones más distantes

geográficamente. Sin embargo, con base en los índices F_{ST} se puede apreciar que si hay una estructuración genética en las poblaciones de *S. purpurascens*, en la que existen poblaciones individuales aisladas genéticamente (Malinalco y Yecapixtla) y grupos de poblaciones (el primero compuesto por Peña de Bernal y el Pedregal de San Ángel, el segundo por Atotonilco, Papalutla y Cholula y el tercero por Acámbaro y Guanajuato) entre los cuales el flujo génico es considerablemente bajo (valores significativos de $F_{ST} > 0.1$). Sin embargo, entre las poblaciones que integran estos grupos, todas estas relativamente cercanas geográficamente, ocurre un flujo genético considerable (pues no hay niveles significativos de F_{ST}).

Aunque el presente estudio ha proporcionado los primeros datos moleculares sobre la variación genética interpoblacional de *S. purpurascens*, cabe señalar que las interpretaciones realizadas aquí sobre la estructura genética y filogeográfica de este chapulín pueden estar afectadas por las características del muestreo. Esto se debe a que las inferencias a partir de datos moleculares del ADNmt sobre las relaciones históricas de las poblaciones y los procesos evolutivos involucrados, pueden verse afectadas por un muestreo limitado. Por lo que se debe considerar el mayor número de poblaciones a fin de representar adecuadamente la distribución actual de la especie (Avice et al., 1987; Templeton, 1998; Avice, 2000). De esta manera, para poder hacer inferencias más sustentadas sobre la historia evolutiva intraespecífica de *S. purpurascens*, es necesario realizar un muestreo más extensivo, que incluya poblaciones intermedias a las analizadas aquí y otras principalmente, del suroeste y el sur de México. Además, se deben desarrollar datos moleculares de regiones más variables (e. g. la región control del ADNmt), que permita esclarecer de mejor manera las relaciones filogenéticas entre los linajes mitocondriales que se detectaron con la región COI, así como también para poder determinar tiempos de divergencia y coalescencia entre linajes.

LITERATURA CITADA

- Alfaro, A. L. 1995. Biología de *Sphenarium purpurascens* Charpentier (Ortóptera: Acrididae) y patogenicidad de *Beauveria bastiana* en laboratorio. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México.
- Allegrucci, G., Todisco, V. y Sbordoni, V. 2005. Molecular phylogeography of *Dolichopoda* cave crickets (Orthoptera, Rhaphidophoridae): A scenario suggested by mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37, 153-164.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T. Neigel, J. E., Reeb, C. A. y Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489-522.
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Massachusetts.
- Beuhler, D. M. y Baker, A. J. 2005. Population divergent times and historical demography in Red Knots and dunlins. *The condor* 107, 497 - 513.
- Bermingham, E. y Avise J. C. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States. *Genetics* 113, 939-965.
- Brower A. V. Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence between races of the Butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 91, 6491 - 6495.
- Brown, W. M., Goodman, H. M. 1979. Quantitation of intrapopulation variation by restriction analysis of human mitochondrial DNA. In extrachromosomal DNA. ed. D. J. Cummings., P. Borts, L. B., Dawid, S. M., Weissman, C. F. Fox. New York Academic. Nueva York.
- Brown, W. M., George, M. Jr., Wilson, A. C. 1982. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 76, 1967-1971.
- CESAVETLAX. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tlaxcala. 1995. Informe Técnico del Comité Estatal de Sanidad Vegetal en Tlaxcala. Campaña contra el chapulín. Tlaxcala. México.
-

-
- Cerritos, R. y Cano-Santana, Z. 2008. Harvesting grasshoppers *Sphenarium purpurascens* in Mexico for human consumption: A comparison with insecticidal control for managing pest outbreaks. *Crop protection* 27, 473-480.
- Chapco, W., Kelln, R. A. y McFadyen, A. D. 1992. Intraspecific mitochondrial variation in the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Heredity* 69, 547-557.
- Cueva del Castillo, R., Núñez-Farfán, J. y Cano-Santana, Z. 1999a. The role of body size in mating success of *Sphenarium purpurascens* in Central Mexico. *Ecological Entomology* 24, 146-155.
- Cueva del Castillo, R. y Núñez-Farfán, J. 1999b. Sexual selection on maturation time and body size in *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae): correlate response to selección. *Evolution* 53, 209-215.
- Cueva del Castillo, R. Galiacia, I., Hunt, J. y Núñez-Farfán, J. *En Revisión*. Current sexual selection, population differentiation, and the evolution of sexual size dimorphism in a flightless grasshopper.
- Excoffier L., Laval, G. y Schneider, S. 2005. Arlequin: Computational and Molecular Population Genetics Lab CMPG. Version 3.01. Zoological Institute, University of Berne, Switzerland.
- Excoffier, L. y Smouse, P. E. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics* 136, 343-359.
- da Silva, M. N. F. y Patton, J. L. 1998. Molecular phylogeography and the evolution and conservation of Amazonian mammals. *Molecular Ecology* 7, 475-486.
- Flook, P. K. y Rowell, H. F. 1996. The phylogeny of Caelifera (Insecta, Orthoptera) as deduced from mtrDNA gen sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8, 89-103.
- Galicía-Mendoza D. I. 2002. Selección sexual en proceso y la evolución del dimorfismo sexual en el tamaño corporal de *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). Tesis Para Obtener el Título de Bióloga. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
-

-
- Grimaldo, R., Suárez-Soto, M. de la L., Massieu, H. G. y Cravioto, R. O. 1958. Contenido en cistina y tirosina de algunos alimentos mexicanos. *Anales del Instituto de Biología UNAM Serie Zoología* 28, 1-10.
- Gyllensten, U., Wharton, D., Wilson, A. C. 1985. Maternal inheritance of mitochondrial DNA during backcrossing of two species of mice. *Journal of Heredity* 76, 321-324.
- Henderson, R. W. y Hedges, S. B. 1995. Origin of west Indian population of the geographically widespread boa *Corallus anydris* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4, 88-92.
- Hochkirch, A. y Görzig, Y. 2009. Colonization and speciation on volcanic islands: phylogeography of the flightless grasshopper genus *Arminda* (Orthoptera, Acrididae) on the Canary Islands. *Systematic Entomology* 34, 188-197.
- Holsinger, K. E. y Weir, B. S. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{st} . *Nature Reviews* 10, 630-650.
- INEGI Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, 2009. Galileo mapa digital de México. Capas: datos de relieve, provincias fisiográficas, sistema de topoformas y subprovincias fisiográficas.
- Kambhampati, S., Luyckx, P. y Nalepa, C. A. 1996. Evidence for sibling species in *Cryptocercus punctulatus*, the wood roach, from variation in mitochondrial DNA and karyotype. *Heredity* 76, 458-496.
- Kevan, D. K. M. 1977. The American Pyrgomorphidae (Orthoptera). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 36, 3-28.
- Kindvall, O. 1999. Dispersal in a metapopulation of the bush cricket, *Metrioptera bicolor* (Orthoptera: Tettigoniidae). *Journal of Animal Ecology* 68, 172-185.
- Knowles, L. L. y Richards, C. L. 2005. Importance of genetic drift during Pleistocene divergence as revealed by analysis of genomic variation. *Molecular Ecology* 14, 4023-4032.
- Knowles, L. L. 2009. Statistical phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40, 593-612.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca F. X. y Wilson, A. C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification
-

-
- and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 86, 6196-6200.
- Lansman, R. A., Avise, J. C., Huettel, M. D. 1983. Critical experimental test of the possibility of “paternal leakage” of mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 80, 1969-1971.
- Lee, J., Marshall, J. C., Schimitz, J. O. y Caccone, A. 2006. Genetic divergence of Connecticut *Melanoplus femurrubrum* populations. *Journal of Heredity* 97, 290-293.
- Leisnham, P. T. y Jamieson, I. G. 2002. Metapopulation dynamics of a flightless alpine insecto *Hemideina maori* in a naturally fragmented habitat. *Ecological Entomology* 27, 547-580.
- Librado, P. y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Liedloff, A. C. 1999. Mantel nonparametric test calculator. Version 2.0. School of Natural Resource Sciences, Queensland University of Technology, Australia.
- Lugo-Olgín, S. D. y Cueva del Castillo, R. 2007. Multiple matings, female fecundity and assesment of sperm competition risk in the protandrous grasshoper *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *Annals of the Entomological Society of America* 100, 591-595.
- Maguolas, A., Tsimenides, N. y Zourus, E. 1996. Mitochondrial DNA phylogeny and the reconstruction of the population history of a species: the case of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Molecular Biology and Evolution* 13, 178-190.
- Márquez-Mayaudón. 1962. Estudio de las especies del genero *Sphenarium* basado en sus genitalia (Acrididae, Orthoptera) con la descripción de una especie nueva. *Anales del Instituto de Biología UNAM Serie Zoología* 33, 235-245.
- Massieu, H. G., Cravioto, R. O., Cravioto, O. Y. y Figueroa, F. de M. 1959. Nuevos datos sobre el valor nutritivo de algunos insectos comestibles mexicanos. *Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco* 16, 90 104.
- McMillan, O. W. y Bermingham, E. 1996. The phylogeographic pattern of mitochondrial DNA variation in Dall’s porpoise *Phocoenoides dalli*. *Molecular Ecology* 5, 47-61.
-

-
- Merilä, J., Björkland, M. y Baker, A. J. 1997. Historical demography and present day population structure of the greenfinch *Carduelis chloris* – an análisis of the mtDNA control region. *Evolution* 56, 946-956.
- Müller, K., Müller, J. y Quandt, D. 2006. PhyDE: Phylogenetic Data Editor. Mathematisches Institut. Humboldt-Universität zu Berlin. Alemania.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York.
- Pérez, D. E., Dominici, G. O. y Hierro, B. 1995. *Jaragua*: new genus and two new species of American pyrogomorphids (Orthoptera: Pyrgomorphidae) from Hispanolia, West Indies. *Annals of the Entomological Society of America* 88, 31-38.
- Perdices, A., Bermingham, E., Montilla, A. & Doadrio, I. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25, 172-189.
- Ramos-Elorduy Blásquez, J. 2004, Entomología en la alimentación, la medicina y el reciclaje. Biodiversidad Taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento. Volumen IV. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Ryan, M. J., Randa, A. S. & Weigt, L.A. 1996. Allozyme and advertisement call variation in the tungara frog, *Physalaemus pustulosus*. *Evolution* 50, 2435-2453.
- SARH-Tlaxcala. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1993. Evaluación de la campaña contra chapulines en Tlaxcala en el ciclo Primavera-Verano 1993-94. Subdelegación de Agricultura. Programa de sanidad Vegetal. México.
- Serrano-Limón, G., Ramos-Elorduy, J. 1990. Biología de *Sphenarium purpurascens* Chapentier y algunos aspectos de su comportamiento (Orthoptera: Acrididae). *Anales del Instituto de Biología UNAM Serie Zoología* 59, 139 – 152.
- Seutin, G., Brawn, J., Ricklefs, R. y Bermingham, E. 1993. Genetic divergence among populations of a tropical passerine, the straked saltator (*Saltator albicollis*). *The Auk* 110, 117-126.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. 2007. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis. Center of Evolutionary Functional Genomics. Biodising Institut. Arizona State University. USA.
-

-
- Templeton, A. R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology* 7, 381-397.
- Thompson, J. D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D. G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24, 4876-4882.
- Trewick, S. A., Wallis, G. P. y Morgan-Richards, M. 2000. Phylogeographical pattern correlates with pliocene mountain building in the alpine scree weta (Orthoptera, Anostomatidae). *Molecular Ecology* 9, 657- 666.
- Wen-Bin, Y., Yu-Ling, C., Chun-Hsien, L., Fu-Sheng, W y Jenn-Tze, Y. 2004. Genetic differentiation of *Loxoblemmus appendicularis* complex (Orthoptera: Gryllidae): speciation through vicariant and glaciation events. *Annals of the Entomological Society of America* 97, 613-623.
- Wilcox, T. P., Hugg, L., Zeh, J. A. y Zeh, D.W. 1997. Mitochondrial DNA sequencing reveals extreme genetic differentiation in a cryptic species complex of neotropical pseudoscorpions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7, 208-216.
- Zhang, D. -X y Hewitt, G. M. 1997. Assesment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology* 6, 143-150.
- Zeh, D. W., Zeh, J. A., y Bonilla, M. 2003. Phylogeography of the giant harlequin beetle (*Acronecium longimanus*). *Journal of Biogeography* 30, 747-753.
-